



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0036547
(43) 공개일자 2017년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/288 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/288 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0135866
(22) 출원일자 2015년09월24일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
주식회사 대웅제약
경기 성남시 중원구 갈마치로 244, (상대원동)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경
희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
최정혜
서울특별시 성동구 독서당로 175, 104동 1902호(
옥수동, 극동그린아파트)
조윤진
서울특별시 강북구 한천로105길 23, 113동 501호
(번동, 주공아파트1단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유지열, 이승열

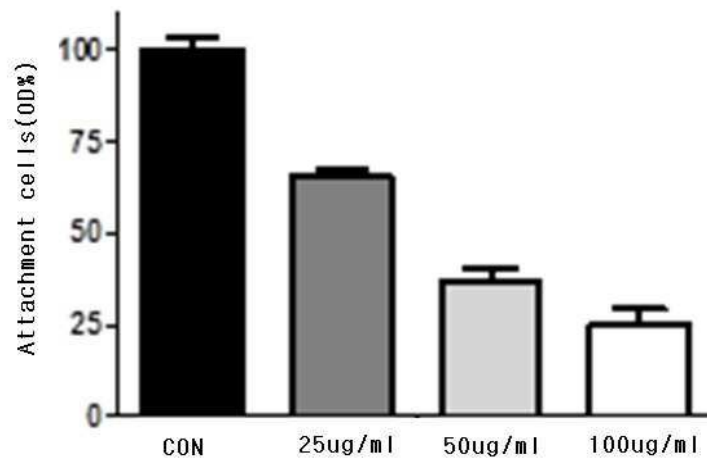
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 포공영 알콜추출물의 신규 용도

(57) 요약

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

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A23V 2200/30 (2013.01)

(72) 발명자

류효정

인천광역시 연수구 신송로 118번길 6, 103동 1502
호(송도동, 푸립아이원)

강희철

대전광역시 중구 목동로 37,106동 401호(목동, 목
양마을아파트)

김진표

대전광역시 서구둔산로 201, 205동 603호(둔산동,
국화아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

포공영 알콜추출물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 알콜추출물은 상기 포공영을 알콜 또는 알콜수용액으로 추출한 추출물인 자궁내막증 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 알콜은 탄소수 1 내지 5개의 알콜 중 선택된 하나 이상의 저급알콜인 자궁내막증 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 치료 또는 예방은 자궁내막증 세포 이동 억제, 자궁내막증 세포 부착 또는 착상 억제, 또는 자궁내막증 조직형성 억제 중에서 선택된 하나 이상에 의한 자궁내막증 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 치료 또는 예방은 자궁내막증 세포의 세포 이동 또는 부착 관련 효소의 발현 억제에 의한 자궁내막증 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 자궁내막증 세포의 세포 이동 또는 부착 관련 효소는 MMP-2, 또는 MMP-9 중에서 선택된 하나 이상인 자궁내막증 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 7

포공영 알콜추출물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 개선 또는 예방용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 포공영 알콜추출물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 포공영 알콜추출물의 신규 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[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 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.

[0006] 따라서 여성, 특히 가임기 여성들에게 침습적인(invasive) 수술요법 등이 아닌 자연적이면서도 부작용이 낮은

새로운 개념의 자궁내막증 예방, 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

- [0007] 한편, 포공영은 민들레의 전초로, 포공영을 열수로 추출한 열수추출물이 자궁내막증에 효과를 나타낸다는 보고가 있다(대한한방부인과학회지, VOL.19. No.3 : 069-082 (2006)).

