

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 9월 15일 (15.09.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/144125 A2

- (51) 국제특허분류:
A61K 36/81 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/002427
- (22) 국제출원일: 2016년 3월 11일 (11.03.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0034679 2015년 3월 12일 (12.03.2015) KR
- (71) 출원인: (주)대웅제약 (DAEWOONG PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [KR/KR]; 13211 경기도 성남시 중원구 갈매지로 244, Gyeonggi-do (KR). **경희대학교 산학협력단** (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 02447 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 국제캠퍼스내, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: **최정혜** (CHOI, Jung-Hye); 04732 서울시 성동구 독서당로 175, 104 동 1902 호(옥수동, 극동그린아파트), Seoul (KR). **조윤진** (CHO, Yoon Jin); 01230 서울시 강북구 한천로 105 길 23, 113 동 501 호(번동, 주공아파

트), Seoul (KR). **류효정** (RYU, Hyo Jeong); 21994 인천시 연수구 신송로 118 번길 6, 103 동 1502 호 (송도동, 풍림아이원), Incheon (KR). **강희철** (KANG, Hee Chol); 34818 대전시 중구 목동로 37, 106 동 401 호(목동, 목양마을아파트), Daejeon (KR). **김진표** (KIM, Jin Pyo); 35245 대전시 서구 둔산로 201, 205 동 603 호(둔산동, 국화아파트), Daejeon (KR).

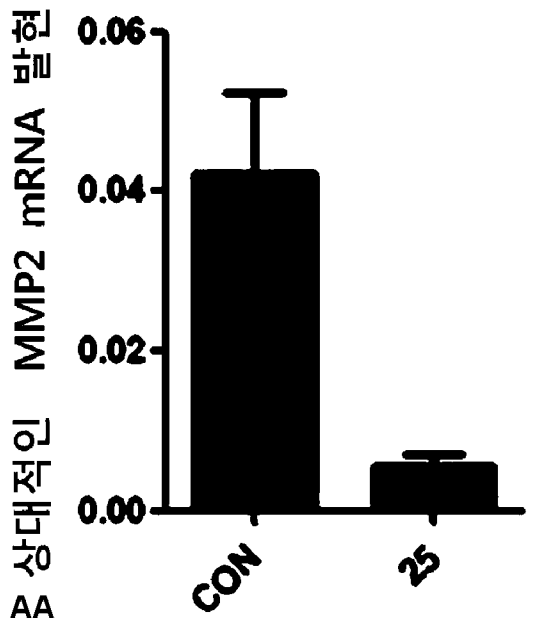
(74) 대리인: **유지열** (YOU, Chi-youl) 등; 14449 경기도 부천시 오정구 석천로 397 (삼정동) 부천테크노파크 쌍용 3 차 203 동 210 호 좋은생각특허법률사무소, Gyeonggi-do (KR).

(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.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: NOVEL USE OF *SOLANUM NIGRUM* L. EXTRACT

(54) 발명의 명칭 : 용규 추출물의 신규 용도



AA ... Relative expression of MMP2 mRNA

(57) Abstract: The present invention provides a novel use of a *Solanum nigrum* L. extract. The present invention has an advantage of effectively treating, alleviating and/or preventing endometriosis or a complication thereof.

(57) 요약서: 본 발명은 용규 추출물의 신규 용도를 제공한다. 본 발명에 의해 자궁내막증 또는 이의 합병증을 효과적으로 치료, 개선 및/또는 예방할 수 있다는 장점이 있다.

WO 2016/144125 A2



(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:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 용규 추출물의 신규 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 용규 추출물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 용규 추출물의 신규 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 자궁내막증(endometriosis)은 가임기 여성의 3~10%, 불임 여성의 25~35% 정도에서 나타나는 매우 흔한 부인과 질환으로 자궁내막조직이 자궁 이외에 장소(난소, 복강, 장관, 방광)에서 비정상적으로 증식하는 질환이다.
- [3] 자궁내막증은 월경통(dysmenorrhoea), 성교통(dyspareunia) 및 침범부위에 따른 다양한 통증(ex. 폐침범시: 기흉, 혈흉/ 요관침범시: 요관폐쇄, 혈뇨)을 증상으로 하며, 30-50%의 환자에서 불임의 원인으로 확인되고 있다.
- [4] 현재까지 수술을 통한 자궁내막 제거수술 외에 자궁내막증에 대한 근본적인 치료법이 없으며, 이러한 수술요법은 차후 임신에 제약을 줄 수 있으며 재발을 또한 높은 편이다.
- [5] 현재 내과적 치료로는 통증완화를 위해 진통제, 소염제를 사용하는 보존적 요법과 다나졸, 프로게스테론, GnRH를 사용하여 생리주기를 제어하는 호르몬치료가 사용되고 있으나 이들은 근본적 치료법이 아닌 증상의 개선일 뿐이다.
- [6] 또한 이들 호르몬의 장기적 사용은 여러 가지 부작용(체중의 증가, 수분 축적, 피로, 여드름, 지성 피부, 조모증, 위축성 질염, 안면 홍조, 근육 경련, 불안정한 감정 상태, 간세포 독성)을 야기하며, 게다가 이러한 치료에 대한 재발률도 매우 높은 것으로 알려져 있다.
- [7] 이처럼 자궁내막증은 치명적이지는 않지만 극심한 통증으로 인해 일상생활에 불편함이 있고 심한 경우 불임에까지 이르는 질환으로, 여성의 삶의 질과 임신의 문제에서 심각하게 인식되어야 하고 반드시 극복해야 할 질병임에도 불구하고 아직까지 이렇다 할 예방 및 치료방법이 존재하지 않고 있다.
- [8] 따라서 여성, 특히 가임기 여성들에게 침습적인(invasive) 수술요법이나 단순한 진통요법, 인위적인 생리주기제어법 등이 아닌 자연적이면서도 부작용이 낮은 새로운 개념의 자궁내막증 예방, 치료제의 개발이 시급한 실정이다.
- [9] 한편, 용규 추출물은 AIDS 치료 효과를 가짐이 알려져 있다(대한민국 공개특허 제1020060034178호).
- [10] [선행기술문헌]
- [11] [특허문헌]
- [12] (특허문헌 1) 대한민국 공개특허 제1020060034178호, 2006.4.21, 요약
- 발명의 상세한 설명**

기술적 과제

- [13] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 용규 추출물의 신규 용도를 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 과제는 상기에 언급된 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [15] 본 발명자들은 놀랍게도 용규 추출물이 자궁내막증 또는 이의 합병증 치료, 개선 및/또는 예방에 효과를 나타냄을 알게 되어 본 발명을 완성하였다.
- [16] 본 발명은 용규 추출물의 자궁내막증 또는 이의 합병증 치료, 개선 및/또는 예방을 위한 의약 및/또는 식품 용도를 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 용규 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 자궁내막증 또는 이의 합병증 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.
- [18] 상기 용규(*Solani Nigri Herba*)는 대한민국약전외한약(생약)규격집에 수제된 것으로, 솔라눔니그럼(*Solanum nigrum* Linne(가지과 *Solanaceae*))의 지상부일 수 있다. 지상부는 줄기와 잎을 포함하는 의미로, 꽃도 포함될 수 있다.
- [19] 상기 약학조성물은 약제학적으로 허용되는 첨가제를 더 포함하고, 상기 용규 추출물 및 상기 첨가제로 이루어질 수 있다.
- [20] 상기 자궁내막증 또는 이의 합병증은 MMP-2, MMP-9, COX-2, TNF-알파(α), 또는 MCP-1 중에서 선택된 하나 이상의 과발현에서 기인하는 것일 수 있다.
- [21] 상기 합병증은 골반염, 골반유착, 난소낭종, 자궁근종, 자궁외임신 및 불임으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [22] 상기 용규 추출물은 상기 용규를 용매로 추출한 용매추출물로, 상기 용매는 물, 알코올, 또는 그 혼합물 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [23] 상기 알코올은 탄소수 1~5의 저급알코올일 수 있다.
- [24] 상기 용매는 70부피% 에탄올일 수 있다.
- [25] 상기 용규 추출물은 상기 용규를 70부피%에탄올로 추출한 70부피%에탄올추출물을 부탄올로 분획추출한 부탄올분획추출물일 수 있다.
- [26] 상기 부탄올분획추출물은 (A) 용규를 70부피%에탄올로 추출한 70부피%에탄올추출물을 준비하는 단계; (B) 상기 (A)단계의 70부피%에탄올추출물에 물을 가하는 단계; (C) 상기 (B)단계의 물이 가해진 70부피%에탄올추출물을 n-헥산으로 분획추출하는 단계; (D) 상기 (C)단계의 n-헥산 분획을 제거하고 남은 수층을 디클로로메탄으로 분획추출하는 단계; (E) 상기 (D)단계의 디클로로메탄 분획을 제거하고 남은 수층을 에틸아세테이트로 분획추출하는 단계; 및 (F) 상기 (E)단계의 에틸아세테이트 분획을 제거하고 남은 수층을 부탄올로 분획추출하는 단계에 의해 수득한 분획추출물일 수 있다.
- [27] 상기 치료 또는 예방은 자궁내막증 세포의 부착 또는 이동 억제에 의한 것일 수 있다.

