(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0138520
(43) 공개일자 2019년12월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/41 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61P 15/02 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/41 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0065078
(22) 출원일자 2018년06월05일
심사청구일자 2018년06월05일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
정민형
서울특별시 서초구 신반포로 270, 103동 2701호(반포동, 반포자이아파트)
김경숙
경기도 상남시 수정구 위례동로 61, 5619동 1605호(자연앤래미안이편한세상)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

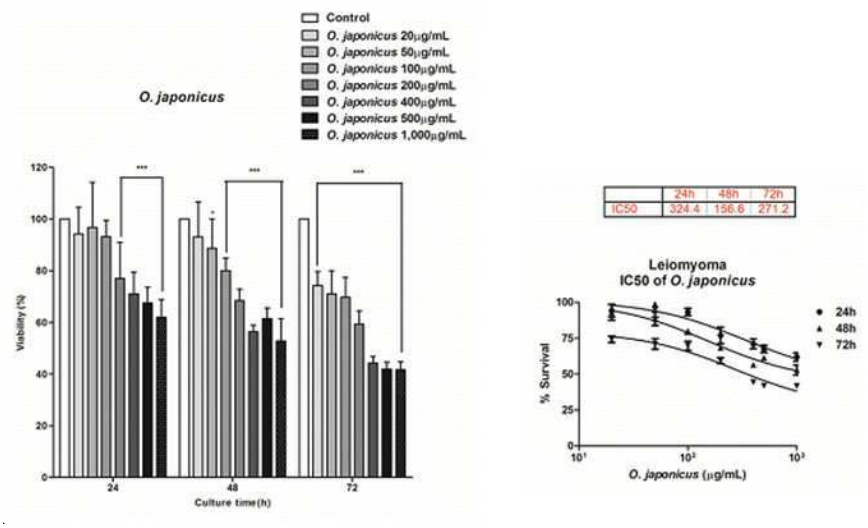
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **와송 추출물을 포함하는 자궁근종 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 와송 추출물을 포함하는 조성물에 관한 것으로서, 더욱 자세하게는 와송 추출물을 유효성분으로 함유하는 자궁근종 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 15/02 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/308 (2013.01)
(72) 발명자
최혁재
서울특별시 강남구 선릉로 221, 207동 1204호(도곡동, 도곡렉슬아파트)
이진우
서울특별시 성북구 장월로1길 28, 115동 2104호(상월곡동, 동아에코빌아파트)

명 세 서

청구범위

청구항 1

와송 추출물을 유효성분으로 포함하는, 자궁근종 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 와송 추출물은 물, 탄소수 1 내지 6의 직쇄 또는 분지형 알코올 및 유기 용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출하여 수득한 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 와송 추출물은 에탄올 수용액으로 추출한 에탄올 수용액 추출물인, 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 에탄올 수용액의 농도는 60 내지 99.9%(v/v)인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 와송 추출물은 60 내지 140℃의 온도에서, 1 내지 8시간 동안 용매로 추출된 것인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 와송 추출물은 1 내지 2000ug/ml의 농도로 포함되는 것인, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 와송 추출물은, 와송의 용매 추출물의 농축물 또는 건조물인 것인, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 와송 추출물은 자궁근종 세포에 대한 증식억제능 또는 세포사멸능을 갖는 것인, 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 증식억제능 및 상기 세포사멸능은, 자궁근종 세포에 선택적인 것인, 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는, 자궁근종 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 와송 추출물을 유효성분으로 포함하며, 자궁근종 세포에 대한 증식 억제능 또는 세포 사멸능을 가지는 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 자궁근종 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 와송 추출물을 포함하는 자궁근종 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 자궁근종 (uterine myoma)은 여성에서 발생하는 종양들 중 가장 흔한 종양으로, 가임기 여성의 약 25~35%에서 발견되며, 특히 35세 이상의 여성들 중 40~50%에서 발견되는 매우 흔한 양성 종양이다. 자궁근종은 양성종양으로, 자궁암 등의 일반적인 악성종양과 전혀 다른 것이다. 자궁근종의 원인은 아직까지 정확히 알려져 있지 않으나, 자궁의 평활근을 이루는 세포 중 하나가 비정상적으로 증식하여 하나의 자궁근종을 형성하는 것으로 생각된다. 자궁근종의 경우 가족적 경향도 어느 정도 있는 것으로 생각된다.

[0004] 자궁근종을 가진 여성일지라도 50% 이상에선 특별한 증상이 없으며, 증상이 있는 경우에는 자궁근종의 위치, 수 그리고 크기 등에 따라 다양한 증상이 유발될 수 있다. 월경과다가 가장 흔한 증상이며, 이 외에도 비정상 자궁출혈, 골반 통증, 월경통, 성교통, 골반 압박감, 빈뇨, 불임 및 생식기능이상 등의 증상이 나타날 수 있다.

[0005] 자궁근종이 빠르게 자라거나 증상을 유발하는 경우에는 치료를 해야 하는데, 일반적으로 치료는 크게 수술적 치료와 비수술적(약물적) 치료로 나뉜다. 최근까지 자궁근종에 대한 마땅한 치료약이 존재하지 않아, 자궁근종이 발병할 경우 대부분 자궁을 절단하는 방식으로 치료해왔다. 지난 100여년간 수술적 치료가 자궁근종에 대한 유일한 치료 방법인 것처럼 알려져 왔으나, 최근에는 비수술적 방법들이 개발 연구되기 시작하였다.

[0006] 실제 자궁절제술의 시행 빈도를 보면 경제협력개발기구(OECD)에 근거하여 2010년 기준으로 한국 여성 10만 명당 329.6명이 복강경 자궁절제술을 받은 것으로 나타났고, 이는 다른 OECD 회원국과 비교할 때 미국은 10만 명당 104.9명이고 영국은 26.9명에 불과하여 월등하게 높게 나타났다. OECD 회원국 평균 복강경 자궁절제술 수술자수는 우리나라의 절반 이하인 115.9명이었다.

[0007] 비수술적 치료를 위해 사용되는 약제들 중 대표적인 것이 ulipristal acetate 이나, 자궁근종 치료약이 매우 소수 존재하여, 신규한 자궁근종 치료약 개발이 절실한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해, 본 발명자들은 자궁근종 예방 또는 치료 효능을 갖는 소재 개발에 대한 연구에 몰두하던 중, 와송 추출물이 자궁근종을 예방 또는 치료할 수 있음을 확인하였고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하게 되었다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 자궁근종을 수술적 치료가 아닌 약물치료를 통해 자궁을 보존하고 가임력을 유지할 수 있는 치료 방법의 개발을 위해 자궁근종의 약물적 치료방법을 개발하고자 하였다.

[0012] 본 발명에 따른 자궁근종 예방 또는 치료용 약학적 조성물은, 와송 추출물을 유효성분으로 포함하는 것일 수 있다.

[0013] 상기 와송 추출물은 물, 탄소수 1 내지 6의 직쇄 또는 분지형 알코올 및 유기 용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출하여 수득한 것일 수 있다.

[0014] 또는, 상기 와송 추출물은 에탄올 수용액로 추출한 에탄올 수용액 추출물인 것일 수 있다.

[0015] 상기 에탄올 수용액의 농도는 60 내지 99.9%(v/v)인 것일 수 있다.

[0016] 상기 와송 추출물은 60 내지 140℃의 온도에서, 1 내지 8시간 용매로 추출된 것일 수 있다.

[0017] 상기 와송 추출물은 1 내지 2000ug/ml의 농도로 포함되는 것일 수 있다.

[0018] 상기 와송 추출물은, 와송의 용매 추출물의 농축물 또는 건조물인 것일 수 있다.

[0019] 상기 와송 추출물은 자궁근종 세포에 대한 증식억제능 또는 세포사멸능을 갖는 것일 수 있다.

[0020] 상기 증식억제능 및 상기 세포사멸능은, 자궁근종 세포에 선택적인 것일 수있다.

[0021] 본 발명에 따른 자궁근종 예방 또는 개선용 식품 조성물은, 와송 추출물을 유효성분으로 포함하는 것일 수 있다.

[0022] 상기 식품 조성물은, 와송 추출물을 유효성분으로 포함하며, 자궁근종 세포에 대한 증식 억제능 또는 세포 사멸능을 가지는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[0023] 상기 식품 조성물에서, 상기 증식억제능 및 상기 세포사멸능은, 자궁근종 세포에 선택적인 것일 수 있다.

[0025] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명한다.

[0026] 본 발명은 와송 추출물을 포함하는 자궁근종 예방, 개선, 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 조성물은 약학 조성물 또는 식품 조성물일 수 있다.

[0027] 본 발명에서 유효성분인 와송 추출물에 사용되는 와송(Orostachys japonicus A. Berger)은 돌나물과(Crassulaceae)의 다년생 초본 식물로서, 바위솔(Orostachys japonicus A. Berger)이라 불리며, 한국, 중국, 일본 등지에 분포한다.

[0028] 본 발명에 있어서, "와송 추출물"은 용매를 이용하여 와송을 추출처리에 의하여 얻어지는 용매 추출액, 상기 용매 추출액의 희석액이나 농축액, 상기 용매 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 용매 추출액의 조정제물, 정제물, 분획물 또는 이들의 혼합물, 용매 추출액 자체 및 용매 추출액을 이용하여 제조 가능한 모든 제형의 추출물을 포함하며, 용액, 농축물 또는 분말상태일 수 있다.

[0029] 본 발명에서 상기 와송을 추출하는 데 사용되는 추출 용매의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 와송 추출 용매의 비제한적인 예로는 물; 에탄올, 메탄올 등과 같은 탄소수(C1) 내지 (C6)의 알코올, 및 다양한 유기용매로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 용매일 수 있다. 상기 다양한 유기용매의 예로는, 에틸렌, 아세톤, 헥산, 에테르, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄, N, N-디메틸포름아미드(DMF), 디메틸설폭 사이드(DMSO), 1,3-부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 또는 이들의 혼합용매 등이 있다. 또한 혼합 용매의 일예로서, 알코올과 물의 1:0.1 내지 1:10의 혼합비를 갖는 알코올 수용액 등을 포함하며, 바람직하게는 에탄올 수용액을 이용하여 용출할 수 있다. 예를 들어, 10 내지 100, 20 내지 100, 30 내지 100, 40 내지 100, 50 내지 100, 60 내지 100, 65 내지 100, 70 내지 100, 75 내지 100, 80 내지 100, 10 내지 99.9, 20 내지 99.9, 30 내지 99.9, 40 내지 99.9, 50 내지 99.9, 60 내지 99.9, 65 내지 99.9, 70 내지 99.9, 75 내지 99.9, 80 내지 99.9, 10 내지 90, 20 내지 90, 30 내지 90, 40 내지 90, 50 내지 90, 60 내지 90, 65 내지 90, 70 내지 90, 75 내지 90, 또는 80 내지 90%(v/v) 에탄올 수용액을 이용하여 용출할 수 있다. 보다 바람직하게, 70 내지 90%(v/v) 에탄올 수용액을 이용하여 용출할 수 있다. 더욱 바람직하게, 75 내지 85%(v/v) 에탄올 수용액을 이용하여 용출할 수 있다.

[0030] 본 발명에서 분획물은 와송 용매 추출물을 1종 이상의 용매를 사용하여 분획함으로써 얻어지는 극성 용매 분획물 및 비극성 용매 분획물일 수 있으며, 정제물은 HPLC 등으로 정제한 것일 수 있다. 상기 여과된 추출물을 진공 회전 농축기로 감압 농축하여 수득한 결과물일 수 있으나, 본 발명의 자궁근종의 예방 또는 개선 효과를 나타낼 수 있는 와송 추출물인 한, 이에 제한되지 않고, 와송 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 또는 이의 조정제물 또는 정제물을 모두 포함한다. 상기 용매를 사용하여 와송을 1회 이상 추출하여 용매 추출물을 제조할 수 있다.