선행기술문헌

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) 대한한방부인과학회지, VOL.19. No.3 : 069-082 (2006)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방에 효과를 나타내는 추출물의 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 포공영(蒲公英, *Taraxaci Herba*) 알콜추출물이 자궁내막증의 치료, 개선 및/또는 예방에 우수한 효과를 나타냄을 알게 되어 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 본 발명은 포공영 알콜추출물의 자궁내막증 치료, 개선 및/또는 예방을 위한 의약 및/또는 식품 용도를 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 포공영 알콜추출물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.
- [0014] 상기 알콜추출물은 상기 포공영을 알콜 또는 알콜수용액으로 추출한 추출물일 수 있다.
- [0015] 상기 알콜은 순도 99부피% 이상의 알콜일 수 있다.
- [0016] 상기 알콜수용액은 알콜 함량 30 내지 99.98부피%의 알콜수용액일 수 있다.
- [0017] 또한, 상기 알콜수용액은 알콜 함량 30 내지 70부피%, 또는 70 내지 99.98부피%의 알콜수용액일 수 있다. 이와 같은 범위에서, 자궁내막증에 보다 효과적일 수 있다.
- [0018] 상기 알콜은 저급알콜일 수 있으며, 탄소수 1 내지 5개의 알콜 중 선택된 하나 이상의 저급알콜일 수 있다. 이와 같은 범위에서, 자궁내막증에 보다 효과적일 수 있다.
- [0019] 상기 알콜은 에탄올일 수 있다.
- [0020] 상기 치료 또는 예방은 자궁내막증 세포 이동 억제, 자궁내막증 세포 부착 또는 착상 억제, 또는 자궁내막증 조직형성 억제 중에서 선택된 하나 이상에 의할 수 있다.
- [0021] 또한, 상기 치료 또는 예방은 자궁내막증 세포의 세포 이동 또는 부착 관련 효소의 발현 억제에 의할 수 있다.
- [0022] 상기 자궁내막증 세포의 세포 이동 또는 부착 관련 효소는 MMP-2, 또는 MMP-9 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0023] 상기 포공영은 민들레의 전초일 수 있으며, 건조 등에 의해 가공된 것일 수 있다. 상기 민들레는 *Taraxacum platycarpum* H. Dahlstedt 또는 기타 동속식물(국화과 Compositae)을 포괄한다. 일 예로, 포공영은 대한민국약전외한약(생약)규격집에 기재된 것일 수 있다. 대한민국약전외한약(생약)규격집에는 포공영이 민들레 *Taraxacum platycarpum* H. Dahlstedt, 서양민들레 *Taraxacum officinale* Weber, 털민들레 *Taraxacum mongolicum* Handel-Mazzetti, 또는 흰민들레 *Taraxacum coreanum* Nakai(국화과 Compositae)의 전초로 기재되어 있다. 상기 포공영은 시판되거나 직접 채취한 것일 수 있다.

- [0024] 또한, 본 발명은 포공영 알콜추출물을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 개선 또는 예방용 식품 조성물을 제공한다.
- [0025] 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.
- [0026] 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, 결절셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다. 또한, 상기 식품조성물은 식품첨가제 등을 포함하는 의미이다.
- [0027] 본 발명은 또한 포공영 알콜추출물 투여를 필요로 하는 인간을 포함한 포유류에게 투여하는 단계를 포함하는 자궁내막증 치료 또는 예방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 포공영 알콜추출물의 자궁내막증 치료 또는 예방용 제제 제조를 위한 용도를 제공한다. 상기 투여되는 포공영 알콜추출물은 유효량의 포공영 알콜추출물일 수 있다.
- [0028] 별도의 언급이 없는 한, 본 발명의 약학 조성물, 식품조성물, 방법, 및 용도에서 언급된 사항은 서로 모순되지 않는 한 각각 동일하게 적용된다.
- [0029] 상기 포공영알콜추출물 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, 붕해제, 계면활성제, 희석제, 또는 부형제를 사용할 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 사용될 수 있다. 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.
- [0030] 본 발명의 조성물에 포함되거나, 용도 또는 방법 중 사용되는 포공영 알콜추출물은 성인 여성 기준으로 1일 0.0001 ~ 1000 mg/kg, 바람직하게는 0.0001 ~ 100 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.001 ~ 10mg/kg의 용량으로 사용 가능하다. 투여는 하루에 한번 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 본 발명의 범주는 상기 투여량 및 투여횟수에 의해 제한되지 않는다.
- [0031] 본 발명의 조성물은 상기 유효성분을 조성물 총 중량에 대하여 0.1~99.9중량% 함유할 수 있다.
- [0032] 상기 포공영 알콜추출물은 약학적으로 또는 식품학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제 등의 첨가제를 첨가하여 제제화할 수 있으며, 제제화에 관한 내용은 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA 등의 문헌을 참조할 수 있다.
- [0033] 따라서, 본 발명의 조성물은, 약제학적으로 허용되는 첨가제 또는 식품학적으로 허용되는 첨가제를 더 포함하고, 상기 유효성분 및 상기 약제학적으로 허용되는 첨가제 또는 상기 식품학적으로 허용되는 첨가제로 이루어질 수 있다.