- [28] 상기 부착 또는 이동 억제제는 MMP-2 또는 MMP-9 중에서 선택된 하나 이상의 발현 억제에 의한 것일 수 있다.
- [29] 상기 치료 또는 예방은 염증 및 통증 관련 효소 발현 억제 또는 염증성 사이토카인 발현 억제 중에서 선택된 하나 이상에 의한 것일 수 있다.
- [30] 또한, 본 발명은 용규 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 자궁내막증 또는 이의 합병증 개선 또는 예방용 식품 조성물을 제공한다.
- [31] 별도의 언급이 없는 한 상기 식품 조성물은 본 발명의 약학조성물에서 언급된 사항이 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다. 상기 '개선'은 '치료'에 포함되며, 상태 또는 증세가 호전되는 것을 의미한다.
- [32] 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.
- [33] 본 발명은 또한 용규 추출물을 투여를 필요로 하는 인간을 포함한 포유류에게 용규 추출물을 투여하는 단계를 포함하는 자궁내막증 또는 이의 합병증의 치료, 또는 예방법을 제공하며, 용규 추출물의 자궁내막증 또는 이의 합병증의 치료 또는 예방용 제제 제조를 위한 용도를 제공한다. 상기 투여되는 용규 추출물은 유효량의 용규 추출물일 수 있다. 또한, 본 발명은 자궁내막증 또는 이의 합병증의 치료, 개선 또는 예방에 사용하기 위한 용규 추출물을 제공한다.
- [34] 별도의 언급이 없는 한, 본 발명의 약학 조성물에서 언급된 사항은 모순되지 않는 한 본 발명의 방법, 추출물 및 용도에도 동일하게 적용된다.
- [35] 상기 용규 추출물 또는 조성물은 인간을 포함한 포유류에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며, 유효성분을 약학적으로 허용되는 첨가제와 함께 배합하여 제제화하여 투여할 수 있다. 제제화할 경우 보통 사용하는 첨가제는 유효성분 이외의 물질로 담체, 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제, 희석제, 부형제 등일 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 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 주사가능한 액제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 비강세척제 및 좌제가 포함된다. 주사가능한 액제, 현탁제, 유제는 물, 비수성용제나 현탁용제와 유효성분을 혼합하여 제조할 수 있으며, 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 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.

- [36] 본 발명의 조성물에 포함되거나, 용도 및 방법 중 사용되는 용규 추출물은 성인 여성 기준으로 1일 0.0001 ~ 1000mg/kg, 바람직하게는 0.0001 ~ 100 mg/kg, 보다 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.

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

- [38] 상기 용규 추출물은 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

- [39] 본 발명에 의해 자궁내막증 또는 이의 합병증을 효과적으로 치료, 개선 및/또는 예방할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [40] 도 1은 용규 알콜 추출물의 MMP-2 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.

- [41] 도 2는 용규 알콜 추출물의 MMP-9 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.

- [42] 도 3은 용규 알콜 추출물의 COX-2 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.

- [43] 도 4는 용규 알콜 추출물의 TNF알파 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.

- [44] 도 5는 용규 알콜 추출물의 MCP-1 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.

- [45] 도 6은 용규 알콜 추출물의 자궁내막증 세포 부착 및 착상 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.

- [46] 도 7은 용규 알콜 추출물의 자궁내막증 세포 이동 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.
- [47] 도 8은 용규 알콜 추출물의 복강내투여모델에서 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.
- [48] 도 9는 용규 알콜 추출물의 수술유도모델에서 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.
- [49] 도 10은 용규 부탄올분획 추출물의 MMP-2 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.
- [50] 도 11은 용규 부탄올분획 추출물의 MMP-9 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.
- [51] 도 12는 용규 부탄올분획 추출물의 COX-2 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.
- [52] 도 13은 용규 부탄올분획 추출물의 TNF알파 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.
- [53] 도 14는 용규 부탄올분획 추출물의 MCP-1 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.
- [54] 도 15는 용규 부탄올분획 추출물의 자궁내막증 세포 부착 및 착상 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.
- [55] 도 16은 용규 물 추출물의 MMP-2 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.
- [56] 도 17은 용규 물 추출물의 COX-2 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.
- [57] 도 18은 용규 물 추출물의 TNF알파 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.
- [58] 도 19는 용규 물 추출물의 MCP-1 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [59] 이하, 실시예, 제조예 및 도면을 참조하여, 본 발명을 보다 상세하게 설명하나, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐으로 본 발명의 내용이 하기 실시예, 제조예 및 도면에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [60] 자궁내막증의 특징인 세포이동 및 부착 관련 효소{MMP-2(matrix metalloproteinase-2) 및/또는 MMP-9(matrix metalloproteinase-9)}의 발현 변화, 염증 및 통증 관련 효소{COX-2(cyclooxygenase-2)}의 발현 변화, 염증성 사이토카인{TNF-알파(tumor necrosis factor alpha) 및/또는 MCP-1(Monocyte chemoattractant protein-1)}의 발현 변화, 자궁내막증세포 부착 및 착상 변화, 자궁내막증세포 이동 변화 등에 용규 추출물이 미치는 영향을 확인함으로써, 용규 추출물이 자궁내막증 또는 이의 합병증 치료, 개선 또는 예방 효과를

가짐을 아래와 같은 방법으로 확인하였다.

[61]

[62] 하기 실시예 중 기재된 자궁내막증 모델 세포는 자궁내막증 여성의 활성 자궁내막증 조직을 이용하여 개발된, 인간 불멸화 자궁내막증 상피세포(human immortalized endometriotic epithelial cells)인 12Z 세포주를 준비하였다{Johann-Wolfgang-Goethe-Universitaet(Germany)의 Dr. Starzinski-Powitz 제공}. 이 세포는 기존에 알려진 활성 자궁내막증 조직(active endometritic tissue)의 분자생물학적 성격과 유사함이 증명되어(Banu et al., 2008), 자궁내막증의 분자생물학적 연구에 대한 새로운 인 비트로 모델로 사용되고 있다. 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.

[63]

[64] <실시예 1> 용규 알코올 추출물의 자궁내막증 또는 이의 합병증 치료, 개선 또는 예방 효과 확인

[65] 1-1. 용규 알코올 추출물의 준비

[66] 음건된 용규(*Solanum nigrum*, 산지: 경상북도 영천)을 대한민국 경동시장에서 구입하였고, 용규 전초를 400um 입자 사이즈가 되도록 분쇄하였다. 이와 같이 준비된 용규 10kg에 70%(v/v) 에탄올 수용액 100리터를 가하고 실온에서 24시간동안 침지하여 여액을 취하였고, 동일한 방법으로 1회 반복 추출하였다. 추출한 여액을 섭씨 60도에서 감압농축하고, 농축액을 동결건조하여 분말상태의 용규 70%에탄올 추출물 1.5kg을 얻었다.

[67]

[68] 1-2. 세포이동 및 부착 관련 효소 발현 억제 효과 확인

[69] 용규 70부피% 에탄올 추출물이 자궁내막증 세포의 이동 및 침투에 중요한 역할을 하는 단백질 분해효소인 MMP-2 및 MMP-9의 mRNA 발현을 억제하는지 확인하기 위하여, 실시간 PCR (real-time PCR)을 수행하였다.

[70]

구체적으로, 자궁내막증 세포인 12Z(epithelial endometriotic cells)에 용규 70부피% 에탄올 추출물 25 ug/mL, 50 ug/mL, 또는 100 ug/mL을 각각 24시간 처리한 후 12Z 세포에서 TRIzol(Invitrogen Canada, Burlington, ON, Canada)을 사용하여 총 RNA를 추출한 후, 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)을 실시하였다. 구체적으로, first-strand cDNA를 주형으로 하여, Thermal Cycler Dice Real Time PCR System(Takara, Japan)을 이용하여 섭씨 95도에서 5초 동안 변성, 섭씨 57도에서 10초 동안 어닐링(annealing), 섭씨 72도에서 20초 동안 연장을 수행하는 조건으로 45회 반복하여 SYBR Green real-time PCR을 수행하였다. 상기 SYBR Green real-time PCR에 사용된 MMP-2, MMP-9 및 보정용 GAPDH 프라이머들은 하기 [표 1]과 같으며, MMP-2, MMP-9의 Ct값의 평균은 트리플리케이트(triplicate) 측정으로

구해지며, GAPDH의 Ct값에 의해 보정되었다. 또한, 용규 추출물 미처리군은 대조군(control; CON)으로 하여, 추출물 처리를 제외하고 용규 추출물 처리군과 동일하게 처리하였다. 그 결과, 자궁내막증에서 발현되는 대표적인 단백질이며, 세포의 이동과 침투에 중요한 역할을 하는 내인성 MMP-2 및 MMP-9의 mRNA 발현을 용규 70% 에탄올 추출물이 억제함을 자궁내막증 세포인 12Z 세포에서 확인하였다(도 1, 도 2 참조).