[0031] 본 발명의 일 예에서, 와송 추출물의 추출 온도는 50 내지 300, 50 내지 250, 50 내지 200, 50 내지 180, 50 내지 160, 50 내지 140, 40 내지 130, 40 내지 120, 40 내지 110, 40 내지 100, 60 내지 300, 60 내지 250, 60 내지 200, 60 내지 180, 60 내지 160, 60 내지 140, 60 내지 130, 60 내지 120, 60 내지 110, 60 내지 100, 80 내지 300, 80 내지 250, 80 내지 200, 80 내지 180, 80 내지 160, 80 내지 140, 80 내지 130, 80 내지 120, 80 내지 110, 또는 80 내지 100℃일 수 있다. 바람직하게는 60 내지 140℃일 수 있다. 더욱 바람직하게는 80 내지 120℃일 수 있다.

[0032] 본 발명의 일 예에서, 와송 추출물의 추출 기간은 1 내지 48, 1 내지 36, 1 내지 24, 1 내지 12, 1 내지 10, 1 내지 8, 1 내지 6, 1 내지 4, 1 내지 3, 또는 1 내지 2시간 일 수 있다. 바람직하게는 1 내지 8시간일 수 있다. 더욱 바람직하게는 1 내지 4시간일 수 있다.

[0033] 본 발명에서 와송을 용매로 추출하는 단계에서는 통상적으로 사용되는 모든 추출 방법을 사용할 수 있으며, 예컨대, 냉침 추출, 열수 추출, 초음파 추출, 환류 추출 또는 냉각 추출, 바람직하게는 환류 추출일 수 있으나,

이에 한정되는 것은 아니다. 상기 추출 단계는 1 이상 반복하여 수행될 수 있으며, 2차 이상으로 추출된 추출물 및 각 추출 후 얻어진 여과액을 혼합하여 추출하여 추출 효율을 높일 수 있다.

[0034] 또한, 추출 단계에서 얻어진 추출물을 약 2 내지 20배, 바람직하게는 약 3 내지 20배의 부피의 물로 현탁시킨 후 물, 탄소수 1 내지 6의 직쇄 또는 분지형 알코올, 유기 용매 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 용매를 가하여 용매 가용물을 추출 용매 가용 추출물을 제조하는 방법을 추가로 포함하여 불필요한 단백질, 다당류 및 지방산 등의 불순물을 정제할 수 있다.

[0035] 또한, 상기 용매 추출물을 여과 또는 농축하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 농축 단계에 의해 제조되는 농축물은 의약품 원료로 사용하기에 적합하도록 잔존하는 용매의 함량을 조절하기 위하여 농축물 총량의 약 10 내지 30배, 바람직하게는 15 내지 25배, 보다 바람직하게는 약 20 중량배의 물로 1 내지 5회, 바람직하게는 2 내지 3회 공비 농축하고 재차 동량의 물을 가하여 균질하게 현탁시킨 후 살균 및/또는 동결건조하여 분말상태의 와송 추출물로서 제조될 수 있다.

[0036] 본 발명에 따른 추출물의 제조방법은, 와송에 용매를 가하여 추출하는 제1단계; 및 상기 제1단계에서 얻어진 와송 추출물을 농축하는 제2단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0037] 상기 제1단계는, 와송에서 유효성분을 추출하기 위해 용매를 가하는 단계이다. 추출 용매의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 예를 들어, 물; 에탄올, 메탄올 등과 같은 탄소수(C1) 내지 (C6)의 알코올, 및 다양한 유기용매로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 용매일 수 있다. 상기 다양한 유기용매의 예로는, 에틸렌, 아세톤, 헥산, 에테르, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄, N, N-디메틸포름아미드(DMF), 디메틸설폭 사이드(DMSO), 1,3-부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 또는 이들의 혼합용매 등이 있다. 또한 혼합 용매의 일예로서, 알코올과 물의 1:0.1 내지 1:10의 혼합비를 갖는 알코올 수용액 등을 포함하며, 바람직하게는 에탄올 수용액을 이용하여 용출할 수 있다.

[0038] 상기 제2단계는, 와송 추출물을 농축하는 단계로, 농축기를 이용하여 용매를 제거하고, 농축시킨 후에 동결 건조하여 와송 추출물을 얻을 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 제2단계는, 상기 제1단계에서 얻어진 와송 추출물을 감압여과하고, 회전진공농축기를 사용하여 농축하는 것일 수 있다.

[0039] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 제조방법은, 상기 제1 내지 제2단계 후에, 상기 제2단계에서 농축된 와송 추출물을 동결건조하는 제3단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 제3단계는, 농축된 와송 추출물을 동결건조하는 단계로, 동결건조기를 사용하여 용매를 제거하여 와송 추출물을 수득하는 것일 수 있다.

[0040] 본 발명의 일 예로, 본 발명은 와송 추출물을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 또한, 구체적으로, 본 발명은 와송 추출물을 유효성분으로 포함하는 자궁근종 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다. 상기 약학적 조성물은 상기 와송 추출물을 0.001 내지 99 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 50 중량%로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고, 대상 질환 종류 및 진행 정도, 환자 상태, 목적하는 효과 등에 따라서 적절하게 조절될 수 있다.

[0041] 본 발명에 따른 와송 추출물은 자궁근종 세포의 증식억제능을 가질 수 있다. 구체적으로, 와송 추출물을 자궁근종 세포에 처리 후 세포의 증식 억제농도를 측정해 본 결과, 와송 추출물의 농도가 증가함에 따라 세포 증식 억제가 증가함을 규명하였다. 더욱 구체적으로, MTT assay를 통해 와송 추출물의 자궁근종 세포 증식 억제농도 IC50을 측정해본 결과, 24시간 처리할 경우 324.4 ug/ml, 48시간 처리할 경우 156.6 ug/ml, 72시간 처리할 경우 272.2 ug/ml로 측정되어, 와송 추출물에 자궁근종 세포 항 증식 효과가 있음을 규명하였다(도 1). 또한, 자궁근종 세포에 와송 추출물을 처리 후 세포주기 변화를 분석해 본 결과, 와송 추출물의 농도가 증가할수록 휴지기(G0/G1)에 진입하는 세포수가 먼저 증가하고 이후 Sub_G1에 진입하여 세포 정지 (cell arrest)와 세포 사멸 효과 (apoptosis)가 발생됨을 규명하였다(도 2a 내지 도 2c).

[0042] 또한, 본 발명에 따른 와송 추출물은 자궁근종 세포의 사멸능을 가질 수 있다. 구체적으로, 와송 추출물을 자궁근종 세포에 처리 후 세포의 사멸율을 측정해 본 결과, 와송 추출물의 농도가 증가함에 따라 24, 48, 72시간 경과 후 측정한 세포 사멸율이 모두 증가하여, 와송 추출물의 농도가 증가할수록 자궁근종 세포의 사멸율이 증가하는 것을 규명하였다(도 2a 내지 도 2d).

[0043] 또한, 본 발명에 따른 와송 추출물은 자궁근종 세포에 선택적인 세포 사멸능을 가질 수 있으며, 구체적으로 정상세포인 자궁근육세포에 대한 세포사멸능에 비해, 자궁근종세포에 대해 더 높은 세포 사멸능을 가질 수 있다. 구체적으로, 자궁근육세포 및 자궁근종세포에 본 발명에 따른 와송 추출물을 처리하고 세포사멸율을 측정하였을 때, 와송 추출물을 처리하지 않은 각 대조군 대비 세포사멸율에 있어서, 자궁근종세포의 경우 더 높은 세포사멸

율을 보이며, 이에 본 발명에 따른 와송 추출물이 자궁근종 세포에 선택적인 세포 사멸능을 가짐을 규명하였다(도 6a 및 도 6b).

[0044] 예를 들어, 본 발명에 따른 와송 추출물은, 자궁근종 세포에 50ug/ml의 농도로 72시간 처리되었을 때, 정상세포인 자궁근육 세포의 세포 사멸율에 대한 자궁근종 세포의 세포 사멸율의 비율(선택도)로서 하기 수학식 1에 따르면, 자궁근종 세포의 대조군 대비 세포 사멸율이 정상 자궁근육 세포에 처리되었을 때의 대조군 대비 세포 사멸율의 1배 초과, 1.2배 이상, 1.4배 이상, 1.5배 이상, 1.6배 이상, 1.7배 이상, 1.8배 이상, 1.9배 이상, 2배 이상, 2.13배 이상, 2.14배 이하, 2.2배 이하, 2.5배 이하, 2.7배 이하, 2.8배 이하, 3배 이하, 4배 이하, 또는 5배 이하일 수 있다.

[0045] 예를 들어, 본 발명에 따른 와송 추출물은, 자궁근종 세포에 100ug/ml의 농도로 24시간 처리되었을 때, 정상세포인 자궁근육 세포의 세포 사멸율에 대한 자궁근종 세포의 세포 사멸율의 비율(선택도)로서 하기 수학식 1에 따르면, 자궁근종 세포의 대조군 대비 세포 사멸율이 정상 자궁근육 세포에 처리되었을 때의 대조군 대비 세포 사멸율의 1배 초과, 1.2배 이상, 1.4배 이상, 1.5배 이상, 1.6배 이상, 1.7배 이상, 1.8배 이상, 1.9배 이상, 1.95배 이상, 1.99배 이상, 2배 이하, 2.1배 이하, 2.2배 이하, 2.3배 이하, 2.4배 이하, 2.5배 이하, 2.6배 이하, 2.8배 이하, 3배 이하, 4배 이하, 또는 5배 이하일 수 있다.

[0046] 예를 들어, 본 발명에 따른 와송 추출물은, 자궁근종 세포에 200ug/ml의 농도로 24시간 처리되었을 때, 정상세포인 자궁근육 세포의 세포 사멸율에 대한 자궁근종 세포의 세포 사멸율의 비율(선택도)로서 하기 수학식 1에 따르면, 자궁근종 세포의 대조군 대비 세포 사멸율이 정상 자궁근육 세포에 처리되었을 때의 대조군 대비 세포 사멸율의 1배 초과, 1.1배 이상, 1.2배 이상, 1.3배 이상, 1.4배 이상, 1.5배 이상, 1.6배 이상, 1.7배 이상, 1.8배 이상, 1.9배 이상, 1.95배 이상, 1.99배 이상, 2배 이상, 2.17배 이상, 2.18배 이하, 2.19배 이하, 2.2배 이하, 2.3배 이하, 2.4배 이하, 2.5배 이하, 2.6배 이하, 2.8배 이하, 3배 이하, 4배 이하, 또는 5배 이하일 수 있다.

[0047] 예를 들어, 본 발명에 따른 와송 추출물은, 자궁근종 세포에 50ug/ml의 농도로 48시간 처리되었을 때, 정상세포인 자궁근육 세포의 세포 사멸율에 대한 자궁근종 세포의 세포 사멸율의 비율(선택도)로서 하기 수학식 1에 따르면, 자궁근종 세포의 대조군 대비 세포 사멸율이 정상 자궁근육 세포에 처리되었을 때의 대조군 대비 세포 사멸율의 1배 초과, 1.2배 이상, 1.4배 이상, 1.5배 이상, 1.6배 이상, 1.7배 이상, 1.77배 이상, 1.78배 이하, 1.79배 이하, 1.8배 이하, 1.9배 이하, 2배 이하, 2.1배 이하, 2.2배 이하, 2.3배 이하, 2.4배 이하, 2.5배 이하, 2.6배 이하, 2.8배 이하, 3배 이하, 4배 이하, 또는 5배 이하일 수 있다.

[0048] 예를 들어, 본 발명에 따른 와송 추출물은, 자궁근종 세포에 100ug/ml의 농도로 48시간 처리되었을 때, 정상세포인 자궁근육 세포의 세포 사멸율에 대한 자궁근종 세포의 세포 사멸율의 비율(선택도)로서 하기 수학식 1에 따르면, 자궁근종 세포의 대조군 대비 세포 사멸율이 정상 자궁근육 세포에 처리되었을 때의 대조군 대비 세포 사멸율의 1배 초과, 1.1배 이상, 1.14배 이상, 1.15배 이상, 1.16배 이하, 1.18배 이하, 1.2배 이하, 1.3배 이하, 1.4배 이하, 1.5배 이하, 1.6배 이하, 1.8배 이하, 2배 이하, 3배 이하, 4배 이하, 또는 5배 이하일 수 있다.