발명의 효과

- [0034] 본 발명에 의해 자궁내막증을 효과적으로 치료, 개선 및/또는 예방할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1은 포공영 알콜추출물의 자궁내막증 세포의 세포 이동 또는 부착 억제 효과 확인 실험결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 포공영 알콜추출물의 자궁내막증 세포의 세포 이동 또는 부착 억제 효과 확인 실험결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 포공영 알콜추출물의 자궁내막증 세포의 세포 이동 또는 부착 억제 효과 확인 실험결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 포공영 알콜추출물의 자궁내막증 세포 이동 억제 효과 확인 실험결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 5는 포공영 열수추출물의 자궁내막증 세포 이동 억제 효과 확인 실험결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 6은 포공영 알콜추출물의 자궁내막증 세포 부착 및 착상 억제 효과 확인 실험결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 7은 포공영 열수추출물의 자궁내막증 세포 부착 및 착상 억제 효과 확인 실험결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 8은 자궁내막증 동물모델에서의 포공영 알콜추출물이 나타내는 효과를 확인한 실험결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0036] 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.
- [0037] 자궁내막증의 특징인 자궁내막증 세포의 세포 이동 또는 부착 관련 효소 발현 변화, 자궁내막증 세포이동, 자궁내막증 세포 부착 및 착상에 포공영 알콜추출물이 미치는 영향을 확인함으로써, 포공영 알콜추출물이 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방 효과를 가짐을 아래와 같은 방법으로 확인하였다.
- [0038] 하기 실시예 및 비교예 중 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. 또한, 포공영은 대한민국약전외한약(생약)규격집에 수록된 것으로, 건조된 것을 경동시장(대한민국, 서울)에서 구입하였다.
- [0039] 또한, 하기 실시예 및 비교예에서 사용한 추출물은 다음과 같은 방법으로 준비하였다.
- [0040] <포공영 열수추출물 준비>
- [0041] 음건된 포공영을 약 400um 입자 사이즈가 되도록 분쇄하였다. 이와 같이 준비된 포공영 200g에 3차 증류수 1L를 가하고 섭씨 90도에서 3시간 환류하여 여액을 취하였고, 동일한 방법으로 1회 반복추출하였다. 추출한 여액을 섭씨 60도에서 감압농축하여 분말상태의 포공영 열수추출물 46g을 얻었다.
- [0043] <포공영 알콜추출물 준비>
- [0044] 음건된 포공영을 약 400um 입자 사이즈가 되도록 분쇄하였다. 이와 같이 준비된 포공영 200g에 30%(v/v) 에탄올 수용액 2L를 가하고 실온에서 24시간 동안 침지하여 여액을 취하였고 동일한 방법으로 1회 반복추출하였다. 추출한 여액을 섭씨 60도에서 감압농축하여 분말상태의 포공영 30% 에탄올 추출물 38g을 얻었다.
- [0045] 또한, 음건된 포공영을 약 400um 입자 사이즈가 되도록 분쇄하였다. 이와 같이 준비된 포공영 600g에 70%(v/v) 에탄올 수용액 6L를 가하고 실온에서 24시간 동안 침지하여 여액을 취하였고 동일한 방법으로 1회 반복추출하였다. 추출한 여액을 섭씨 60도에서 감압농축하여 분말상태의 포공영 70% 에탄올 추출물 84g을 얻었다.
- [0046] 또한, 음건된 포공영을 약 400um 입자 사이즈가 되도록 분쇄하였다. 이와 같이 준비된 포공영 200g에 99.98% 에탄올 2L를 가하고 실온에서 24시간 동안 침지하여 여액을 취하였고 동일한 방법으로 1회 반복추출하였다. 추출한 여액을 섭씨 60도에서 감압농축하여 연조엑스상태의 포공영 99.98% 에탄올 추출물 8g을 얻었다.
- [0048] <실시예 1> 포공영 알콜추출물의 자궁내막증 세포의 세포 이동 또는 부착 억제 효과 확인
- [0049] 포공영 알콜추출물이 MMP-2(matrix metalloproteinase-2) 및 MMP-9(matrix metalloproteinase-9)의 mRNA 발현을

억제하는지 확인하기 위하여, 실시간 PCR을 실시하였다. MMP-2 및 MMP-9은 자궁내막증 세포의 이동, 부착 및 침투에 중요한 역할을 하는 단백질 분해효소로 알려져 있기 때문이다.

[0050] 구체적으로, 자궁내막증세포인 12Z(epithelial endometriotic cells; Johann-Wolfgang-Goethe-Universitaet(Germany)의 Dr. Starzinski-Powitz 제공)에 포공영 30%에탄올 추출물, 70%에탄올 추출물, 99.98%에탄올 추출물 각각을 각각 50 ug/mL, 100 ug/mL, 200 ug/mL 24시간 처리한 후 12Z세포에서 TRIzol(Invitrogen Canada, Burlington, ON, Canada)을 사용하여 당 업계에 알려진 방법으로 총 RNA를 추출하여, 역전사중합효소연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)을 실시하여 first-strand DNA를 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 프라이머, MMP-9 프라이머 및 대조군인 GAPDH 프라이머들은 아래 표 1과 같으며, MMP-2, MMP-9의 Ct값의 평균은 트리플리케이트(triplicate) 측정으로 구하였고, 대조군인 GAPDH의 Ct값에 의해 보정하였다.