[71] [표 1]

MMP-2	sense primer	CCG CAG TGA CGG AAA GAT GT (서열번호 1)
	antisense primer	CAC TTG CGG TCG TCA TCG TA (서열번호 2)
MMP-9	sense primer	GGA CGA TGC CTG CAA CGT (서열번호 3)
	antisense primer	CAA ATA CAG CTG GTT CCC AAT CT (서열번호 4)
GAPDH	sense primer	GGG GCT CTC CAG AAC ATC AT (서열번호 5)
	antisense primer	CAG GTC AGG TCC ACC ACT GA (서열번호 6)

[73]

[74] 도 1은 용규 알콜 추출물의 MMP-2 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이고, 도 2는 용규 알콜 추출물의 MMP-9 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도로, 도 1과 도 2의 x축에서 con은 대조군을, 25는 용규 70부피% 에탄올 추출물 25ug/mL 투여군을 나타내고, 도 1의 y축은 상대적인 MMP2 mRNA발현(Relative MMP2 mRNA expression)을 나타내며, 도 2의 y축은 상대적인 MMP9 mRNA발현(Relative MMP9 mRNA expression)을 나타낸다. 도에서와 같이, 70부피% 에탄올 추출물은 25ug/mL의 농도에서도, 효과적으로 MMP-2와 MMP-9 발현을 억제함을 알 수 있다.

[75]

[76] 1-3. 염증 및 통증 관련 효소 발현 억제 효과 확인

[77] 용규 70부피% 에탄올 추출물이 자궁내막증의 통증과 관련되어 있다고 알려진 COX-2의 mRNA 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 실시간 PCR (real-time PCR)을 수행하였다. 구체적으로, 자궁내막증 세포인 12Z (epithelial endometriotic cells)에 용규 70% 에탄올 추출물 25 ug/mL, 50 ug/mL, 또는 100 ug/mL 각각 24시간 처리한 후 12Z 세포에서 TRIzol (Invitrogen Canada, Burlington, ON, Canada)을 사용하여 총 RNA를 추출하여, 역전사 중합효소연쇄반응 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)을 실시하였다. 구체적으로, first-strand cDNA를 주형으로 하여, Thermal Cycler Dice Real Time PCR System (Takara, Japan)을 이용하여 섭씨 95도에서 5초 동안 변성, 섭씨 57도에서 10초 동안 어닐링 (annealing), 섭씨 72도에서 20초 동안 연장을 수행하는 조건으로 45회 반복하여 SYBR Green real-time PCR을 수행하였다. 상기 SYBR Green

real-time PCR에 사용된 COX-2 프라이머, 보정용 GAPDH 프라이머들은 하기 [표 2]와 같으며, COX-2의 Ct값의 평균은 트리플리케이트(triplicate) 측정으로 구해지며, GAPDH의 Ct값에 의해 보정되었다. 또한, 용규 추출물 미처리군은 대조군(control; CON)으로 하여, 추출물 처리를 제외하고 용규 추출물 처리군과 동일하게 처리하였다.

[78] [표 2]

[79]

COX-2	sense primer	CCA GCA CTT CAC GCA TCA GT (서열번호 7)
	antisense primer	ACG CTG TCT AGC CAG AGT TTC AC (서열번호 8)
GAPDH	sense primer	GGG GCT CTC CAG AAC ATC AT (서열번호 5)
	antisense primer	CAG GTC AGG TCC ACC ACT GA (서열번호 6)

[80]

[81] 그 결과, 자궁내막증 세포의 통증 관련 특징적 효소인 COX-2의 mRNA 발현을 용규 70% 에탄올 추출물이 억제함을 자궁내막증 세포인 12Z 세포에서 확인하였다(도 3 참조).

[82] 도 3은 용규 알콜 추출물의 COX-2 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도로, 도 3의 x축에서 con은 대조군을, 25는 용규 70부피% 에탄올 추출물 25ug/mL 투여군을 나타내고, 도 3의 y축은 상대적인 COX2 mRNA 발현(Relative COX2 mRNA expression)을 나타낸다. 도에서와 같이, 용규 70부피% 에탄올 추출물이 25ug/mL의 농도에서도, 효과적으로 COX-2 발현을 억제함을 알 수 있다.

[83]

[84] 1-4. 염증성 사이토카인 발현 억제 효과 확인

[85] 용규 70부피% 에탄올 추출물이 자궁내막증 세포에서 과발현되는 것으로 알려져 있는 염증성 사이토카인 mRNA 발현에 영향을 미치는지 확인하기 위하여, 실시간 PCR (real-time PCR)을 수행하였다.

[86] 구체적으로, 자궁내막증 세포인 12Z (epithelial endometriotic cells)에 용규 70% 에탄올 추출물 25 ug/mL, 50 ug/mL, 또는 100 ug/mL 각각 24시간 처리한 후 12Z 세포에서 TRIzol (Invitrogen Canada, Burlington, ON, Canada)을 사용하여 총 RNA를 추출하여, 역전사 중합효소연쇄반응 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)을 실시하였다. 구체적으로, first-strand cDNA를 주형으로 하여, Thermal Cycler Dice Real Time PCR System (Takara, Japan)을 이용하여 섭씨 95도에서 5초 동안 변성, 섭씨 57도에서 10초 동안 어닐링 (annealing), 섭씨 72도에서 20초 동안 연장을 수행하는 조건으로 45회 반복하여 SYBR Green real-time PCR을 수행하였다. 상기 SYBR Green real-time PCR에 사용된 TNF-a 프라이머, MCP-1 프라이머 및 보정용 GAPDH 프라이머들은 하기 [표 3]과 같으며, TNF-a 및 MCP-1의 Ct값의 평균은 트리플리케이트(triplicate) 측정으로

구해지며, GAPDH의 Ct값에 의해 보정되었다. 또한, 용규 추출물 미처리군은 대조군(control; CON)으로 하여, 추출물 처리를 제외하고 용규 추출물 처리군과 동일하게 처리하였다.

[87] [표 3]

TNF-a	sense primer	AAG CCT GTA GCC CAC CTC GTA (서열번호 9)
	antisense primer	GGC ACC ACT AGT TGG TTG TCT TTG (서열번호 10)
MCP-1	sense primer	GCT CAT AGC AGC CAC CTT CA (서열번호 11)
	antisense primer	GGA CAC TTG CTG CTG GTG AT (서열번호 12)
GAPDH	sense primer	GGG GCT CTC CAG AAC ATC AT (서열번호 5)
	antisense primer	CAG GTC AGG TCC ACC ACT GA (서열번호 6)

[89]

[90] 그 결과, 자궁내막증 세포의 염증 관련 사이토카인인 TNF-알파 및 MCP-1의 mRNA 발현을 용규 70% 에탄올 추출물이 억제함을 자궁내막증 세포인 12Z 세포에서 확인하였다(도 4, 도 5 참조).

[91] 도 4는 용규 알콜 추출물의 TNF-알파 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이고, 도 5는 용규 알콜 추출물의 MCP-1 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도로, 도 4와 도 5의 x축에서 con은 대조군을, 25는 용규 70부피% 에탄올 추출물 25ug/mL 투여군을 나타내고, 도 4의 y축은 상대적인 TNF-알파 mRNA발현(Relative TNFa mRNA expression)을 나타내며, 도 5의 y축은 상대적인 MCP-1 mRNA발현(Relative MCP-1 mRNA expression)을 나타낸다. 도에서와 같이, 용규 70부피% 에탄올 추출물이 25ug/mL의 농도에서도, 효과적으로 TNF-알파 및 MCP-1 발현을 억제함을 알 수 있다.

[92]

[93] 1-5. 자궁내막증 세포 부착 및 착상 억제 효과 확인

[94] 용규 70% 에탄올 추출물이 자궁내막증 세포의 부착 및 착상에 미치는 영향을 확인하기 위하여 부착 분석 (attachment assay)을 3번 반복 수행하였다.

[95] 구체적으로, 자궁내막증의 특징인 자궁내막증 세포가 복막 복강주위의 장기에 부착 및 착상하는 현상을 용규 70% 에탄올 추출물이 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.)가 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 X 10³ 개/well)를 50 ug/mL, 100 ug/mL, 또는 200 ug/mL 의

용균 70% 에탄올 추출물을 함유한 DMEM/F12배지와 섞은 후, 미리 분주해놓은 Met-5A 세포에 첨가하였다. 섞인 상기의 세포들은 섭씨37도의 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, 보정용 대조군을 100%로 놓고 부착된 세포들의 퍼센트를 계산하였다. 또한, 용균 추출물 미처리군은 대조군(control; CON)으로 하여, 추출물 처리를 제외하고 용균 추출물 처리군과 동일하게 처리하였다.