[0049] 예를 들어, 본 발명에 따른 와송 추출물은, 자궁근종 세포에 200ug/ml의 농도로 48시간 처리되었을 때, 정상세포인 자궁근육 세포의 세포 사멸율에 대한 자궁근종 세포의 세포 사멸율의 비율(선택도)로서 하기 수학식 1에 따르면, 자궁근종 세포의 대조군 대비 세포 사멸율이 정상 자궁근육 세포에 처리되었을 때의 대조군 대비 세포 사멸율의 1배 초과, 1.02배 이상, 1.04배 이상, 1.05배 이상, 1.06배 이상, 1.07배 이하, 1.08배 이하, 1.1배 이하, 1.2배 이하, 1.3배 이하, 1.4배 이하, 1.5배 이하, 2배 이하, 3배 이하, 4배 이하, 또는 5배 이하일 수 있다.

[0050] 예를 들어, 본 발명에 따른 와송 추출물은, 자궁근종 세포에 50ug/ml의 농도로 72시간 처리되었을 때, 정상세포인 자궁근육 세포의 세포 사멸율에 대한 자궁근종 세포의 세포 사멸율의 비율(선택도)로서 하기 수학식 1에 따르면, 자궁근종 세포의 대조군 대비 세포 사멸율이 정상 자궁근육 세포에 처리되었을 때의 대조군 대비 세포 사멸율의 1배 초과, 1.4배 이상, 1.5배 이상, 1.8배 이상, 2배 이상, 2.03배 이상, 2.04배 이하, 2.05배 이하, 2.1배 이하, 2.2배 이하, 2.3배 이하, 2.4배 이하, 2.5배 이하, 2.6배 이하, 2.8배 이하, 3배 이하, 4배 이하, 또는 5배 이하일 수 있다.

[0051] 예를 들어, 본 발명에 따른 와송 추출물은, 자궁근종 세포에 100ug/ml의 농도로 72시간 처리되었을 때, 정상세포인 자궁근육 세포의 세포 사멸율에 대한 자궁근종 세포의 세포 사멸율의 비율(선택도)로서 하기 수학식 1에

따르면, 자궁근종 세포의 대조군 대비 세포 사멸율이 정상 자궁근육 세포에 처리되었을 때의 대조군 대비 세포 사멸율의 1배 초과, 1.2배 이상, 1.4배 이상, 1.5배 이상, 1.6배 이상, 1.7배 이상, 1.8배 이상, 1.84배 이상, 1.85배 이하, 1.9배 이하, 2배 이하, 2.2배 이하, 2.5배 이하, 3배 이하, 4배 이하, 또는 5배 이하일 수 있다.

[0052] 예를 들어, 본 발명에 따른 와송 추출물은, 자궁근종 세포에 200ug/ml의 농도로 72시간 처리되었을 때, 정상세포인 자궁근육 세포의 세포 사멸율에 대한 자궁근종 세포의 세포 사멸율의 비율(선택도)로서 하기 수학식 1에 따르면, 자궁근종 세포의 대조군 대비 세포 사멸율이 정상 자궁근육 세포에 처리되었을 때의 대조군 대비 세포 사멸율의 1배 초과, 1.2배 이상, 1.4배 이상, 1.5배 이상, 1.6배 이상, 1.68배 이상, 1.69배 이하, 1.7배 이하, 1.8배 이하, 2배 이하, 3배 이하, 4배 이하, 또는 5배 이하일 수 있다.

[0053] [수학식 1]

[0054] 자궁근종세포의 세포 사멸율 선택도 = (A1/A0)/(B1/B0)

[0055] 상기 식에서, A1은 와송 추출물을 처리한 자궁근종세포의 세포사멸율이고, A0는 와송 추출물을 처리하지 않은 자궁근종세포의 세포사멸율이며, B1은 와송 추출물을 처리하지 않은 자궁근육세포의 세포사멸율이다.

[0056] 본 발명의 일 예에 따른 자궁근종 세포 사멸용 조성물은, 와송 추출물을 1 내지 2000ug/ml, 바람직하게는 10 내지 1500ug/ml, 보다 바람직하게는 20 내지 1000ug/ml의 농도로 포함할 수 있다.

[0057] 본 발명의 일 예에 따른 자궁근종 세포 사멸용 조성물은, 자궁근종 세포에 1 내지 120시간, 6 내지 120시간, 12 내지 120시간, 1 내지 96시간, 6 내지 96시간, 12 내지 96시간, 또는 24 내지 72시간 처리될 수 있다.

[0058] 본 발명의 일 예에 따른 자궁근종 세포 사멸용 조성물은, 와송 추출물 20 내지 1000ug/ml의 농도로, 자궁근종 세포에 24 내지 72시간 처리될 수 있다. 보다 바람직하게, 와송 추출물 180 내지 220 ug/ml, 80 내지 120 ug/ml, 30 내지 70 ug/ml, 또는 40 내지 60 ug/ml의 농도로, 60 내지 84시간, 40 내지 56시간, 18 내지 30시간, 또는 20 내지 28시간 처리될 수 있다.

[0059] 본 발명의 약학적 조성물은 자궁근종을 예방 또는 치료하기 위한 통상의 방법에 따라 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 에어로졸, 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화가 가능하다.

[0060] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 포함되며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 사용될 수 있다.

[0061] 비경구투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등을 포함할 수 있다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일 등과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0062] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 담체, 부형제 또는 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오즈, 메틸 셀루로오즈, 하이드록시 프로필 메틸 셀룰로오즈, 미정질 셀룰로오즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 플로필히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 이산화규소 등의 광물유 등이 사용될 수 있다.

[0063] 본 발명의 조성물의 투여 대상 환자는 모든 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 설치류, 가축, 인간 등일 수 있고, 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다. 투여 경로는 특별한 제한은 없고, 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 본 발명의 또 다른 일 예로, 본 발명은 와송 추출물을 포함하는 식품 조성물을 제공한다. 또한, 구체적으로, 본 발명은 와송 추출물을 유효성분으로 포함하는 자궁근종 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공할 수 있다.

[0065] 본 발명의 식품 조성물에 포함된 와송 추출물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염은 와송 추출물, 이의 분획물 또는 이의 가공물의 형태로 포함될 수 있다. 또한 상기 조성물은 유효성분 이외에 식품학적으로 허용 가능한 식품보조첨가제를 포함할 수 있다. 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태

로 사용할 수 있다.

[0066] 이때, 건강기능식품 중의 상기 추출물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물로서 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물로서 100ml을 기준으로 0.02 내지 10g의 비율로 가할 수 있다.

[0067] 상기 건강기능식품 중 건강음료 조성물의 경우는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 것 외에 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0068] 본 발명에 있어서, 식품보조첨가제란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 건강기능식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 식품보조첨가제의 예로는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의 식품보조첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.

[0069] 본 발명에 있어서, "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 상기 제조시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 건강기능식품의 제형 또한 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 건강기능식품은 자궁근종을 예방 또는 개선시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[0070] 본 발명의 건강기능식품이 취할 수 있는 형태에는 제한이 없으며, 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있고, 기능성 식품 등 당업계에 알려진 용어와 혼용 가능하다. 아울러 본 발명의 건강기능식품은 당업자의 선택에 따라 식품에 포함될 수 있는 적절한 기타 보조성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 와송 추출물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 동물을 위한 사료로 이용되는 식품도 포함한다.

발명의 효과

[0072] 본 발명에 따른 와송 추출물은 자궁근종 치료 효과가 있는 것으로서, 자궁근종 치료용 약학 조성물로서 사용될 수 있고, 자궁근종 예방 또는 개선용 식품에 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0074] 도 1은 와송 추출물을 처리한 자궁근종 세포의 MTT assay 결과 및 자궁근종세포의 와송 추출물 처리시간 별 IC50값을 나타낸 것이다.

도 2a는 와송 추출물을 처리한 자궁근종 세포의 24시간 경과 후 Annexin V-FITC/PI apoptosis assay 결과를 와송 추출물 농도별로 나타낸 것이다.

도 2b는 와송 추출물을 처리한 자궁근종 세포의 48시간 경과 후 Annexin V-FITC/PI apoptosis assay 결과를 와송 추출물 농도별로 나타낸 것이다.

도 2c는 와송 추출물을 처리한 자궁근종 세포의 72시간 경과 후 Annexin V-FITC/PI apoptosis assay 결과를 와송 추출물 농도별로 나타낸 것이다.

도 2d는 와송 추출물을 처리한 자궁근종 세포의 24, 48, 및 72시간 경과 후 Annexin V-FITC/PI apoptosis

assay 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 3a는 와송 추출물을 처리한 자궁근종 세포의 24시간 경과 후 세포주기 분석 결과를 와송 추출물 농도별로 나타낸 것이다.

도 3b는 와송 추출물을 처리한 자궁근종 세포의 48시간 경과 후 세포주기 분석 결과를 와송 추출물 농도별로 나타낸 것이다.

도 3c는 와송 추출물을 처리한 자궁근종 세포의 72시간 경과 후 세포주기 분석 결과를 와송 추출물 농도별로 나타낸 것이다.

도 3d는 와송 추출물을 처리한 자궁근종 세포의 24, 48, 및 72시간 경과 후 세포주기 분석 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 4a는 와송 추출물을 처리한 정상 자궁근육 세포의 24시간 경과 후 Annexin V-FITC/PI apoptosis assay 결과를 와송 추출물 농도별로 나타낸 것이다.

도 4b는 와송 추출물을 처리한 정상 자궁근육 세포의 48시간 경과 후 Annexin V-FITC/PI apoptosis assay 결과를 와송 추출물 농도별로 나타낸 것이다.

도 4c는 와송 추출물을 처리한 정상 자궁근육 세포의 72시간 경과 후 Annexin V-FITC/PI apoptosis assay 결과를 와송 추출물 농도별로 나타낸 것이다.

도 4d는 와송 추출물을 처리한 정상 자궁근육 세포의 24, 48, 및 72시간 경과 후 Annexin V-FITC/PI apoptosis assay 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 5a는 와송 추출물을 처리한 정상 자궁근육 세포의 24시간 경과 후 세포주기 분석 결과를 와송 추출물 농도별로 나타낸 것이다.

도 5b는 와송 추출물을 처리한 정상 자궁근육 세포의 48시간 경과 후 세포주기 분석 결과를 와송 추출물 농도별로 나타낸 것이다.

도 5c는 와송 추출물을 처리한 정상 자궁근육 세포의 72시간 경과 후 세포주기 분석 결과를 와송 추출물 농도별로 나타낸 것이다.

도 5d는 와송 추출물을 처리한 정상 자궁근육 세포의 24, 48, 및 72시간 경과 후 세포주기 분석 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 6a는 세포사멸율 비교를 통해 와송 추출물의 정상 자궁근육 세포에 대한 자궁근종 세포의 와송 추출물에 의한 선택적 세포사멸 효과를 나타낸 그래프이며, 그래프에서 * 는 $P<0.05$, ** 는 $P<0.01$, 및 *** 는 $P< 0.001$를 의미한다.

도 6b는 세포주기분석 비교를 통해 와송 추출물의 자궁근종 세포 선택적 사멸효과를 나타낸 그래프이며, 그래프에서 *** 는 $P <0.001$을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0075] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0077] **실시예 1: 와송 추출물의 제조**

[0078] 1-1: 와송 추출물 제조

[0079] 와송 (Orostachys japonicus A. Berger)은 경희한약 (원주, 강원도)으로부터 구매하여 사용하였다. 와송 100g을 정밀히 달아 10배의 80%(v/v) 에탄올을 가하고 100 ℃에서 2시간 동안 환류 추출하였다. 얻어진 추출액을 감압여과 (EYELA A-1000S; EYELA, USA)하고 회전진공농축기 (BUCHI Rotavapor R-220; BUCHI Labortechnik, Switzerland)를 사용하여 60 ℃에서 1시간 농축하였다. 얻어진 농축액은 -80℃에서 3일간 동결건조기(Ilshin Biobase, Korea)를 사용하여 동결건조하였고, 와송 추출물의 분말 6.5g을 얻었다 (수율 6.5 %).