[0051] [표 1]

MMP-2	센스 프라이머	5'-CCGCAGTGACGGAAGATGT-3'	서열번호 1
	안티센스 프라이머	5'-CACTTGCGGTCGTCATCGTA-3'	서열번호 2
MMP-9	센스 프라이머	5'-GGACGATGCCTGCAACGT-3'	서열번호 3
	안티센스 프라이머	5'-CAAATACAGCTGGTTCCCAATCT-3'	서열번호 4
GAPDH	센스 프라이머	5'-GGGGCTCTCCAGAACATCAT-3'	서열번호 5
	안티센스 프라이머	5'-CAGGTCAGGTCCACCACTGA-3'	서열번호 6

[0052]

[0053] 그 결과를 도 1 내지 도 3에 정리하였다. 도 1 내지 도 3은 포공영 알콜추출물의 자궁내막증 세포의 세포 이동 또는 부착 억제 효과 확인 실험결과를 나타낸 그래프이다. 도 1은 30% 에탄올 추출물에 대한 결과, 도 2는 70% 에탄올 추출물에 대한 결과, 도 3은 99.98% 에탄올 추출물에 대한 결과이다. 각각의 도에서 위의 그래프는 MMP-2에 대한 결과이고, 아래의 그래프는 MMP-9에 대한 결과를 나타낸다. 각각의 그래프에서 x축은 처리농도를 나타내고, y축은 상대적인 mRNA 발현정도(Relative mRNA expression)를 나타낸다. 또한, con은 대조군을 나타내며, 대조군은 알콜 추출물을 처리하지 않은 군을 나타낸다.

[0054] 도시된 바와 같이, 자궁내막증의 대표적인 발현단백질이며, 세포의 이동과 침투에 중요한 역할을 하는 내인성 MMP-2 및 MMP-9의 mRNA 발현을 포공영 알콜 추출물이 억제함을 확인할 수 있다.

[0055] 따라서, 포공영 알콜추출물이 자궁내막증 세포의 세포 이동 또는 부착 억제 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[0056] 이와 같은 결과로부터, 포공영 알콜추출물은 자궁내막증의 치료, 예방 및/또는 개선에 효과적임을 알 수 있다.

[0058] <실시예 2> 포공영 알콜추출물의 자궁내막증 세포이동 억제 효과 확인

[0059] 포공영 알콜추출물이 자궁내막증 세포의 이동에 미치는 영향을 확인하기 위하여 트랜스웰-이동 분석(transwell-migration assay)을 3번 반복 수행하였다.

[0060] 구체적으로, 24웰-트랜스웰 플레이트(8um pore size)에 자궁내막증 세포인 12Z 세포를 트랜스웰 플레이트의 윗부분(upper part)에 분주한 후, 포공영 70%에탄올 추출물을 50 ug/mL 처리하였다. 추출물 처리 16시간 후, 트랜스웰 바깥쪽 면의 막으로 이동한 세포들을 메탄올로 고정하여, 0.5% 크리스탈 바이올렛으로 10분간 염색하였다. 트랜스웰 바깥쪽 면으로 이동한 세포들을 200X 배율의 현미경으로 관찰하고 개수하여 전체 세포 대비 백분율을 계산하였다.

[0061] 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4는 포공영 알콜추출물의 자궁내막증 세포 이동 억제 효과 확인 실험결과를 나타내는 그래프로, x축은 농도를 나타내고, y축은 자궁내막증세포의 이동비율{migration(%) }을 상대적으로 나타낸다. CON은 대조군을 나타내며, 대조군은 알콜 추출물을 처리하지 않은 군을 나타낸다.

[0062] 도시된 바와 같이, 포공영 알콜추출물이 자궁내막증 세포의 이동을 억제함을 알 수 있다.

[0063] 이와 같은 결과로부터, 포공영 알콜추출물은 자궁내막증 세포이동을 억제하여, 자궁내막증의 치료, 예방 및/또는 개선에 효과적임을 알 수 있다. 특히, 비교예 1의 포공영 열수추출물에 비해 포공영 알콜추출물이 약 2배 이

상의 현저한 효과를 나타냄을 알 수 있다.