- [96] 그 결과, 용균 70% 에탄올 추출물을 처리한 자궁내막증 세포 12Z가, 복막 및 복강 주위 장기의 외부를 둘러싼 Met-5A 세포에 부착 억제되는 것을 확인하였다(도 6 참조).
- [97] 도 6은 용균 알콜 추출물의 자궁내막증 세포 부착 및 착상 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도로, 도 6의 x축에서 con은 대조군을, 50ug/ml은 용균 70부피% 에탄올 추출물 50ug/mL 투여군을 나타내고, 도 6의 y축은 부착세포(Attachment cells)의 비율{광학밀도(Optical Density; OD) 비율, %}을 나타낸다. 도에서와 같이, 용균 70부피% 에탄올 추출물이 50ug/mL의 농도에서도, 효과적으로 세포 부착을 억제함을 알 수 있다.
- [98]
- [99] 1-6. 자궁내막증 세포 이동 억제 효과 확인
- [100] 용균 70% 에탄올 추출물이 자궁내막증 세포의 이동에 미치는 영향을 확인하기 위하여 트랜스웰-이동 분석 (transwell-migration assay)을 3번 반복 수행하였다. 구체적으로, 24웰-트랜스웰 플레이트 (8 um pore size)에 자궁내막증 세포인 12Z 세포를 트랜스웰 플레이트의 윗 부분 (upper part)에 각각 분주한 후, 25 ug/mL, 50 ug/mL, 및 100 ug/mL 의 용균 70% 에탄올 추출물을 처리하였다. 용균 70% 에탄올 추출물 처리 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. 또한, 용균 추출물 미처리군은 대조군(control; CON)으로 하여, 추출물 처리를 제외하고 용균 추출물 처리군과 동일하게 처리하였다. 그 결과, 용균 70% 에탄올 추출물을 처리한 자궁내막증 세포 12Z의 이동이 유의적으로 억제됨을 확인하였다(도 7 참조).
- [101] 도 7은 용균 알콜 추출물의 자궁내막증 세포 이동 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도로, 도 7의 x축에서 con은 대조군을, 25ug/ml은 용균 70부피% 에탄올 추출물 25ug/mL 투여군을 나타내고, 도 7의 y축은 이동(Migration)의 비율(%)을 나타낸다. 도에서와 같이, 용균 70부피% 에탄올 추출물이 25ug/mL의 농도에서도, 효과적으로 세포 부착을 억제함을 알 수 있다.

[102]

- [103] 1-7. 복강내투여(Intraperitoneal injection)유도모델에서의 효과 확인

[104] 용규 70% 에탄올 추출물이 Intraperitoneal injection 자궁내막증 유도 모델에서의 효과를 확인하기 위하여 평가를 수행하였다.

[105] 자궁내막증 유도는 Donor mouse에서 이식할 자궁을 적출하여 잘게 조각한 후 recipient mouse의 복강내로 spreading하여 유도하였고, 약물투여는 하기 [표 4]와 같으며, 용규 70% 에탄올 추출물 125 mg/kg, 250mg/kg, 500 mg/kg을 각각 경구로 5주간 투여하였다. 자궁내막증 유도된 동물모델을 희생시켜 복부를 개복하여 복막과 복강 내 (소장, 대장, 위, 간, 방광, 난소 등)의 implantation 수를 확인하였다.

[106]

[107] [표 4]

[108]

	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주
안정화	V						
약물투여		V	V	V	V	V	
자궁내막증 유도 IP			V	V	V	V	
부검							V

[109]

[110] 또한, 비클(Vehicle) 투여군은, 추출물 대신 10% Tween 80을 200ul 투여한 것을 제외하고 용규 추출물 투여군과 동일하게 처리하였다. 또한, 양성 대조군은 용규 추출물 대신 dienogest를 0.3mg/kg 투여한 것을 제외하고, 용규 추출물 투여군과 동일하게 처리하였다.

[111] 그 결과, 용규 70% 에탄올 추출물이 유의적으로 자궁내막증 조직형성 억제 효과가 있는 것으로 확인하였다(도 8 참조).

[112] 도 8은 용규 알콜 추출물의 복강내투여모델에서 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도로, 도 8의 x축에서 비클은 비클투여군을, Dieno는 dienogest 투여군을, 용규 125는 용규 70부피% 에탄올 추출물 125mg/kg 투여군을 나타내고, 도 8의 y축은 임플란트(implant) 갯수를 나타낸다. 도에서와 같이, 용규 70부피% 에탄올 추출물이 125mg/kg에서도, 효과적으로 자궁내막증 조직형성 억제 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[113]

[114] 1-8. 수술 유도 모델(Surgical induced model)에서의 효과 확인

[115] 용규 70% 에탄올 추출물이 Surgical induced 자궁내막증 유도 모델에서의 효과를 확인하기 위한 평가를 수행하였다.

[116] 자궁내막증 유도는 SD rat (female)의 왼쪽 자궁을 7 mm길이로 절단 후 내막 부분이 복막에 맞게 양쪽 끝을 silkam으로 봉합하는 방법으로 자궁내막세포를 이식하여 유도하였고, 약물투여는 하기 [표 5]와 같으며, 용규 70% 에탄올 추출물 100 mg/kg, 300mg/kg, 500 mg/kg을 경구로 4주간 투여하였다. 자궁내막증

유도된 동물모델을 희생시켜 복부를 개복하여 자궁내막증 세포를 이식한 복막에서의 implant 크기{염증 부위의 크기}를 확인하였다.

[117]

[118] [표 5]

[119]

	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주
안정화	v						
자궁내막증 유도 surgical		v					
약물투여			v	v	v	v	
부검							v

[120]

[121] 또한, 비클(Vehicle) 투여군은, 추출물 대신 추출물을 녹이기 위한 용매를 체중에 비례하여 투여한 것을 제외하고 용규 추출물 투여군과 동일하게 처리하였다. 추출물은 10% Tween 80으로 녹였다. 또한, 양성 대조군(Positive control)은 용규 추출물 대신 dienogest를 0.3mg/kg 투여한 것을 제외하고, 용규 추출물 투여군과 동일하게 처리하였다.

[122] 그 결과, 용규 70% 에탄올 추출물이 자궁내막증 조직형성 억제 효과가 있는 것으로 확인하였다(도 9 참조).

[123] 도 9는 용규 알콜 추출물의 수술유도모델에서 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도로, 도 9의 x축에서 비클은 비클투여군을, 양성대조군은 dienogest 투여군을, 용규 100mg/kg는 용규 추출물 100mg/kg 투여군을 나타내고, y축은 임플란트(implant) 크기를 나타낸다. 도에서와 같이, 용규 70부피% 에탄올 추출물이 100mg/kg에서도, 효과적으로 자궁내막증 조직형성 억제 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[124] 이와 같은 결과로부터, 용규 알코올 추출물의 자궁내막증 또는 이의 합병증을 치료, 개선 또는 예방 효과를 확인할 수 있다.

[125]

[126] <실시에 2> 용규 부탄올분획 추출물의 자궁내막증 및 합병증 치료, 개선 또는 예방 효과 확인

[127] 2-1. 용규 부탄올분획 추출물의 준비

[128] 1-1.과 동일한 방법으로 준비한 70%에탄올 추출물 1kg의 계통적인 분획을 통하여 노말헥산 분획, 디클로로메탄 분획, 에틸아세테이트 분획, 부탄올 분획, 그리고 물층으로 나누는 방법에 의해, 용규 부탄올분획 추출물을 준비하였다. 구체적으로, 분말상태의 추출물 1kg에 물 4L를 가하고, 물이 가해진 알콜 추출물을 n-헥산 20L로 분획추출하고, n-헥산 분획을 따로 취하고, 남은 수층을 디클로로메탄 20L로 분획추출하여 디클로로메탄 분획을 따로 취하고, 남은

수층을 에틸아세테이트 40L로 분획추출하여, 에틸아세테이트 분획을 따로 취하고, 남은 수층을 부탄올 40L로 분획추출하여, 부탄올 분획을 얻고, 이와 같은 과정에 의해 얻어진 부탄올 분획을 감압농축하고, 농축액을 동결건조하여 분말상태의 용규 70% 에탄올 추출물 중 부탄올 분획 추출물 141g을 얻었다. 또한, 부탄올 분획추출 후 남은 물층을 따로 얻었다.

[129]

[130] 2-2. 세포이동 및 부착 관련 효소 발현 억제 효과 확인

[131] 용규 70부과% 에탄올 추출물 25 ug/mL, 50 ug/mL, 또는 100 ug/mL 대신, 2-1.의 용규 부탄올분획 추출물 0.5 ug/mL, 1 ug/mL, 또는 2 ug/mL을 사용한 것을 제외하고, 실시예 1-2.과 동일하게 실시하였다.

[132] 그 결과, 자궁내막증에서 발현되는 대표적인 단백질이며, 세포의 이동과 침투에 중요한 역할을 하는 내인성 MMP-2 및 MMP-9의 mRNA 발현을 용규 70% 에탄올 추출물의 부탄올분획추출물이 억제함을 자궁내막증 세포인 12Z 세포에서 확인하였다(도 10, 도 11 참조).