[0081] 1-2: 와송 추출물 사용 조건

[0082] 실험에 사용 하기 위해 실시예 1-1에서 제조된 와송 추출물을 1mg/mL 의 농도가 되도록 3차 증류수에 첨가하고 혼합 교반기로 4시간 동안 녹였다. 녹지 않은 것을 거르기 위해 상층액을 옮겨 microcentrifuge를 이용하여 12,000rpm 으로 원심분리 후 녹지 않은 pellet은 제거하고 상층액만 수합하는 과정을 3회 반복한 후, 0,22㎛M 필터를 이용하여 여과해, 5mg/ml(5000ug/ml) 농도의 와송 추출물 용액을 얻었다.

[0083] 얻어진 와송 추출물 용액을 각각 배지로 희석하여 1000, 600, 500, 400, 200, 100, 50, 및 20 ug/ml 농도의 와송 추출물 용액을 실험에 사용하였다.

[0085] **실시예 2: 와송 추출물의 자궁근종 세포의 생존 및 사멸에 미치는 효과 확인(MTT assay)**

[0086] 2-1: 자궁근종 세포의 준비

[0087] 양성 자궁질환으로 자궁절제술 및 자궁근종 절제술을 시행하는 환자들에게 인체유래물 연구 동의서 및 연구 동의서를 취득한 후, 채취한 자궁근종 조직을 실험에 사용하였다. 본 발명과 관련하여 기관윤리위원회 (IRB) 승인을 받았다.

[0088] 채취된 조직을 1% Anti-biotics/ anti-mycotic (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 가 함유된 인산완충용액 (PBS, phosphate buffered saline pH 7.4)으로 세척하여 남아있는 혈액 등을 제거하였다. 배양 접시 위에서 멸균된 가위를 이용하여 조직을 1-2mm 의 크기로 잘게 자른 후 50mL conical tube 에 옮겼다. 여기에 2mg/mL 의 collagenase type I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 과 0.2mg/mL 의 DNase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 가 함유된 Hank's balanced salt solution (HBSS) 를 처리하여 37° C 항온수조에서 3-4시간 동안 교반 배양하였다. 충분히 소화된 조직에 10% fetal bovine serum (FBS: Gibco BRL)을 첨가하여 효소작용을 정지시키고 70 ㎛ 의 나일론 망 (cell strainer, SPL, KOREA)을 통과시켜 걸러낸 후 원심분리하여 상층액을 제거 하였다. 이것을 다시 PBS 로 씻어서 원심분리 하고 상층액을 제거한 후, 모아진 세포를 10% fetal bovine serum 이 첨가된 Dulbecco's modified eagle's medium/Nutrient mixture F-12 배양액 (Pan Biotech, Aidenbach, Germany) 배양액에 부유시킨 후 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하고 48시간 방치한 다음 2일에 한번 배양액을 교체하며 배양하였다. 배양된 세포는 Smooth muscle action에 대한 면역조직화학염색을 시행하여 99% 이상의 순수한 근육세포를 확인 후 1~3세대 세포만을 실험에 사용하였다.

[0090] 2-2: 와송 추출물의 자궁근종 세포 항증식 효과 시험(MTT ASSAY)

[0091] 와송 추출물이 자궁근종(myoma) 세포의 세포생존 및 사멸에 미치는 영향을 보기 위해, 96 well plate에 실시예 2-1의 자궁근종 세포를 1×10^4 cells/well 의 밀도로 분주하고, 배양기에서 24시간 배양하였다.

[0092] 상기 배양된 자궁근종 세포에 와송 추출물을 각각 20, 50, 100, 200, 400, 500 및 1,000 ug/ml의 농도로 처리한 후에 배양시간 24시간, 48시간, 및 72시간에서 MTT 분석을 시행하였다.

[0093] 구체적으로, 각 자궁근종 세포에 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 2mg/mL 의 농도로 처리하고 37℃ 배양기에서 2시간 동안 반응 시키고 상층액을 제거한 후, 각 세포에 DMSO 200 ㎕를 첨가하여 용해시킨 후 교반기(shaker)를 이용하여 실온에서 5분간 잘 용해시킨 후 이어서 분광 광도계 마이크로 플레이트 리더 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 적어도 독립적으로 3번 수행되었다.

[0094] 대조군은 자궁근종 세포에서 와송 추출물을 처리하지 않은 비처리군이며, 통상적으로 불멸화된 암세포가 아닌 세포들을 세포 배양할 경우 일정 부분에서 세포 사멸이 동반되는 특징이 있고, 이를 고려하여 대조군을 임의로 100으로 산정하고 각 농도별로 대조군 (control)과 비교해 생존한 세포를 백분율로 나타내었다.

[0095] 상기 와송 추출물을 처리한 세포의 MTT 분석 결과와 자궁근종세포의 와송 추출물 처리시간(24, 48, 72시간) 별 IC50값을 도 1에 나타냈다. 표 1은 와송 추출물의 농도별 자궁근종세포의 MTT assay 를 6회 반복 실험한 결과를 나타낸 것이며, 단위는 %이다.

표 1

[0096]

시료 처리량	24hr	48hr	72hr
Control	100.00	100.00	100.00
20ug/ml	94.12	93.01	74.21
50ug/ml	96.72	88.57	71.03
100ug/ml	93.11	80.01	69.68
200ug/ml	76.94	68.39	59.40
400ug/ml	71.04	56.43	44.30
500ug/ml	61.48	61.40	41.89
1000ug/ml	61.90	52.78	41.71

[0097] 그 결과, 와송 추출물의 농도가 증가함에 따라 자궁근종 세포의 증식 억제 및 사멸율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0098] 도 1에 나타낸 바와 같이, 그래프 패드 프리즘 (GraphPad Prism, version 5.01; GraphPad Software, San Diego, CA) 소프트웨어를 사용하여 분석한 와송 추출물의 자궁근종 세포의 증식 억제농도 (IC_{50}, Inhibitory dose)는, 24, 48, 72시간에서 각각 324.4, 156.6, 272.2 ug/ml 이었다.

[0099] 그 결과, 와송 추출물 처리 시간이 증가할수록 IC_{50}값이 감소하여, 와송 추출물에 자궁근종 세포 항증식 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0101] **실시예 3: 와송 추출물의 자궁근종 치료 효과 평가(Annexin V-FITC/PI apoptosis assay)**

[0102] 세포사멸 분석을 위하여, 실시에 2-1의 자궁근종 세포를 2.5 × 10^5 cells/dish 의 밀도로 60mm 배양접시에 접종하고 37℃, 5% CO_2 농도의 배양기에서 2일간 배양 후 세포를 수거하였다. 0.05% Trpsin - 0.53mM EDTA를 처리하여 세포를 떼어낸 후 FBS를 첨가하여 효소반응을 정지 시킨 후 세포를 차가운 인산 완충 식염수 (PBS)로 2회 세척하였다.

[0103] 상기 준비된 자궁근종 세포에 와송 추출물을 50, 100, 200, 400 및 600um/ml의 농도별로 처리한 후, 배양시간 24시간, 48시간, 및 72시간에서 FITC Annexin V 세포 사멸 검출 키트 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 사용하여 세포사멸 정도를 검출하였다.

[0104] 구체적으로, 세포를 어두운 방의 실온에서 15분 동안 100 μl 결합 용액으로 세포를 잘 풀어준 후 5μl FITC가 접합 된 Annexin V와 5 μl propidium iodide (PI)을 넣어 세포를 염색한 후 apoptosis 를 측정하였다. Annexin V-FITC 및 PI 형광 강도는 FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) 장치로 측정하였으며 세포사멸 정도는 CellQuest 소프트웨어 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하여 세포사멸 정도를 분석하였다. 와송 추출물을 처리한지 24시간, 48시간, 및 72시간 경과 후 세포 사멸율을 측정하였다. 상기 측정결과로서 와송 추출물을 처리한 자궁근종 세포의 24시간, 48시간, 및 72시간 경과 후 Annexin V-FITC/PI apoptosis assay 결과를 와송 추출물 농도별로 나타낸 것을 각각 도 2a, 2b, 2c에 나타냈다.

[0105] 도 2a는 와송 추출물을 처리한 자궁근종 세포의 24시간 경과 후 Annexin V-FITC/PI apoptosis assay 결과를 와송 추출물 농도별로 나타낸 것이다. 도 2b는 와송 추출물을 처리한 자궁근종 세포의 48시간 경과 후 Annexin V-FITC/PI apoptosis assay 결과를 와송 추출물 농도별로 나타낸 것이다. 도 2c는 와송 추출물을 처리한 자궁근종 세포의 72시간 경과 후 Annexin V-FITC/PI apoptosis assay 결과를 와송 추출물 농도별로 나타낸 것이다. 도 2d는 와송 추출물을 처리한 자궁근종 세포의 24, 48, 및 72시간 경과 후 Annexin V-FITC/PI apoptosis assay 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

[0106] 도 2a 내지 2c에서 알 수 있듯이, 24시간, 48시간, 및 72시간 모든 경우에서, 와송 추출물의 농도가 증가함에 따라 자궁근종세포의 사멸율이 증가되며 휴지기(G0/G1)에 진입하는 세포수가 증가되는 것을 알 수 있었으며, 와송 추출물이 자궁근종 치료 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0107] 결론적으로, 도 2d에서 알 수 있듯이, 세포 사멸 분석 결과 24, 48, 72 시간 실험 모두에서 와송 추출물의 농도가 증가될수록 자궁근종 세포의 사멸율이 증가되는 결과를 보였고 세포주기 분석에서도 휴지기(G0/G1)에 진입하

는 세포수가 먼저 증가하고 이후 Sub_G1에 진입하여 세포 정지 (cell arrest)와 세포 사멸 효과 (apoptosis)가 발생됨을 알 수 있었다.

[0109] **실시예 4: 세포주기 분석 실험 (Cell cycle analysis)**

[0110] 와송 추출물이 자궁근종(myoma) 세포의 증식 억제 효과 및 세포 주기 회로와의 상관관계를 통해 세포 증식의 억제가 세포자멸사와 관계가 있는지 확인하기 위해, 유동 세포 계측법에 의한 세포주기 분석(cell cycle analysis)을 하였다.

[0111] 구체적으로, 1×10^5 개의 밀도로 세포를 준비하여 자궁근종 세포에 와송 추출물을 각각 50, 100, 200, 400, 및 600 ug/ml의 농도로 처리한 다음, 5% CO2를 함유한 가습 분위기에서 37℃에서 하루 동안 배양하였다. 그 후 세포를 PBS로 세척한 후, 70%(v/v) 에탄올로 1시간 동안 고정시키고, 37℃에서 30분 동안 RNase A (10 mg /mL)로 처리 후, 요오드화 프로피디움 (50 mg/mL; 시그마)으로 염색하였다. CellQuest 소프트웨어 (Becton-Dickinson)와 함께 FACSCalibur 기기를 사용하여 각 세포주기 단계의 DNA 함량을 측정하였다. 상기 측정결과로서 와송 추출물을 처리한 자궁근종 세포의 24시간, 48시간, 및 72시간 경과 후 세포주기 분석 결과를 와송 추출물 농도별로 각각 도 3a, 도 3b, 및 도 3c에 나타냈다. 도 3d는 각 처리농도에 따른 결과를 처리시간별 그래프로 나타낸 것이다.

[0113] **비교예 1: 정상 자궁근육 세포의 세포사멸 평가(Annexin V-FITC/PI apoptosis assay)**

[0114] 정상 자궁근육(myometrium) 세포의 와송 추출물에 의한 세포사멸 정도를 자궁근종(myoma) 세포와 비교하여 와송 추출물의 자궁근종 선택적 세포사멸 효과를 확인하기 위해, 정상 자궁근육 세포의 와송 추출물에 의한 세포사멸 평가를 수행하였다.