- [0065] <비교예 1> 포공영 열수추출물의 자궁내막증 세포이동 억제 효과 확인
- [0066] 포공영 알콜추출물 대신 포공영 열수추출물을 사용한 것을 제외하고, 실시예 2와 동일하게 실시하였다.
- [0067] 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5는 포공영 열수추출물의 자궁내막증 세포 이동 억제 효과 확인 실험결과를 나타내는 그래프로, x축은 농도를 나타내고, y축은 자궁내막증세포의 이동비율{migration(%)을 나타낸다. CON은 대조군을 나타내며, 대조군은 열수추출물을 처리하지 않은 군을 나타낸다.
- [0068] 도시된 바와 같이, 포공영 열수추출물 역시 자궁내막증 세포의 이동을 억제하나, 포공영 알콜추출물에 비해, 약 40-50% 정도의 효과를 나타냄을 알 수 있다.
- [0070] <실시예 3> 포공영 알콜추출물의 자궁내막증 세포 부착 및 착상 억제 효과 확인
- [0071] 포공영 알콜추출물이 자궁내막증 세포의 부착 및 착상에 미치는 영향을 확인하기 위하여 부착 분석(attachment assay)을 3번 반복 수행하였다.
- [0072] 구체적으로, 자궁내막증의 특징인 자궁내막증 세포가 복막 복강주위의 장기에 부착 및 착상하는 현상을 포공영 알콜추출물이 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. 그 후, 상기 Met-5A 세포를 96-웰 플레이트에 분주하였다. Cell tracker green CMFDA(5-Chloromethylfluorescein diacetate)로 표지한 자궁내막증 세포주인 12Z 세포(2X10³개/well)를 25 ug/mL, 50 ug/mL, 및 100 ug/mL의 포공영 99.98%에탄올 추출물을 함유한 DMEM/F12배지(Dulbeco's Modified Eagle's Medium/Ham's F-12 medium)와 섞은 후, 미리 분주해 놓은 Met-5A 세포에 첨가하였다. 섞인 상기 세포들은 섭씨 37도의 5% CO₂-인큐베이터에서 한시간 동안 배양한 후, 플레이트를 뒤집고 칼슘 및 마그네슘이 들어 있는 포스페이트-버퍼 용액(phosphate-buffered solution)으로 씻었다. 부착된 세포들을 490nm의 파장으로 분석하여, 대조군을 100%로 놓고 부착된 세포들의 백분율을 계산하였다.
- [0073] 그 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6은 포공영 알콜추출물의 자궁내막증 세포 부착 및 착상 억제 효과 확인 실험결과를 나타내는 그래프로, x축은 농도를 나타내고, y축은 세포부착(Attachment cells)의 상대적인 비율(OD; optical density, %)을 나타낸다. CON은 대조군을 나타내며, 대조군은 추출물을 처리하지 않은 군을 나타낸다.
- [0074] 도시된 바와 같이, 포공영 알콜 추출물을 처리한 자궁내막증 세포 12Z가 복막 및 복강 주위 장기의 외부를 둘러싼 Met-5A 세포에 부착억제되는 것이 확인되었다. 이와 같은 결과로부터, 포공영 알콜추출물은 자궁내막증 세포 부착 및 착상을 억제하여, 자궁내막증의 치료, 예방 및/또는 개선에 효과적임을 알 수 있다. 특히, 비교예 2의 포공영 열수추출물은 효과가 없었으나, 포공영 알콜추출물은 농도 의존적으로 효과를 나타내며, 50ug/mL에서 60% 이상의 우수한 억제효능을 나타냄을 확인하였다.
- [0076] <비교예 2> 포공영 열수추출물의 자궁내막증 세포 부착 및 착상 억제 효과 확인
- [0077] 포공영 알콜추출물 대신 포공영 열수추출물을 사용한 것을 제외하고, 실시예 3과 동일하게 실시하였다. 다만, 세포부착의 상대적인 값은 백분율로 환산하는 대신, 대조군의 값과 상대적인 비로 나타낸 점에 차이가 있다.
- [0078] 그 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7은 포공영 열수추출물의 자궁내막증 세포 부착 및 착상 억제 효과 확인 실험결과를 나타내는 그래프로, x축은 농도를 나타내고, y축은 세포부착(Attachment cells)의 상대적인 값을 나타낸다. CON은 대조군을 나타내며, 대조군은 추출물을 처리하지 않은 군을 나타낸다.
- [0079] 도시된 바와 같이, 포공영 열수추출물은 자궁내막증 세포의 부착 및 착상을 억제하는 효과가 전혀 없음을 알 수 있었다.