[133] 도 10은 용규 부탄올분획추출물의 MMP-2 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이고, 도 11은 용규 부탄올분획추출물의 MMP-9 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도로, 도 10과 도 11의 x축에서 con은 대조군을, 0.5는 용규 부탄올분획추출물 0.5ug/mL 투여군을 나타내고, 도 10의 y축은 MMP-2 mRNA의 상대적 수준(Relative levels of MMP-2 mRNA)을 나타내며, 도 11의 y축은 MMP-9 mRNA의 상대적 수준(Relative levels of MMP-9 mRNA)을 나타낸다. 도에서와 같이, 용규 부탄올분획추출물이 0.5ug/mL의 농도에서도, 효과적으로 MMP-2와 MMP-9 발현을 억제함을 알 수 있다.

[134]

[135] 2-3. 염증 및 통증 관련 효소 발현 억제 효과 확인

[136] 용규 70% 에탄올 추출물 25 ug/mL, 50 ug/mL, 또는 100 ug/mL 대신, 2-1.의 용규 부탄올분획 추출물 0.5 ug/mL, 1 ug/mL, 또는 2 ug/mL을 사용한 것을 제외하고, 실시예 1-3.과 동일하게 실시하였다.

[137] 그 결과, 자궁내막증 세포의 통증 관련 특징적 효소인 COX-2의 mRNA 발현을 용규 부탄올분획 추출물이 억제함을 자궁내막증 세포인 12Z 세포에서 확인하였다(도 12 참조).

[138] 도 12는 용규 부탄올분획추출물의 COX-2 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도로, 도 12의 x축에서 con은 대조군을, 0.5는 용규 부탄올분획추출물0.5ug/mL 투여군을 나타내고, y축은 COX-2 mRNA의 상대적 수준(Relative levels of COX-2 mRNA)을 나타낸다.도에서와 같이, 용규 부탄올분획추출물이 0.5ug/mL의 농도에서도, 효과적으로 COX-2 발현을 억제함을 알 수 있다.

[139]

[140] 2-4. 염증성 사이토카인 발현 억제 효과 확인

- [141] 용규 70% 에탄올 추출물 25 ug/mL, 50 ug/mL, 또는 100 ug/mL 대신, 2-1.의 용규 부탄올분획 추출물 0.5 ug/mL, 1 ug/mL, 또는 2 ug/mL을 사용한 것을 제외하고, 실시예 1-4.과 동일하게 실시하였다.
- [142] 그 결과, 자궁내막증 세포의 염증 관련 사이토카인인 TNF-알파 및 MCP-1의 mRNA 발현을 용규 부탄올분획 추출물이 억제함을 자궁내막증 세포인 12Z 세포에서 확인하였다(도 13, 도 14 참조).
- [143] 도 13은 용규 부탄올분획 추출물의 TNF-알파 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이고, 도 14는 용규 부탄올분획 추출물의 MCP-1 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도로, 도 13과 도 14의 x축에서 con은 대조군을, 0.5는 용규 부탄올분획 추출물 0.5ug/mL 투여군을 나타내고, 도 13의 y축은 TNF-알파 mRNA의 상대적 수준(Relative levels of TNF-a mRNA)을 나타내며, 도 14의 y축은 MCP-1 mRNA의 상대적 수준(Relative levels of MCP-1 mRNA)을 나타낸다. 도에서와 같이, 용규 부탄올분획 추출물이 0.5ug/mL의 농도에서도, 효과적으로 TNF-알파 및 MCP-1 발현을 억제함을 알 수 있다.
- [144]
- [145] 2-5. 자궁내막증 세포 부착 및 착상 억제 효과 확인
- [146] 50 ug/mL, 100 ug/mL, 또는 200 ug/mL 의 용규 70% 에탄올 추출물 대신, 2-1.의 용규 부탄올분획 추출물 0.5 ug/mL, 1 ug/mL, 또는 2 ug/mL을 사용한 것을 제외하고, 실시예 1-5.과 동일하게 실시하였다.
- [147] 그 결과, 용규 부탄올분획 추출물을 처리한 자궁내막증 세포 12Z가, 복막 및 복강 주위 장기의 외부를 둘러싼 Met-5A 세포에 부착 억제하는 것을 확인하였다(도 15 참조).
- [148] 도 15는 용규 부탄올분획 추출물의 자궁내막증 세포 부착 및 착상 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도로, 도 15의 x축에서 con은 대조군을, 1은 용규부탄올분획 추출물 1ug/mL 투여군을 나타내고, y축은 부착세포(Attachment cells)의 비율{광학밀도(Optical Density; OD) 비율, %}을 나타낸다. 도에서와 같이, 용규부탄올분획 추출물이 낮은 농도에서도, 효과적으로 세포 부착을 억제함을 알 수 있다.
- [149] 이와 같은 결과로부터, 용규 부탄올분획 추출물이 자궁내막증 또는 이의 합병증을 치료, 개선 또는 예방하는 효과가 있음을 확인할 수 있다.
- [150]
- [151] <실시예 3> 용규 분획 추출물의 자궁내막증 및 합병증 치료, 개선 또는 예방 효과 확인
- [152] 3-1. 용규 분획 추출물의 준비
- [153] 1-2.의 분획 추출법과 동일한 방법으로 얻어진, 노말헥산 분획, 디클로로메탄 분획, 에틸아세테이트 분획, 및 부탄올 분획추출 후 남은 물층 각각을 감압농축하고, 농축액을 동결건조하여 용규 70% 에탄올 추출물 중 노말헥산 분획 추출물, 디클로로메탄 분획 추출물, 에틸아세테이트 분획 추출물, 및 물층

추출물을 각각 분말상태로 105g, 16g, 36g, 477g 얻었다.

[154]

[155] 3-2. 세포이동 및 부착 관련 효소 발현 억제 효과 확인

[156] 용규 부탄올분획 추출물 대신, 표 6 또는 표 7에 기재된 분획추출물을 사용한 것을 제외하고, 실시예 2-2.과 동일하게 실시하였다.

[157] 그 결과를 표 6과 표 7에 나타내었으며, 표 6은 MMP-2에 대한 결과이고, 표 7은 MMP-9에 대한 결과를 나타낸다.

[158] [표 6]

[159]

MMP-2	평균
물분획(50ug/mL)	60.30
물분획대조군	100
헥산분획(5.0ug/mL)	95.31
헥산분획대조군	100
디클로로메탄분획(2.5ug/mL)	88.61
디클로로메탄분획대조군	99.99

[160]

[161] [표 7]

[162]

MMP-9	평균
물분획(50ug/mL)	28.08
물분획대조군	100
에틸아세테이트분획(1ug/mL)	59.51
에틸아세테이트분획대조군	100
헥산분획(5ug/mL)	23.31
헥산분획대조군	99.99
디클로로메탄분획(2.5ug/mL)	36.17
디클로로메탄분획대조군	100

[163]

[164] 그 결과, 각각의 분획 추출물이 MMP-2 및/또는 MMP-9 발현을 억제함을 알 수 있다.

[165]

[166] 3-3. 염증 및 통증 관련 효소 발현 억제 효과 확인

[167] 용규 부탄올분획 추출물 대신, 표 8에 기재된 분획추출물을 사용한 것을 제외하고, 실시예 2-3.과 동일하게 실시하였다.

[168] 그 결과를 표 8에 나타내었다. 그 결과, 자궁내막증 세포의 통증 관련 특징적 효소인 COX-2의 mRNA 발현을 각 분획 추출물이 억제함을 알 수 있다.

[169]

[170] [표 8]

[171]

COX-2	평균
물분획(50ug/mL)	38.59
물분획대조군	99.99
헥산분획(5ug/mL)	97.97
헥산분획대조군	100

[172]

[173] 3-4. 염증성 사이토카인 발현 억제 효과 확인

[174] 용규 부탄올분획 추출물 대신, 표 9 또는 표 10에 기재된 분획 추출물을 사용한 것을 제외하고, 실시예 2-4.과 동일하게 실시하였다.

[175] 그 결과를 표 9와 표 10에 나타내었으며, 표 9는 TNF-알파에 대한 결과이고, 표 10의 MCP-1에 대한 결과이다. 그 결과, 자궁내막증 세포의 염증 관련 사이토카인인 TNF-알파 및 MCP-1의 mRNA 발현을 각각의 분획 추출물이 억제함을 알 수 있다.

[176] [표 9]

[177]

TNF-a	평균
헥산분획(5ug/mL)	68.38
헥산분획대조군	99.99
디클로로메탄분획(2.5ug/mL)	68.90
디클로로메탄분획대조군	99.99

[178]

[179] [표 10]

[180]

MCP-1	평균
물분획(50ug/mL)	75.96
물분획대조군	100
에틸아세테이트분획(1ug/mL)	81.35
에틸아세테이트분획대조군	100
헥산분획(2.5ug/mL)	66.88
헥산분획대조군	100
디클로로메탄분획(2.5ug/mL)	98.45
디클로로메탄분획대조군	100

[181]

[182] 이와 같은 결과로부터, 용규 분획 추출물이 자궁내막증 및 합병증의 치료, 개선 또는 예방에 효과적임을 확인할 수 있다.