[0115] 구체적으로, 실시예 3과 동일한 방법으로 세포 사멸율을 측정하되, 정상 자궁근육 세포(myometrium)를 사용하여 세포 사멸율을 측정하였다. 그 결과를 도 4a 내지 3c에 나타내었다. 도 4a는 와송 추출물을 처리한 정상 자궁근육 세포의 24시간 경과 후 Annexin V-FITC/PI apoptosis assay 결과를 와송 추출물 농도별로 나타낸 것이다. 도 4b는 와송 추출물을 처리한 정상 자궁근육 세포의 48시간 경과 후 Annexin V-FITC/PI apoptosis assay 결과를 와송 추출물 농도별로 나타낸 것이다. 도 4c는 와송 추출물을 처리한 정상 자궁근육 세포의 72시간 경과 후 Annexin V-FITC/PI apoptosis assay 결과를 와송 추출물 농도별로 나타낸 것이다. 도 4d는 와송 추출물을 처리한 정상 자궁근육 세포의 24, 48, 및 72시간 경과 후 Annexin V-FITC/PI apoptosis assay 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

[0117] **비교예 2: 정상 자궁근육 세포의 세포주기 분석 (Cell cycle analysis)**

[0118] 정상 자궁근육(myometrium) 세포의 와송 추출물에 의한 세포사멸 정도를 자궁근종(myoma) 세포와 비교하여 와송 추출물의 자궁근종 선택적 세포사멸 효과를 확인하기 위해, 정상 자궁근육 세포의 유동 세포 계측법에 의한 세포주기 분석(cell cycle analysis)을 수행하였다.

[0119] 구체적으로, 실시예 4와 동일한 방법으로 세포주기분석을 수행하되, 정상 자궁근육 세포(myometrium)를 사용하여 세포주기분석을 수행하였다. 상기 측정결과로서 와송 추출물을 처리한 정상 자궁근육 세포의 24시간, 48시간, 및 72시간 경과 후 세포주기 분석 결과를 와송 추출물 농도별로 각각 도 4a, 도 4b, 및 도 4c에 나타냈다. 도 4d는 각 처리농도에 따른 결과를 처리시간별 그래프로 나타낸 것이다.

[0121] **실시예 5: 와송 추출물의 자궁근종 세포 선택적 사멸 효과 확인**

[0122] 5-1: 세포사멸 비교를 통한 와송 추출물의 자궁근종 세포 선택적 효과 확인

[0123] 와송 추출물의 자궁근종 세포 선택적 사멸 효과를 확인하기 위해, 정상 자궁근육 세포의 각 농도별 세포 사멸 효과(비교예 1)와, 자궁근종 세포의 세포 사멸 효과(실시예 3)를 비교하여 통계적으로 분석하였다.

[0124] 구체적으로, 자궁근종 세포 및 정상 자궁근육 세포 각각에 대하여, 와송 추출물을 처리한 경우 대조군에 비해

세포 사멸율이 얼마나 증가하였는지 확인하였다. 통계는 Two-way ANOVA, 자세히는 repeated measure ANOVA(반복측정 분산분석)을 사용하였고, 사후 검정으로는 Bonferroni post-test를 이용하였다. 그 결과를 도 6a에 표시하였다.

[0125] 그 결과, 와송 추출물에 의한 정상 자궁근육 세포의 사멸율보다 자궁근종 세포의 사멸율이 통계적으로 유의미하게 높은 것으로 측정되어, 자궁근종 세포에서 와송 추출물 처리에 따른 세포 사멸율 증가가 더 높게 나타난 것을 알 수 있었으며, 와송 추출물의 자궁근종 세포 선택적 사멸 효과를 확인할 수 있었다. 즉, 와송 추출물 처리에 의해 정상 자궁근육 세포보다 자궁근종 세포가 더 많이 사멸되어, 와송 추출물에 자궁근종 세포 선택적 사멸 효과가 있음을 알 수 있다. 도 6a는 정상 자궁근육 세포에 대한 자궁근종 세포의 와송 추출물에 의한 선택적 세포사멸 효과를 나타낸 그래프이며, 그래프에서 *** 는 P <0.001을 의미한다.

[0127] 5-2: 세포주기분석 비교를 통한 와송 추출물의 자궁근종 세포 선택적 효과 확인

[0128] 와송 추출물의 자궁근종 세포 선택적 사멸 효과를 확인하기 위해, 정상 자궁근육 세포의 세포주기 분석 결과(비교예 2)와, 자궁근종 세포의 세포주기 분석 결과(실시예 4)를 비교하여 통계적으로 분석하였다.

[0129] 구체적으로, 실시예 5-1의 분석방법과 동일하게 통계분석을 수행하였으며, 그 결과를 도 6b에 나타내었다.

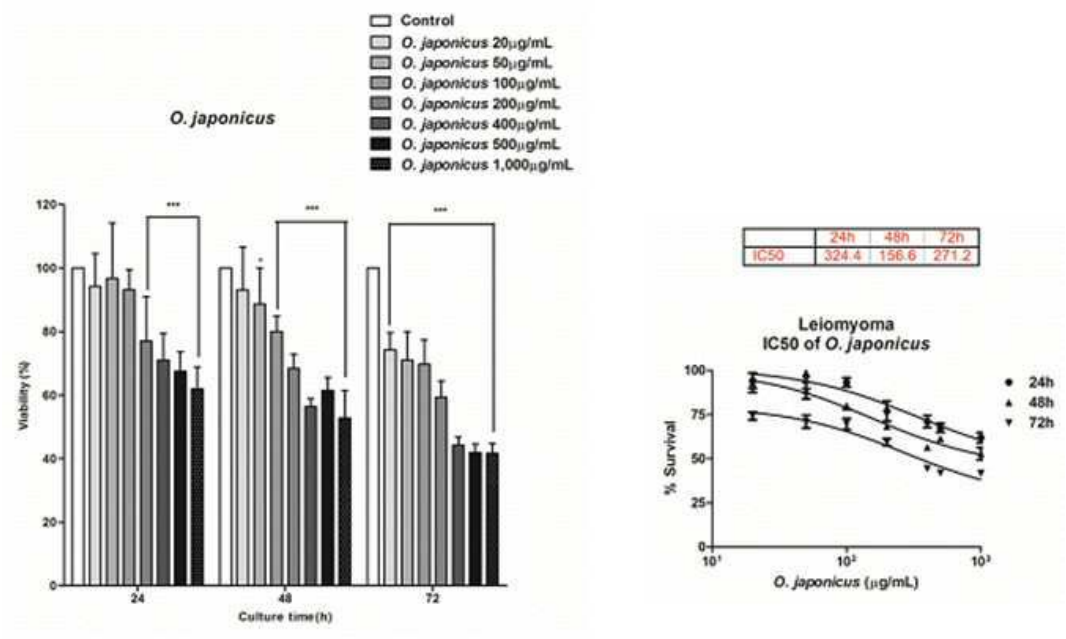
[0130] 그 결과, 정상 자궁근육 세포보다 자궁근종 세포에서 세포사멸율이 통계적으로 유의미하게 높은 것으로 측정되어, 자궁근종 세포에서 와송 추출물 처리에 따른 세포 사멸율이 더 높게 나타난 것을 알 수 있었으며, 와송 추출물의 자궁근종 세포 선택적 사멸 효과를 확인할 수 있었다. 즉, 와송 추출물 처리에 의해 정상 자궁근육 세포보다 자궁근종 세포가 더 많이 사멸되어, 와송 추출물에 자궁근종 세포 선택적 사멸 효과가 있음을 알 수 있다. 도 6b는 정상 자궁근육 세포에 대한 자궁근종 세포의 와송 추출물에 의한 선택적 세포사멸 효과를 나타낸 그래프이며, 그래프에서 *는 P < 0.05, **는 P <0.01, 및 *** 는 P <0.001을 의미한다.

[0132] **참고예 1: 통계처리**

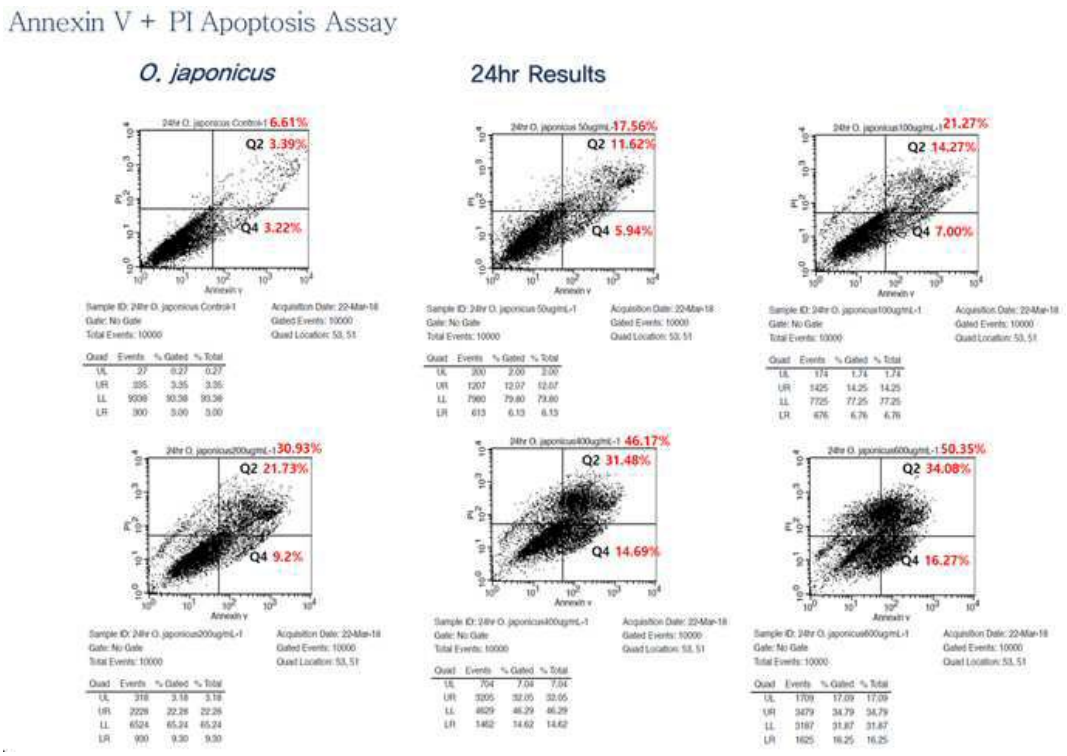
[0133] 모든 측정값은 평균 ± 표준편차로 표기하였으며 통계적 분석은 그래프 패드 프리즘 (GraphPad Prism (version 5.01); GraphPad Software, San Diego, CA) 소프트웨어를 사용하였으며 그룹간 변이를 고려한 One-way or two-way ANOVA 를 사용하여 분석하였으며, 사후 검정으로 Bonferroni post-test를 이용하여 측정값간의 유효성을 검정하였다. 본 발명에서 * 는 P<0.05, ** 는 P<0.01, 및 *** 는 P< 0.001를 의미한다.