[0081] <실시예 4> 자궁내막증 동물모델에서의 포공영 알콜추출물 효과 확인

[0082] 포공영 알콜추출물이 복강투여(Intraperitoneal injection) 자궁내막증 유도 모델에서 나타내는 효과 확인을 위한 평가를 수행하였다.

[0083] 자궁내막증 유도는 Donor mouse에서 이식할 자궁을 적출하여 잘게 조각한 후 recipient mouse의 복강내로 spreading하여 유도하였고, 약물투여는 아래 표 2와 같으며, 시험약물로는 포공영 70%에탄올 추출물 250mg/kg을 경구로 5주간 투여하였다. 자궁내막증 유도된 동물모델을 희생시켜 복부를 개복하여 복막과 복강 내(소장, 대장, 위, 간, 방광, 난소 등)의 implantation 수를 확인하였다. 알콜 추출물 투여시 담체(vehicle)는 10% Tween 80을 사용하였고, 알콜 추출물 대신 담체만을 투여한 군을 대조군으로 하고, 알콜 추출물 대신 Dienogest 0.3mg/kg을 투여한 군을 양성대조군으로 하였다.

[0084] [표 2]

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

[0085]

[0086] 그 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8은 자궁내막증 동물모델에서의 포공영 알콜추출물이 나타내는 효과를 확인한 실험결과를 나타낸 그래프로, x축은 처리군을 나타내고, y축은 결절의 갯수(Nodule counts)를 나타낸다. vehicle은 대조군을 나타내며, 대조군은 약물처리를 하지 않은 군을 나타낸다. 또한, *는 $p < 0.0001$ vs vehicle 을 나타낸다.

[0087] 도시된 바와 같이 포공영 알콜추출물이 유의적으로 자궁내막증 조직형성 억제 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[0088] 이와 같은 결과로부터, 포공영 알콜추출물은 자궁내막증 조직형성 억제 효과에 의해, 자궁내막증의 치료, 예방 및/또는 개선에 효과적임을 알 수 있다.

[0089] 이상의 결과로부터, 포공영 알콜추출물이 자궁내막증의 치료, 예방 및/또는 개선에 효과적임을 알 수 있으며, 특히, 포공영 열수추출물에 비해, 포공영 알콜추출물이 현저하게 자궁내막증의 치료, 예방 및/또는 개선에 효과적임을 알 수 있다.

[0091] <제조예 1> 약학 조성물의 제조

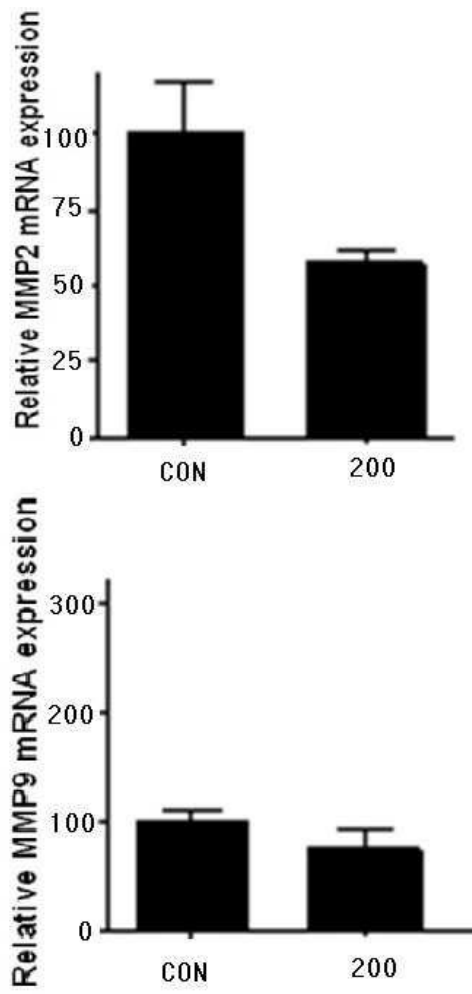
[0092] 포공영 알콜 추출물 300mg, 옥수수 전분 100mg, 유당 100mg, 스테아린산 마그네슘 2mg을 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다. 이 때, 포공영 알콜 추출물은 30%, 70% 또는 99.98% 에탄올 추출물을 사용하였다.