[183]

[184] <실시에 4> 용규 물추출물의 자궁내막증 및 합병증 치료, 개선 또는 예방 효과 확인

[185] 4-1. 용규 물추출물의 준비

[186] 음건된 용규(*Solanum nigrum*, 산지: 경상북도 영천)를 경동시장(대한민국)에서 구입하였고, 용규 전초를 분쇄하였다. 이와 같이 준비된 용규 500g에 3차 증류수 1리터를 넣고 3시간동안 약탕기를 이용하여 추출하였다. 추출액을 여과지를 이용하여 여과한 후 48시간 동결건조하여 분말상태의 용규 물 추출물을 얻었다.

[187]

[188] 4-2. 세포이동 및 부착 관련 효소 발현 억제 효과 확인

[189] 용규 70부피% 에탄올 추출물 25 ug/mL, 50 ug/mL, 또는 100 ug/mL 대신, 4-1.의 용규 물추출물 100 ug/mL을 사용한 것을 제외하고, 실시예 1-2.과 동일하게 실시하였다.

[190]

그 결과, 자궁내막증에서 발현되는 대표적인 단백질이며, 세포의 이동과 침투에 중요한 역할을 하는 내인성 MMP-2의 mRNA 발현을 용규 물추출물이 억제함을 자궁내막증 세포인 12Z 세포에서 확인하였다(도 16 참조).

[191]

도 16은 용규 물추출물의 MMP-2 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도로, 도 16의 x축에서 con은 대조군을, 100ug/ml은 용규 물추출물 100ug/mL 투여군을 나타내고, y축은 MMP-2 mRNA의 상대적 수준(Relative levels of MMP-2 mRNA)을 나타낸다. 도에서와 같이, 용규 물추출물이 효과적으로 MMP-2 발현을 억제함을 알 수 있다.

[192]

- [193] 4-3. 염증 및 통증 관련 효소 발현 억제 효과 확인
- [194] 용규 70% 에탄올 추출물 25 ug/mL, 50 ug/mL, 또는 100 ug/mL 대신, 4-1.의 용규 물추출물 100 ug/mL을 사용한 것을 제외하고, 실시예 1-3.과 동일하게 실시하였다.
- [195] 그 결과, 자궁내막증 세포의 통증 관련 특징적 효소인 COX-2의 mRNA 발현을 용규 물추출물이 억제함을 자궁내막증 세포인 12Z 세포에서 확인하였다(도 17 참조).
- [196] 도 17은 용규 물추출물의 COX-2 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도로, 도 17의 x축에서 con은 대조군을, 100ug/ml은 용규 물추출물 100ug/mL 투여군을 나타내며, y축은 COX-2 mRNA의 상대적 수준(Relative levels of COX-2 mRNA)을 나타낸다. 도에서와 같이, 용규 물추출물이 효과적으로 COX-2 발현을 억제함을 알 수 있다.
- [197]
- [198] 4-4. 염증성 사이토카인 발현 억제 효과 확인
- [199] 용규 70% 에탄올 추출물 25 ug/mL, 50 ug/mL, 또는 100 ug/mL 대신, 4-1.의 용규 물추출물 100 ug/mL을 사용한 것을 제외하고, 실시예 1-4.과 동일하게 실시하였다.
- [200] 그 결과, 자궁내막증 세포의 염증 관련 사이토카인인 TNF-알파 및 MCP-1의 mRNA 발현을 용규 물추출물이 억제함을 자궁내막증 세포인 12Z 세포에서 확인하였다(도 18, 도 19 참조).
- [201] 도 18은 용규 물추출물의 TNF-알파 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이고, 도 19는 용규 물추출물의 MCP-1 발현 억제 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도로, 도 18과 도 19의 x축에서 con은 대조군을, 100ug/ml은 용규 물추출물 100ug/mL 투여군을 나타내고, 도 18의 y축은 TNF-알파 mRNA의 상대적 수준(Relative levels of TNF- α mRNA)을 나타내며, 도 19의 y축은 MCP-1 mRNA의 상대적 수준(Relative levels of MCP-1 mRNA)을 나타낸다. 도에서와 같이, 용규 물추출물이 효과적으로 TNF-알파 및 MCP-1 발현을 억제함을 알 수 있다.
- [202]
- [203] 이와 같은 결과로부터, 용규 물추출물이 자궁내막증 및 합병증의 치료, 개선 또는 예방에 효과적임을 확인할 수 있다.
- [204] 따라서, 용규 추출물은 세포이동 및 부착 관련 효소 발현 억제, 염증 및 통증 관련 효소 발현 억제, 염증성 사이토카인 발현 억제, 자궁내막증세포 이동 억제, 자궁내막증 세포 부착 및/또는 착상 억제 등에 의해, 자궁내막증 또는 그 합병증의 치료, 개선 및/또는 예방 효과가 있음을 알 수 있다.
- [205]
- [206] <제조예 1> 약학 조성물의 제조
- [207] 실시예 1-1 ~ 실시예 4-1에 기재된 방법 중 어느 하나와 동일한 방법으로 준비한

용규 추출물 300mg, 옥수수 전분 100mg, 유당 100mg, 스테아린산 마그네슘 2mg을 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[208] <제조예 2> 식품 조성물의 제조

[209] 실시예 1-1 ~ 실시예 4-1에 기재된 방법 중 어느 하나와 동일한 방법으로 준비한 용규 추출물(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.

산업상 이용가능성

[210] 본 발명에 의해 자궁내막증 또는 이의 합병증을 효과적으로 치료, 개선 및/또는 예방할 수 있으므로, 산업상 이용가능성이 있다.

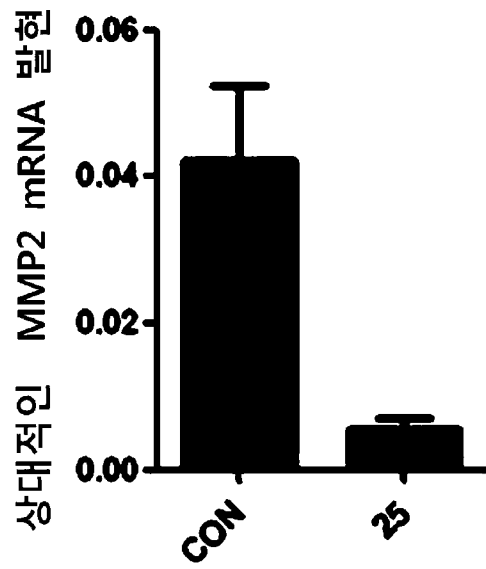
청구범위

- [청구항 1] 용규 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 자궁내막증 또는 이의 합병증 치료 또는 예방용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 첨가제를 더 포함하고, 상기 용규 추출물 및 상기 첨가제로 이루어진 약학 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 자궁내막증 또는 이의 합병증은 MMP-2, MMP-9, COX-2, TNF알파, 또는 MCP-1 중에서 선택된 하나 이상의 과발현에서 기인하는 것인 약학 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 합병증은 골반염, 골반유착, 난소낭종, 자궁근종, 자궁외임신 및 불임으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 약학 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 용규 추출물은 상기 용규를 용매로 추출한 용매추출물로, 상기 용매는 물, 알코올, 또는 그 혼합물 중에서 선택된 하나 이상인 약학 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 용매는 70부피% 에탄올인 약학 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 용규 추출물은 상기 용규를 70부피%에탄올로 추출한 70부피%에탄올추출물을 부탄올로 분획추출한 부탄올분획추출물인 약학 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 부탄올분획추출물은
(A) 용규를 70부피%에탄올로 추출한 70부피%에탄올추출물을 준비하는 단계;
(B) 상기 (A)단계의 70부피%에탄올추출물에 물을 가하는 단계;
(C) 상기 (B)단계의 물이 가해진 70부피%에탄올추출물을 n-헥산으로 분획추출하는 단계;
(D) 상기 (C)단계의 n-헥산 분획을 제거하고 남은 수층을 디클로로메탄으로 분획추출하는 단계;
(E) 상기 (D)단계의 디클로로메탄 분획을 제거하고 남은 수층을 에틸아세테이트로 분획추출하는 단계; 및
(F) 상기 (E)단계의 에틸아세테이트 분획을 제거하고 남은 수층을 부탄올로 분획추출하는 단계에 의해 수득한 분획추출물인 약학 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 치료 또는 예방은 자궁내막증 세포의 부착 또는 이동 억제에 의한 것인 약학 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 부착 또는 이동 억제는 MMP-2 또는 MMP-9 중에서 선택된 하나 이상의 발현 억제에 의한 것인 약학 조성물.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 치료 또는 예방은 염증 및 통증 관련 효소 발현 억제 또는 염증성 사이토카인 발현 억제 중에서 선택된 하나 이상에 의한 것인

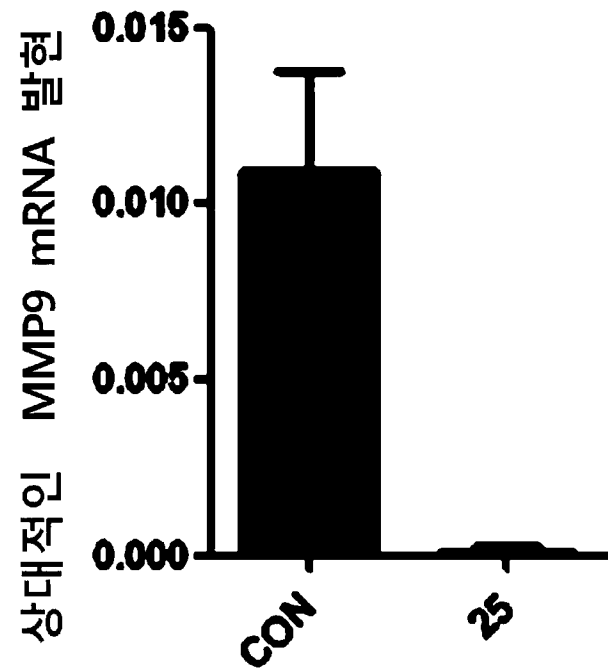
약학 조성물.