도면

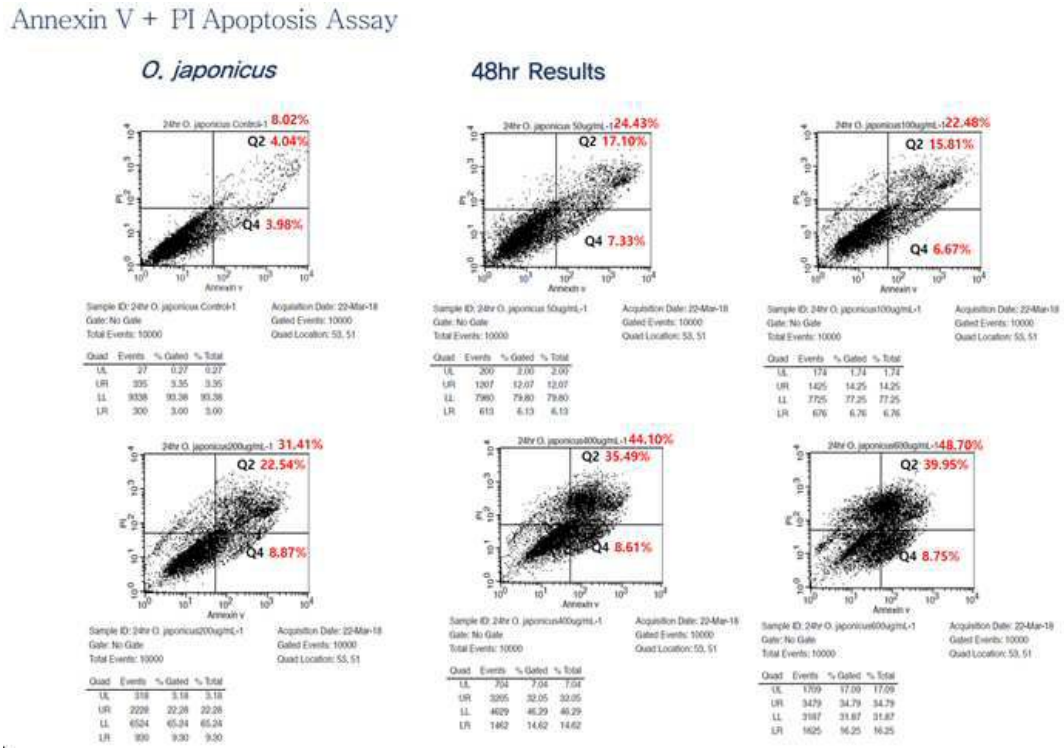
도면1


Control
O. japonicus 20μg/mL
O. japonicus 50μg/mL
O. japonicus 100μg/mL
O. japonicus 200μg/mL
O. japonicus 400μg/mL
O. japonicus 500μg/mL
O. japonicus 1,000μg/mL
O. japonicus
Viability (%)
Culture time(h)
24h 48h 72h
IC50 324.4 156.6 271.2
Leiomyoma
IC50 of O. japonicus
% Survival
O. japonicus (μg/mL)

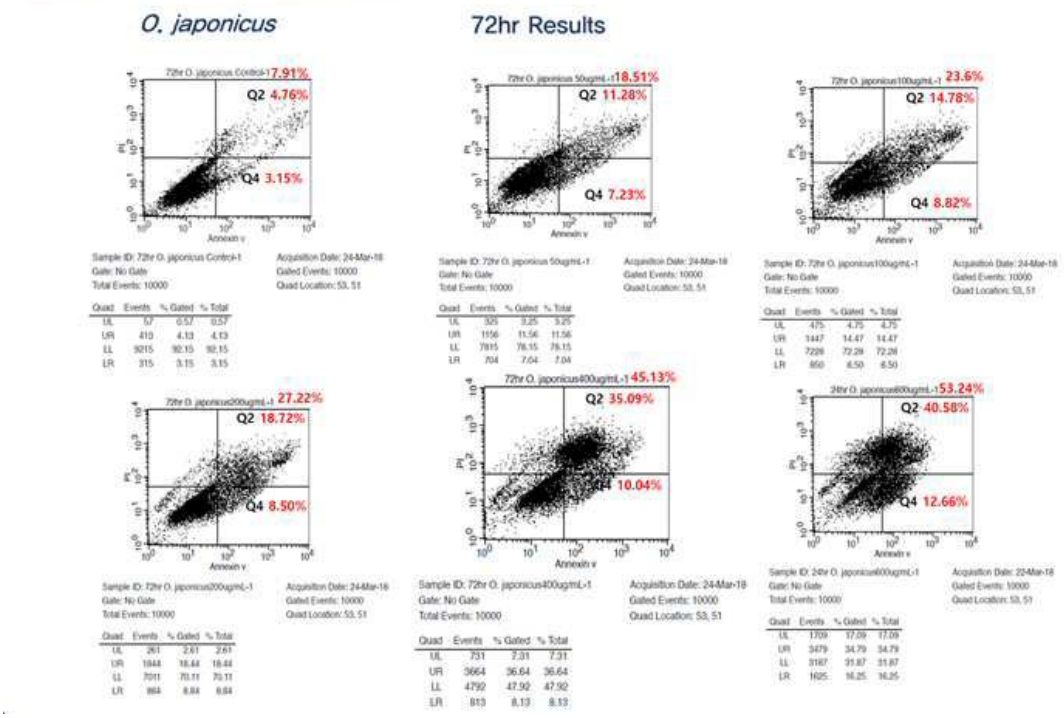
도면2a


Annexin V + PI Apoptosis Assay
O. japonicus
24hr Results
Q2 3.39%
Q4 3.22%
6.61%
Q2 11.62%
Q4 5.94%
17.56%
Q2 14.27%
Q4 7.00%
21.27%
Q2 21.73%
Q4 9.2%
30.93%
Q2 31.48%
Q4 14.69%
46.17%
Q2 34.08%
Q4 16.27%
50.35%

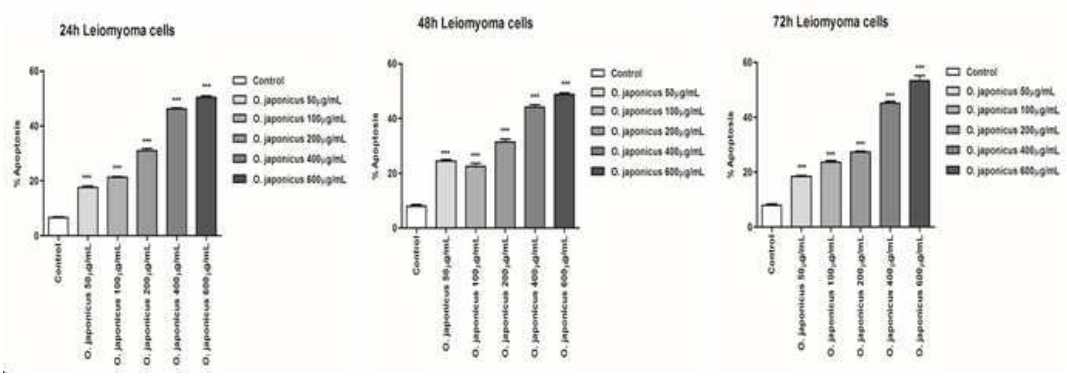
도면2b


Annexin V + PI Apoptosis Assay
O. japonicus
48hr Results
Q2 4.04%
Q4 3.98%
8.02%
Q2 17.10%
Q4 7.33%
24.43%
Q2 15.81%
Q4 6.67%
22.48%
Q2 22.54%
Q4 8.87%
31.41%
Q2 35.49%
Q4 8.61%
44.10%
Q2 39.95%
Q4 8.75%
48.70%

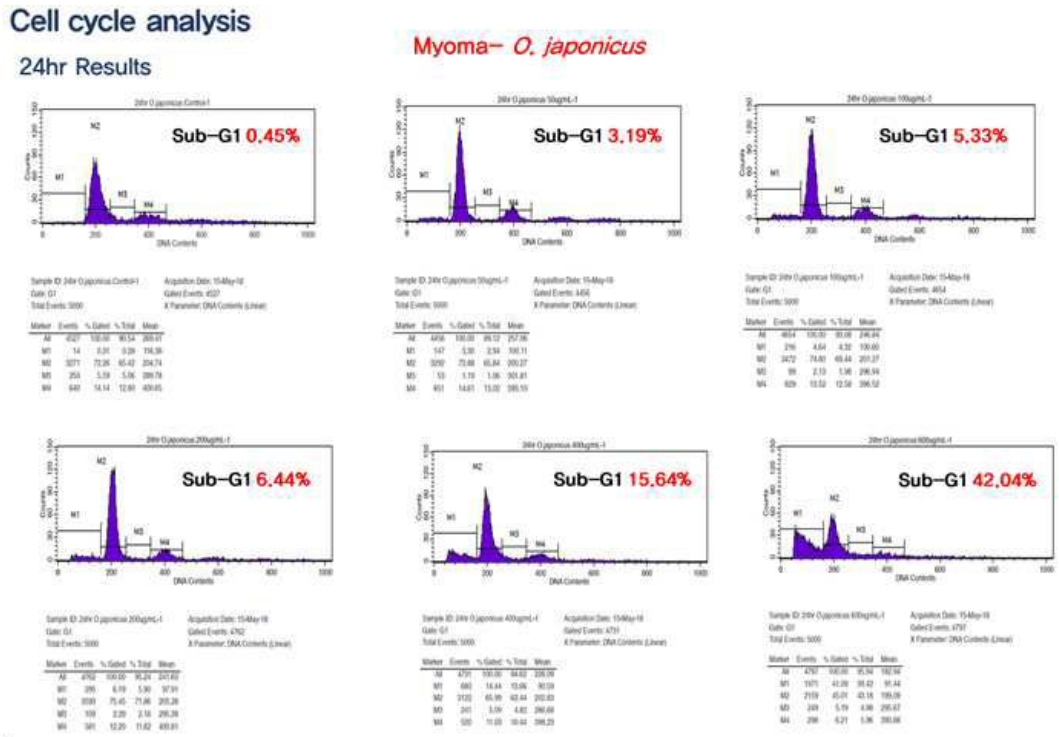
도면2c


Annexin V + PI Apoptosis Assay
O. japonicus
72hr Results
Q2 4.76%
Q4 3.15%
7.91%
Q2 11.28%
Q4 7.23%
18.51%
Q2 14.78%
Q4 8.82%
23.6%
Q2 18.72%
Q4 8.50%
27.22%
Q2 35.09%
Q4 10.04%
45.13%
Q2 40.58%
Q4 12.66%
53.24%

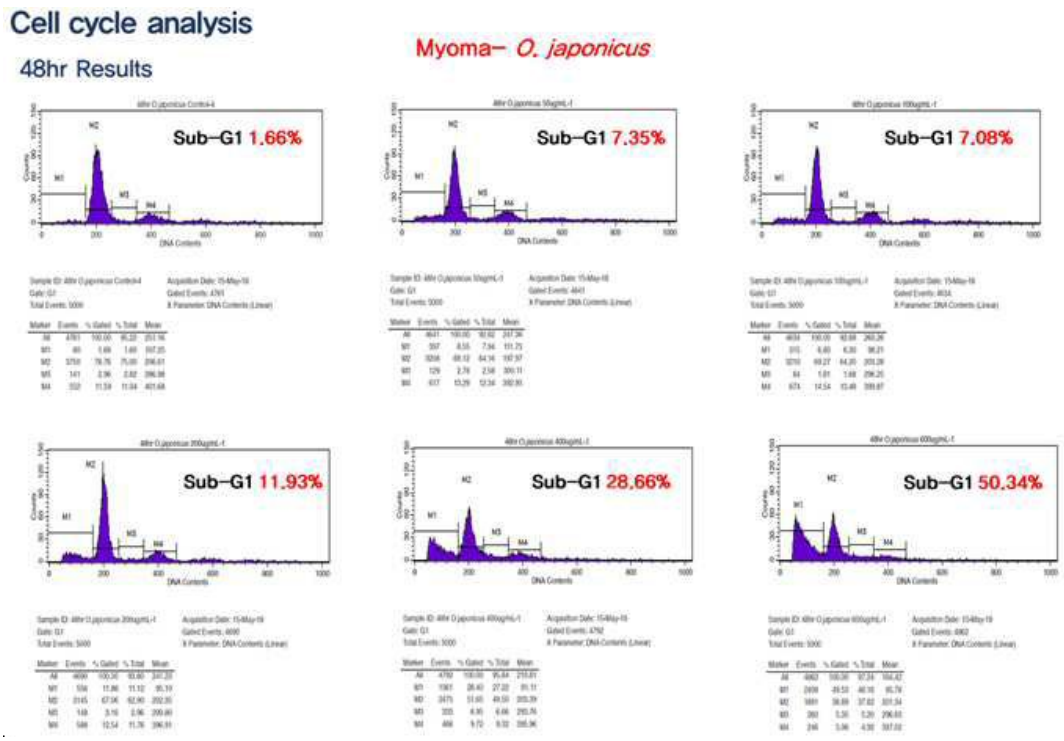
도면2d


Annexin V + PI Apoptosis Assay
O. japonicus
24h Leiomyoma cells
48h Leiomyoma cells
72h Leiomyoma cells
% Apoptosis
Control
O. japonicus 50μg/mL
O. japonicus 100μg/mL
O. japonicus 200μg/mL
O. japonicus 400μg/mL
O. japonicus 600μg/mL