[0094] <제조예 2> 식품 조성물의 제조

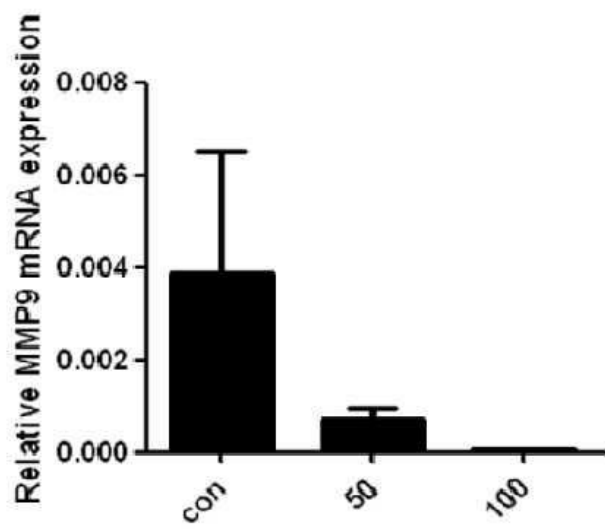
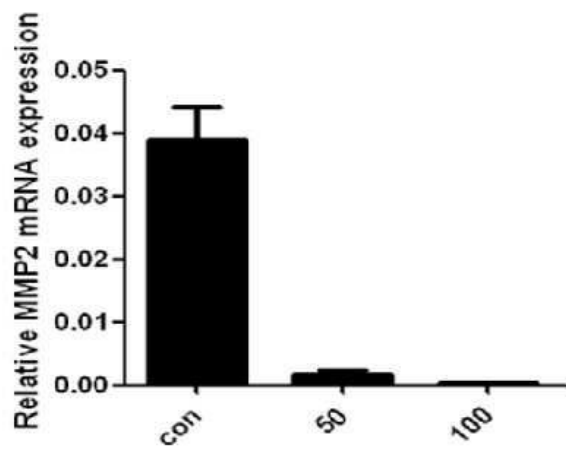
[0095] 포공영 알콜 추출물(4중량%), 액상과당(0.5중량%), 올리고당(2중량%), 설탕(2중량%), 및 식염(0.5중량%)에 물을 추가하여 잔량을 맞춘 후 균질하게 배합하여 순간 살균을 하여 건강음료를 제조하였다. 이 때, 포공영 알콜 추출물은 30%, 70% 또는 99.98% 에탄올 추출물을 사용하였다.