- [청구항 12] 용규 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 자궁내막증 또는 이의 합병증 개선 또는 예방용 식품 조성물.
- [청구항 13] 용규 추출물의 자궁내막증 또는 이의 합병증의 치료 또는 예방용 제제 제조를 위한 용도.
- [청구항 14] 용규 추출물 투여를 필요로 하는 인간을 포함한 포유류에게 용규 추출물을 투여하는 단계를 포함하는 자궁내막증 또는 이의 합병증의 치료, 또는 예방법.

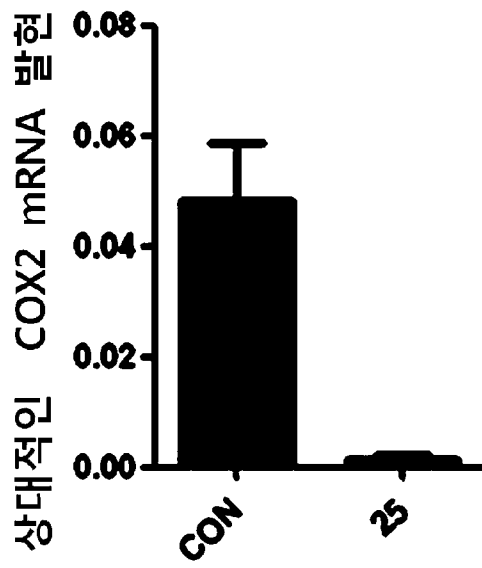
[도1]



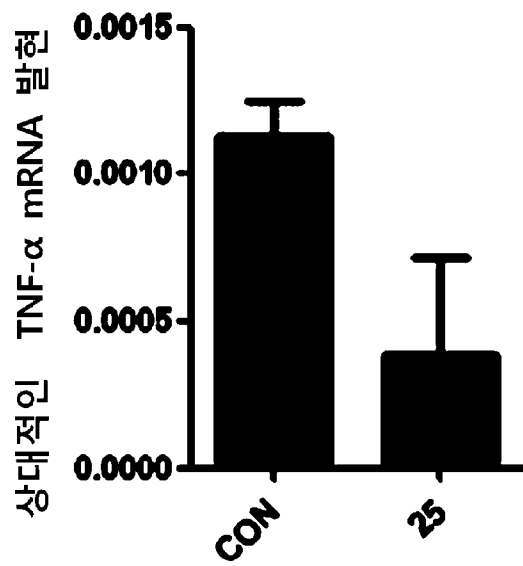
[도2]



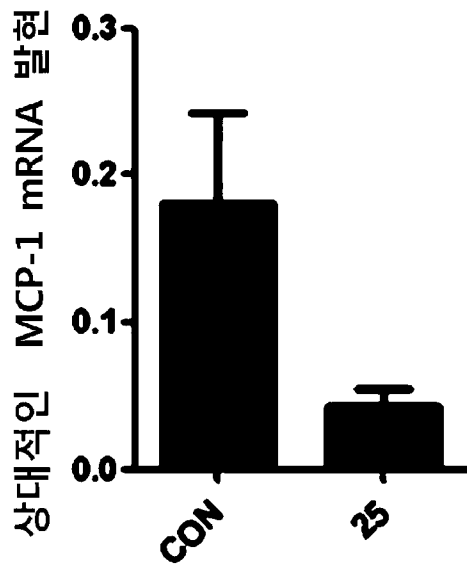
[도3]



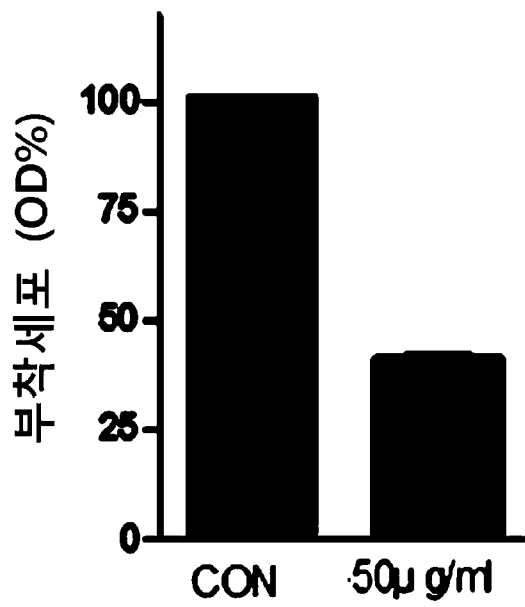
[도4]



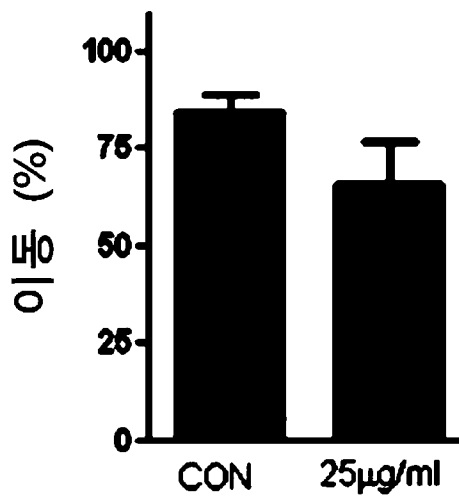
[도5]



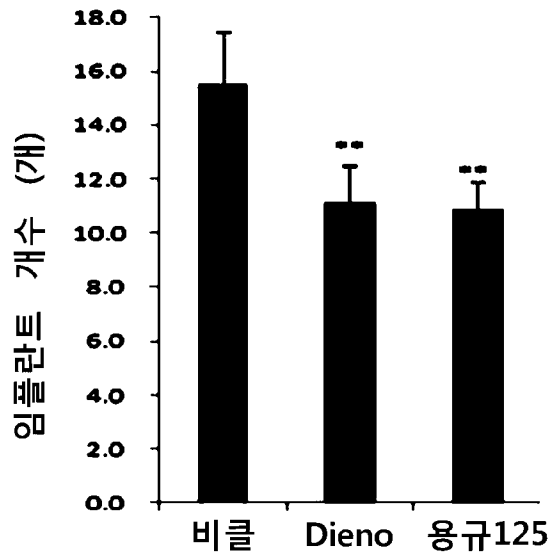
[도6]



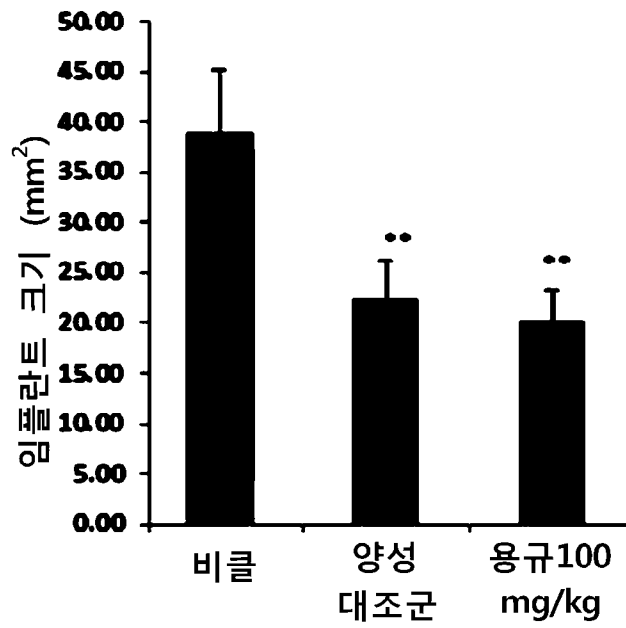
[도7]



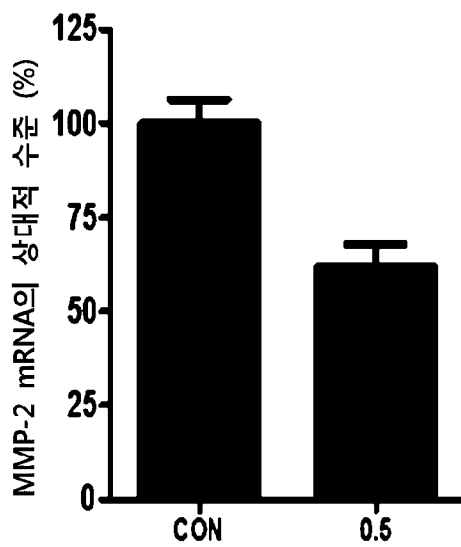
[도8]