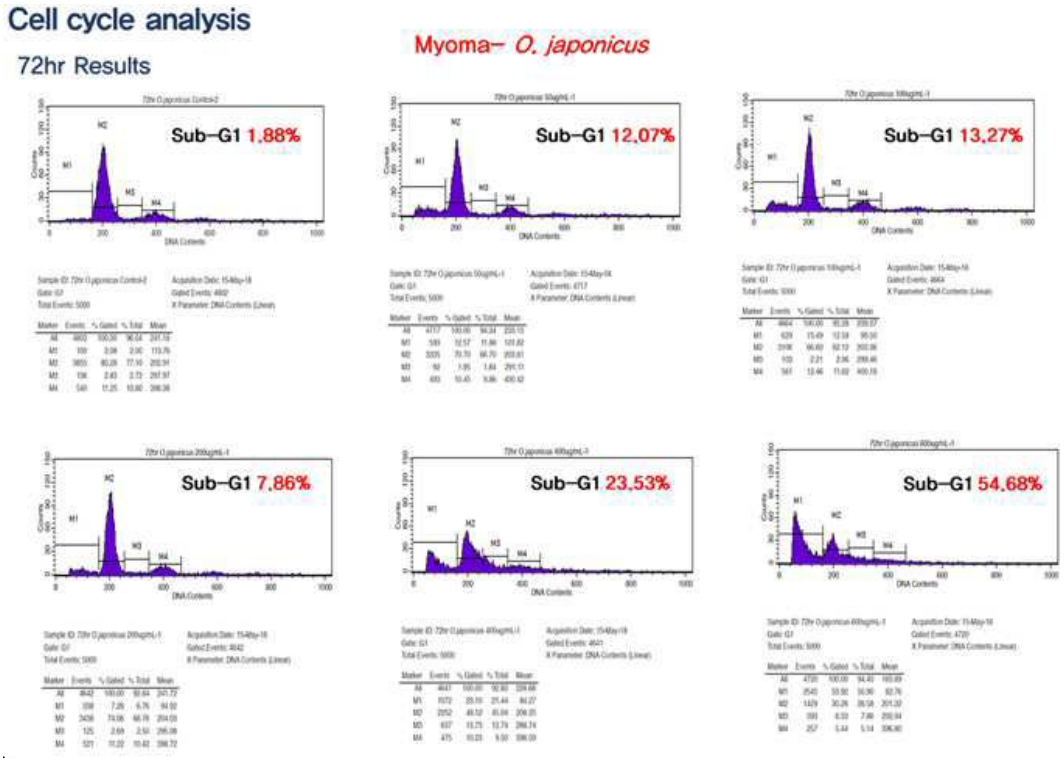
도면3a


Cell cycle analysis
24hr Results
Myoma– O. japonicus
Sub-G1 0.45%
Sub-G1 3.19%
Sub-G1 5.33%
Sub-G1 6.44%
Sub-G1 15.64%
Sub-G1 42.04%

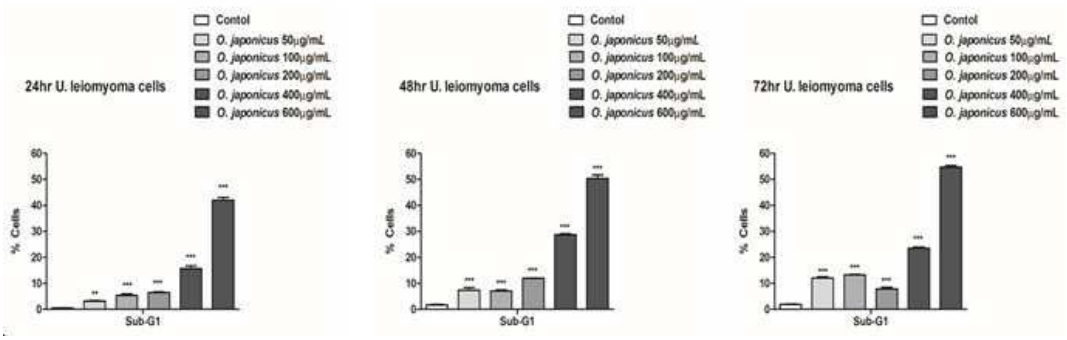
도면3b


Cell cycle analysis
48hr Results
Myoma– O. japonicus
Sub-G1 1.66%
Sub-G1 7.35%
Sub-G1 7.08%
Sub-G1 11.93%
Sub-G1 28.66%
Sub-G1 50.34%

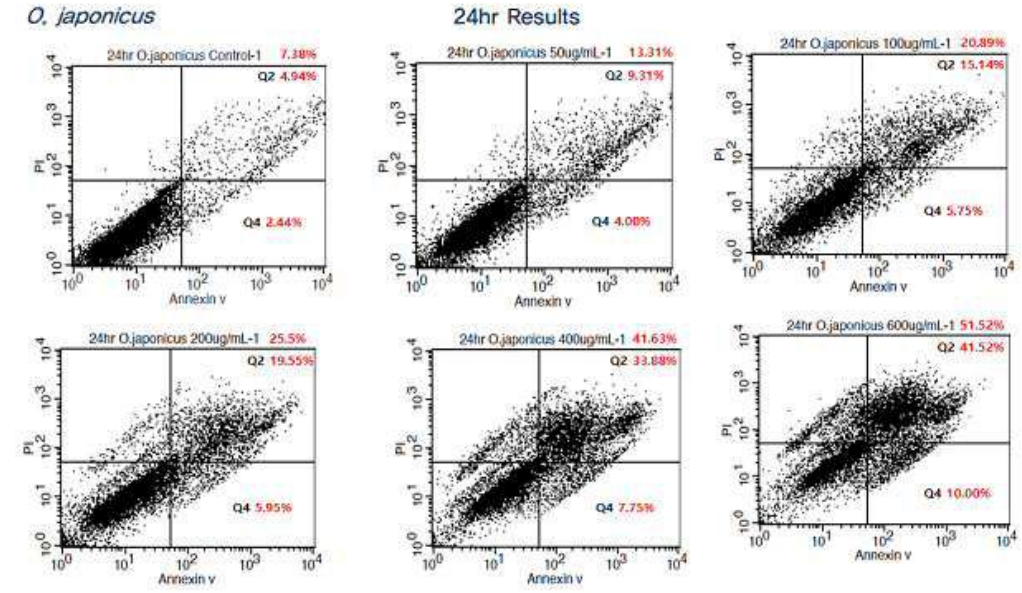
도면3c


Cell cycle analysis
72hr Results
Myoma– O. japonicus
Sub-G1 1.88%
Sub-G1 12.07%
Sub-G1 13.27%
Sub-G1 7.86%
Sub-G1 23.53%
Sub-G1 54.68%

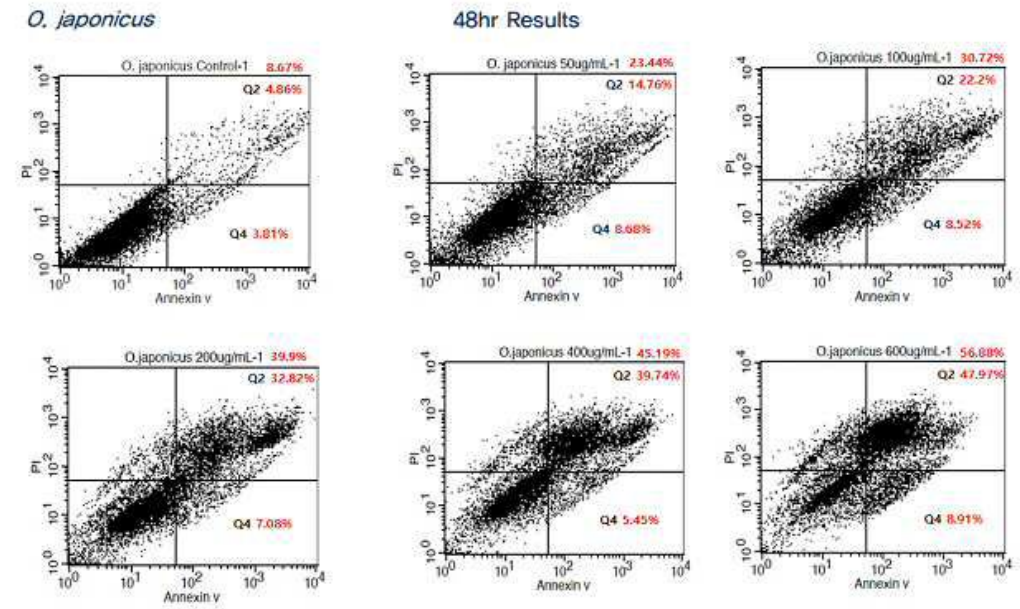
도면3d


24hr U. leiomyoma cells
48hr U. leiomyoma cells
72hr U. leiomyoma cells
Contol
O. japonicus 50μg/mL
O. japonicus 100μg/mL
O. japonicus 200μg/mL
O. japonicus 400μg/mL
O. japonicus 600μg/mL
% Cells
Sub-G1

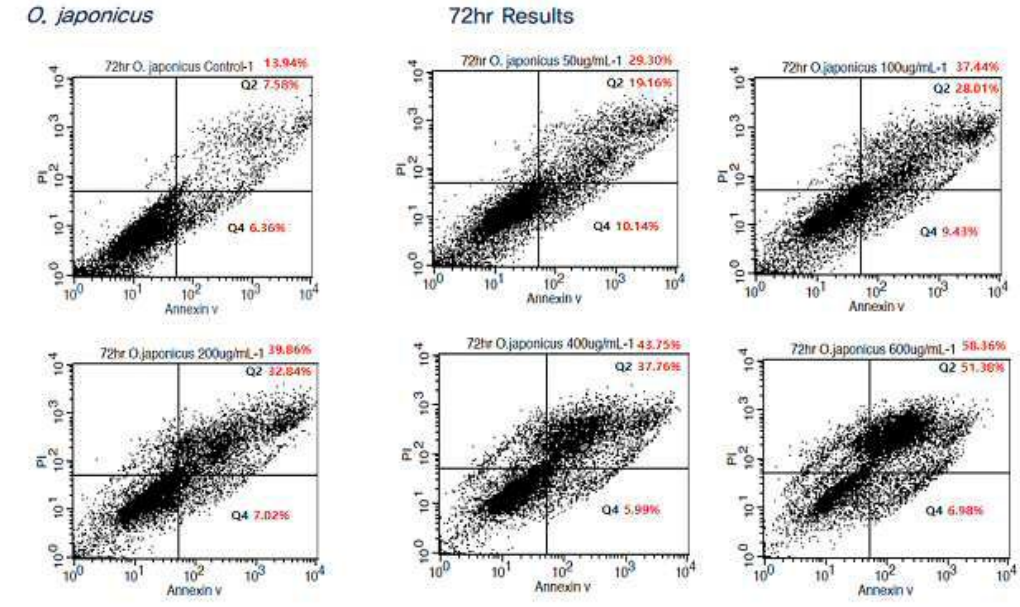
도면4a


O. japonicus
24hr Results
24hr O.japonicus Control-1 7.38%
Q2 4.94%
Q4 2.44%
24hr O.japonicus 50ug/mL-1 13.31%
Q2 9.31%
Q4 4.00%
24hr O.japonicus 100ug/mL-1 20.89%
Q2 15.14%
Q4 5.75%
24hr O.japonicus 200ug/mL-1 25.5%
Q2 19.55%
Q4 5.95%
24hr O.japonicus 400ug/mL-1 41.63%
Q2 33.88%
Q4 7.75%
24hr O.japonicus 600ug/mL-1 51.52%
Q2 41.52%
Q4 10.00%
PI
Annexin v