도면

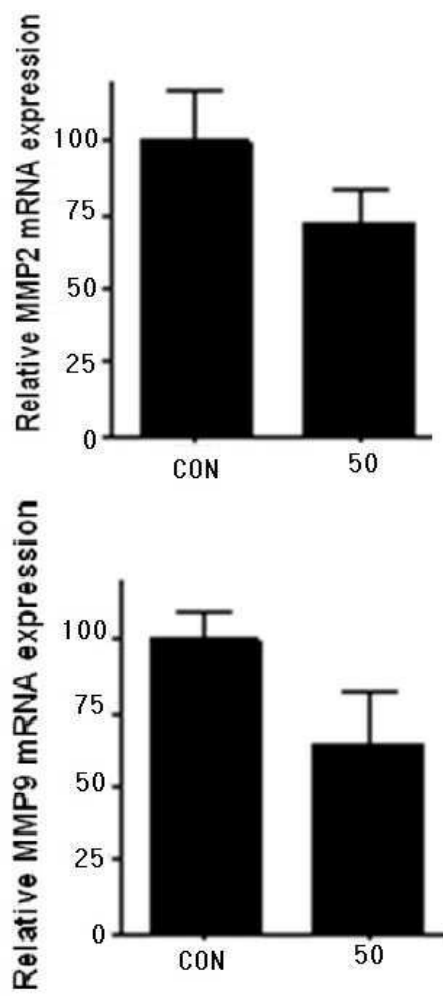
도면1



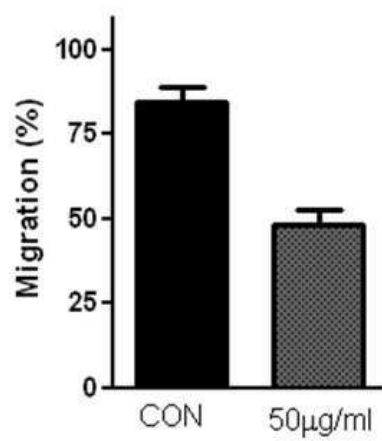
도면2



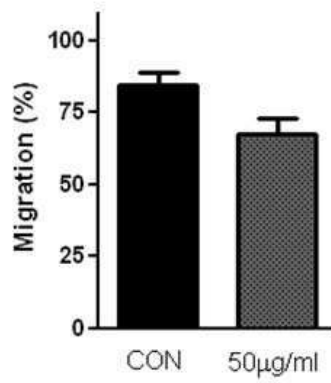
도면3



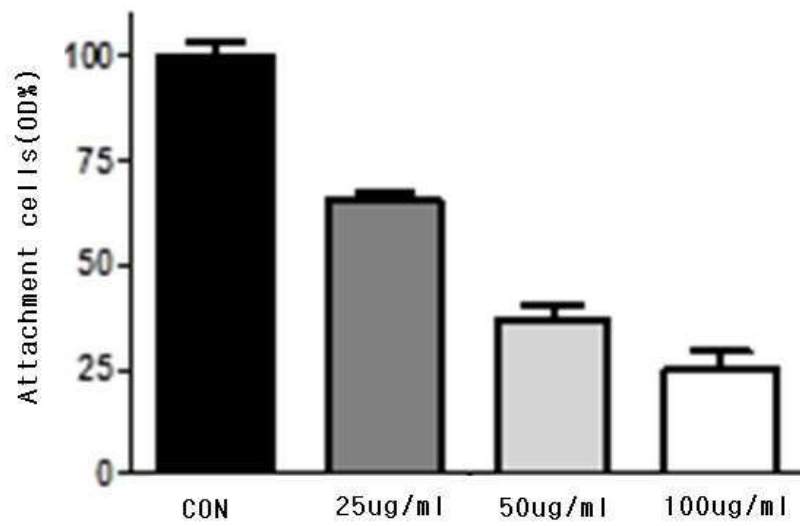
도면4



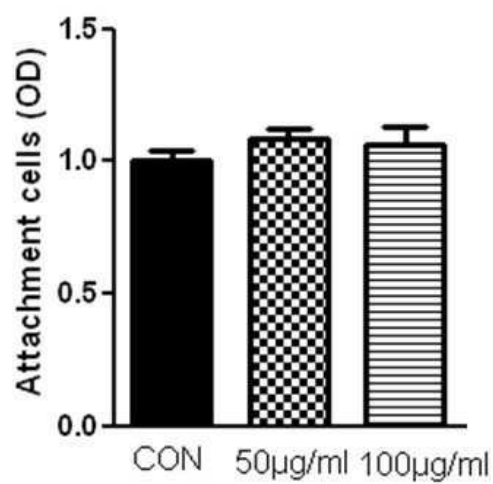
도면5



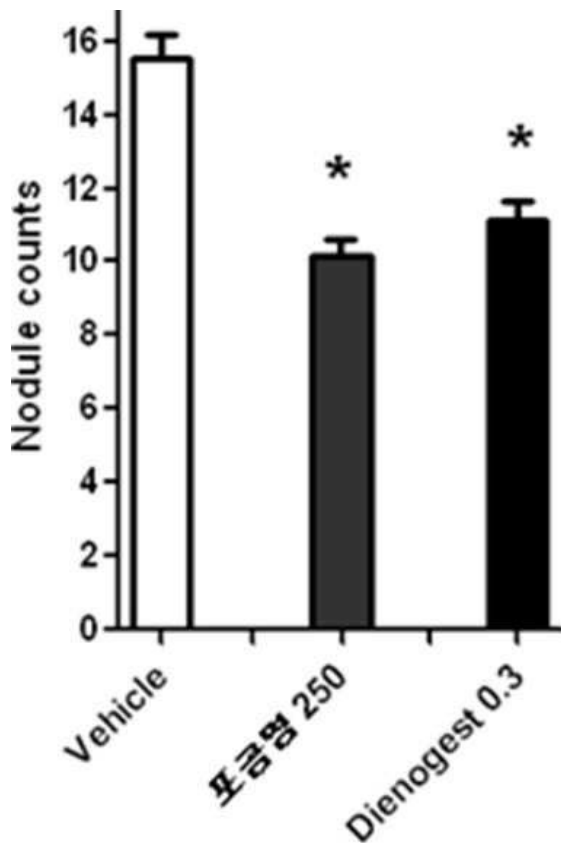
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> DAEWOONG PHARMACEUTICAL CO., LTD.
University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Novel use of alcohol extract of Taraxci Herba

<130> GP15053

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sense primer for MMP-2

<400> 1

ccgcagtgac ggaaagatgt

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213>	Artificial Sequence	
<220>		
><223>	Antisense primer for MMP-2	
<400>	2	
	cacttgccggt cgtcatcgta	20
<210>	3	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Sense primer for MMP-9	
<400>	3	
	ggacgatgcc tgcaacgt	18
<210>	4	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Antisense primer for MMP-9	
<400>	4	
	caaatacagc tggttccaa tct	23
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Sense primer for GAPDH	
<400>	5	
	ggggctctcc agaacatcat	20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Antisense primer for GAPDH	
<400>	6	
	caggtcaggt ccaccactga	20