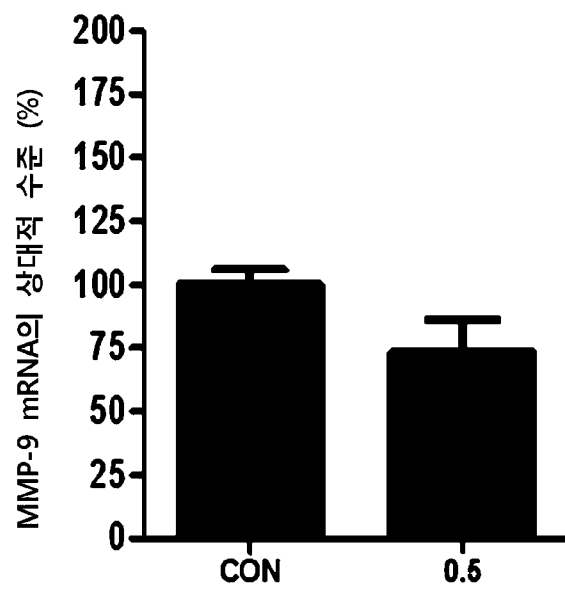
[도9]



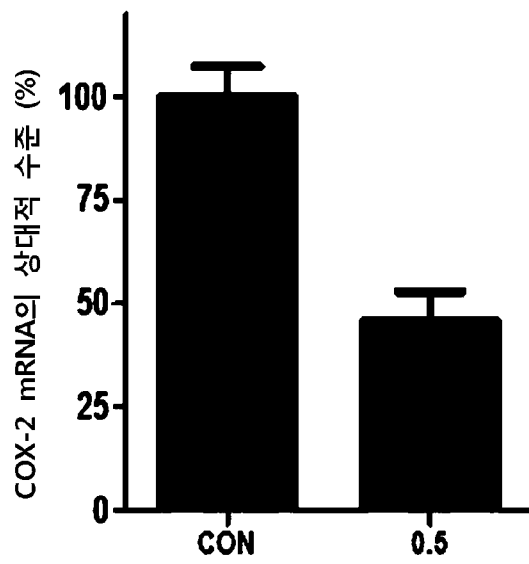
[도10]



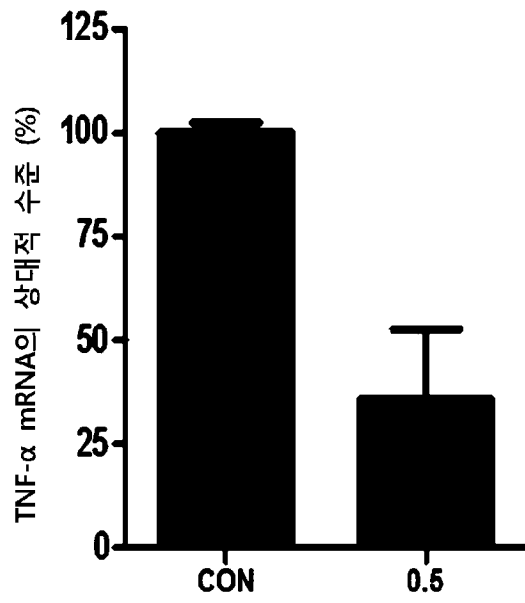
[도11]



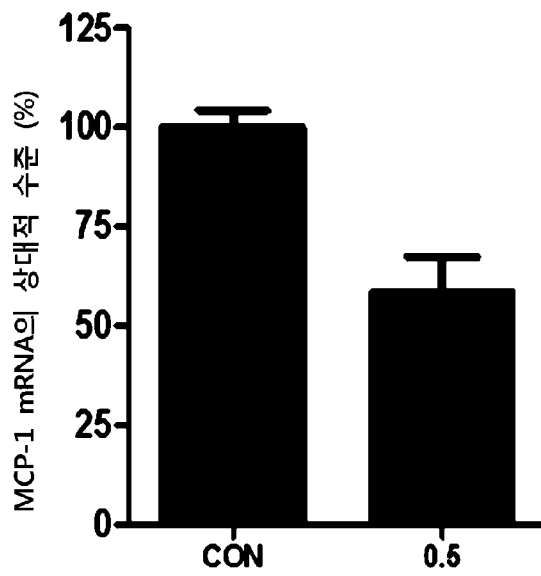
[도12]



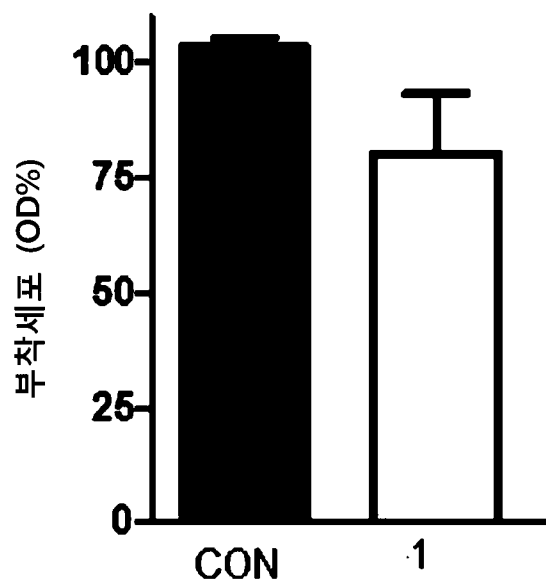
[도13]



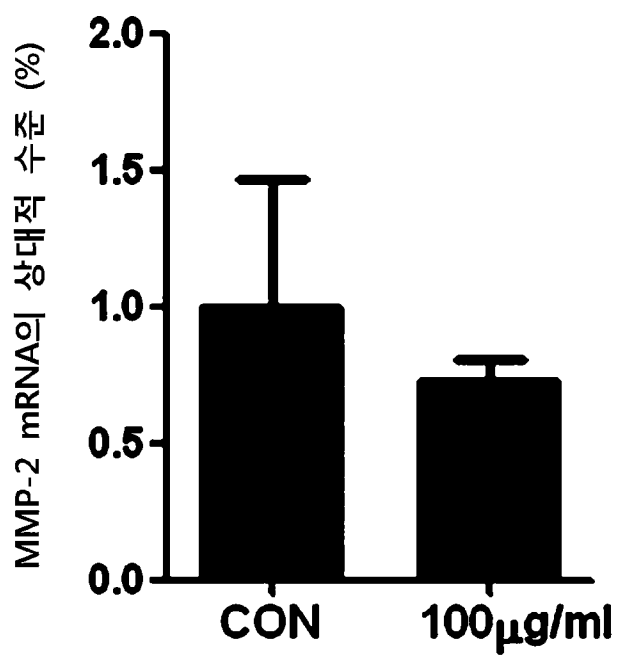
[도14]



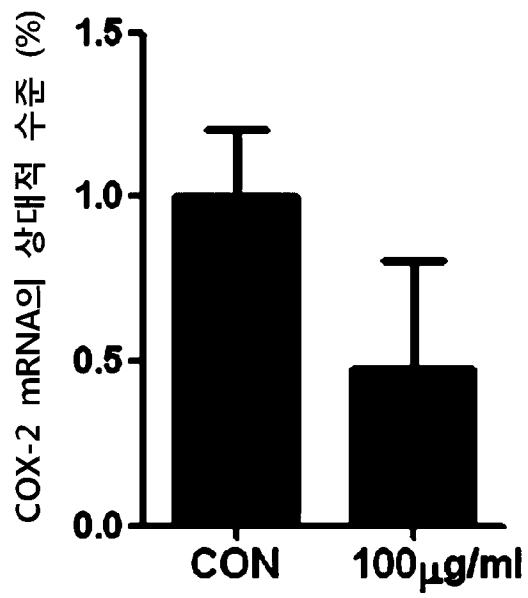
[도15]



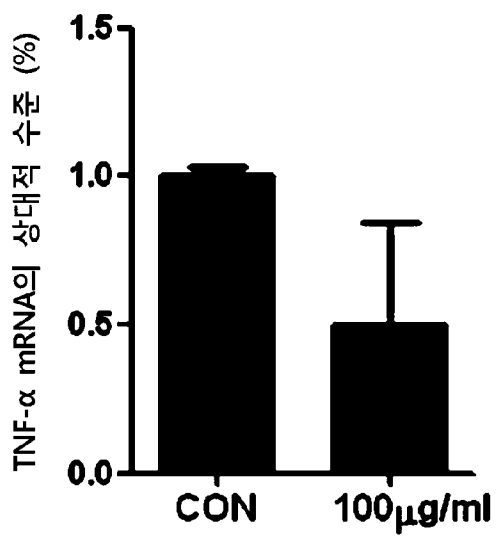
[도16]



[도17]



[도18]



[도19]