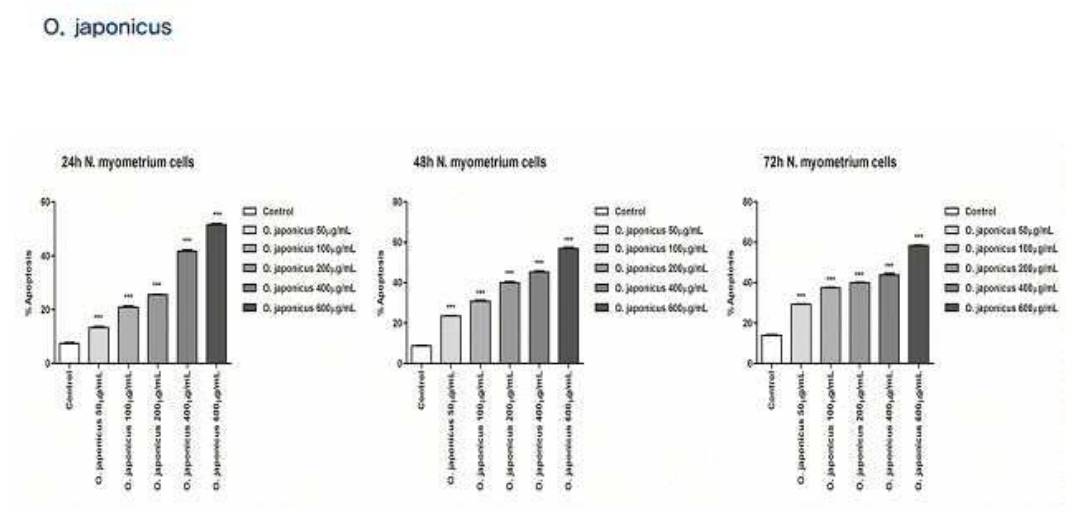
도면4b


O. japonicus
48hr Results
O. japonicus Control-1 8.67%
Q2 4.86%
Q4 3.81%
O. japonicus 50ug/mL-1 23.44%
Q2 14.76%
Q4 8.68%
O.japonicus 100ug/mL-1 30.72%
Q2 22.2%
Q4 8.52%
O.japonicus 200ug/mL-1 39.9%
Q2 32.82%
Q4 7.08%
O.japonicus 400ug/mL-1 45.19%
Q2 39.74%
Q4 5.45%
O.japonicus 600ug/mL-1 56.88%
Q2 47.97%
Q4 8.91%
PI
Annexin v

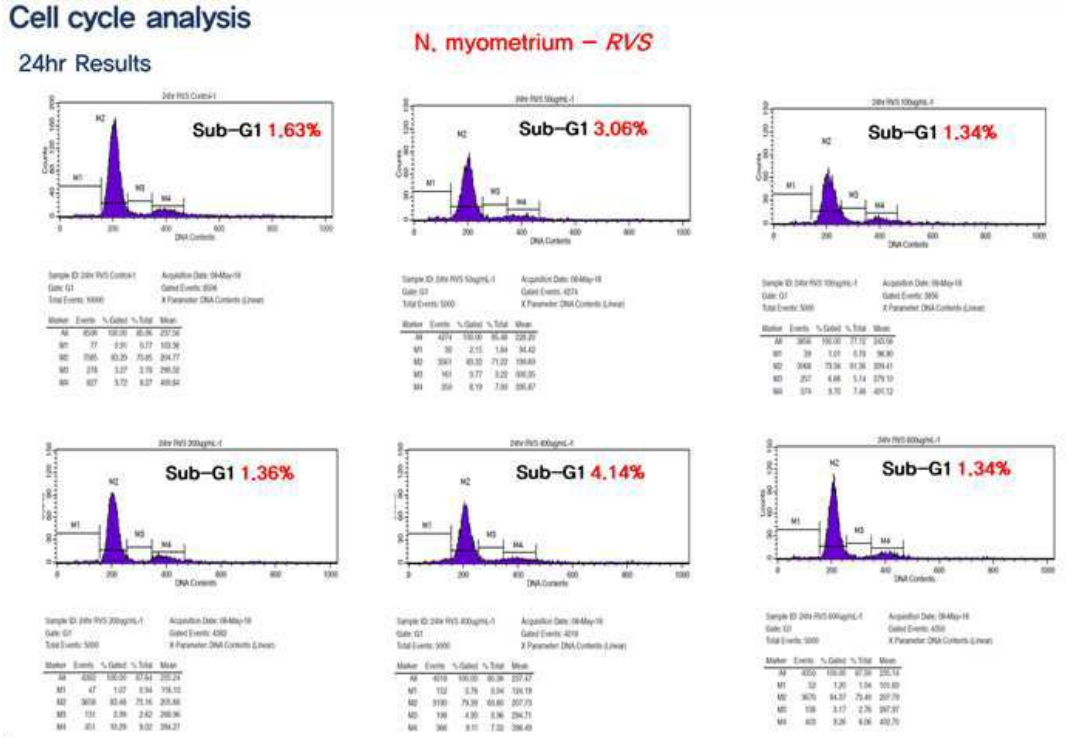
도면4c


O. japonicus
72hr Results
72hr O. japonicus Control-1 13.94%
Q2 7.58%
Q4 6.36%
72hr O. japonicus 50ug/mL-1 29.30%
Q2 19.16%
Q4 10.14%
72hr O.japonicus 100ug/mL-1 37.44%
Q2 28.01%
Q4 9.43%
72hr O.japonicus 200ug/mL-1 39.86%
Q2 32.84%
Q4 7.02%
72hr O.japonicus 400ug/mL-1 43.75%
Q2 37.76%
Q4 5.99%
72hr O.japonicus 600ug/mL-1 58.36%
Q2 51.38%
Q4 6.98%
PI
Annexin v

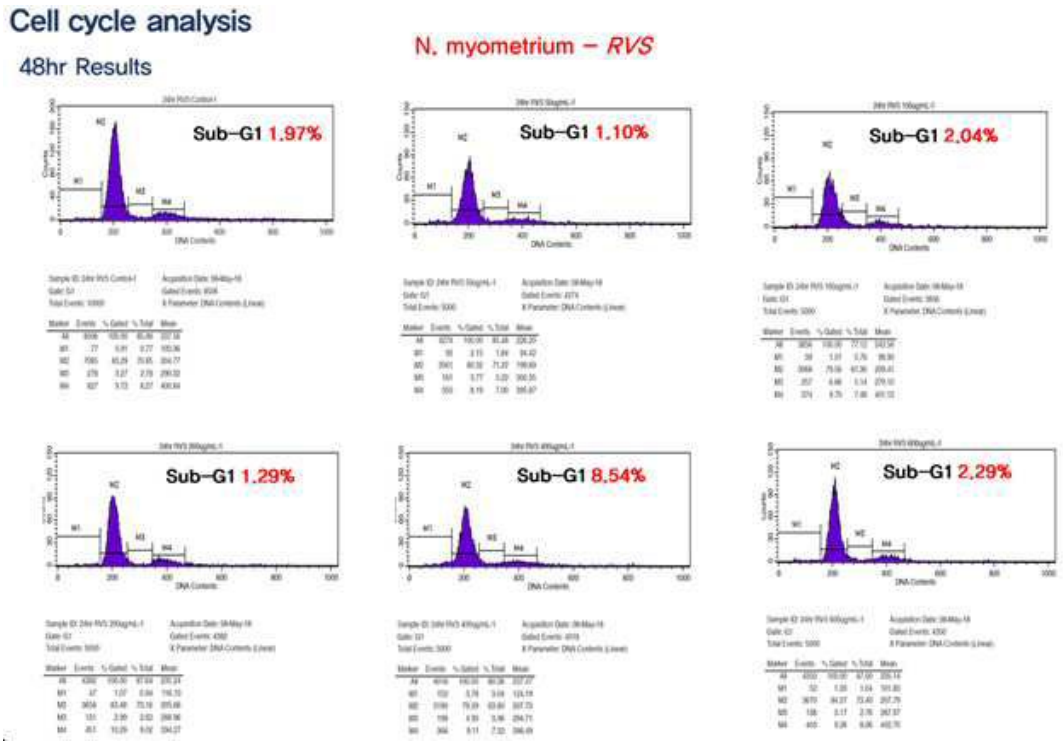
도면4d


O. japonicus
24h N. myometrium cells
48h N. myometrium cells
72h N. myometrium cells
% Apoptosis
Control
O. japonicus 50μg/mL
O. japonicus 100μg/mL
O. japonicus 200μg/mL
O. japonicus 400μg/mL
O. japonicus 600μg/mL

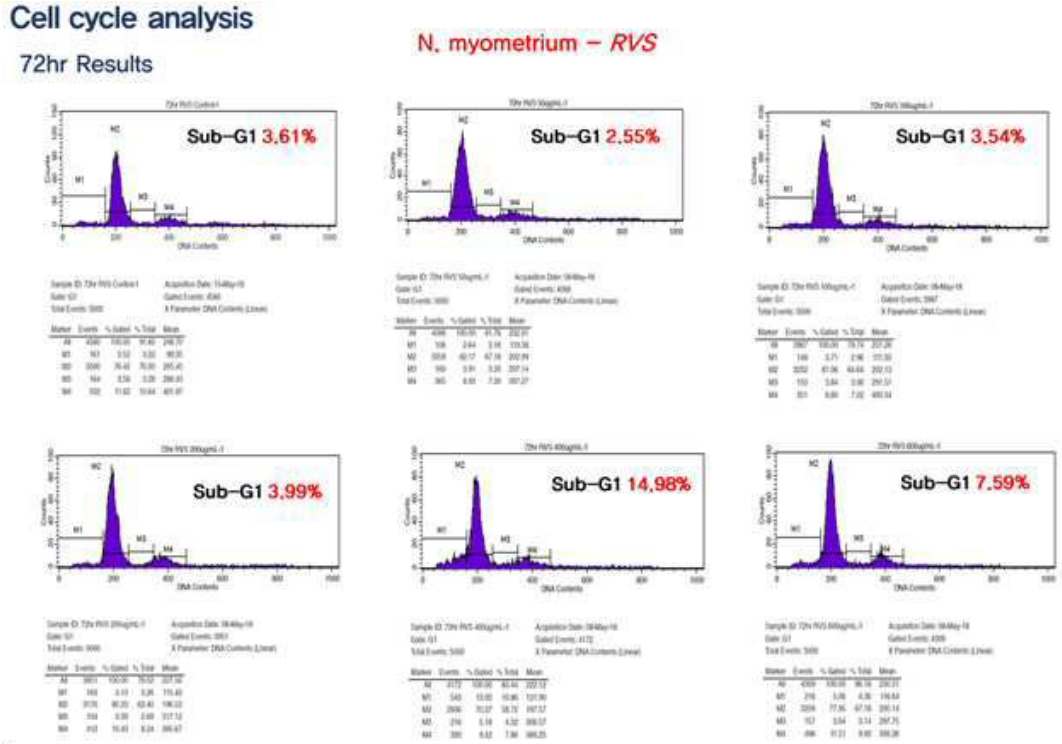
도면5a


Cell cycle analysis
24hr Results
N. myometrium – RVS
Sub-G1 1.63%
Sub-G1 3.06%
Sub-G1 1.34%
Sub-G1 1.36%
Sub-G1 4.14%
Sub-G1 1.34%

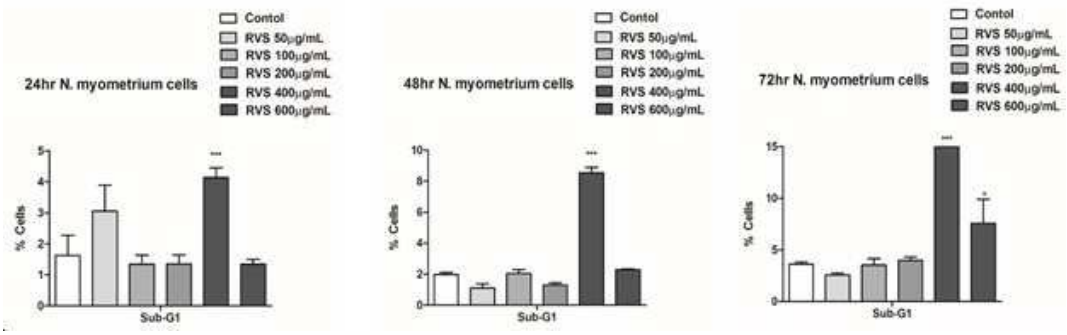
도면5b


Cell cycle analysis
48hr Results
N. myometrium – RVS
Sub-G1 1.97%
Sub-G1 1.10%
Sub-G1 2.04%
Sub-G1 1.29%
Sub-G1 8.54%
Sub-G1 2.29%

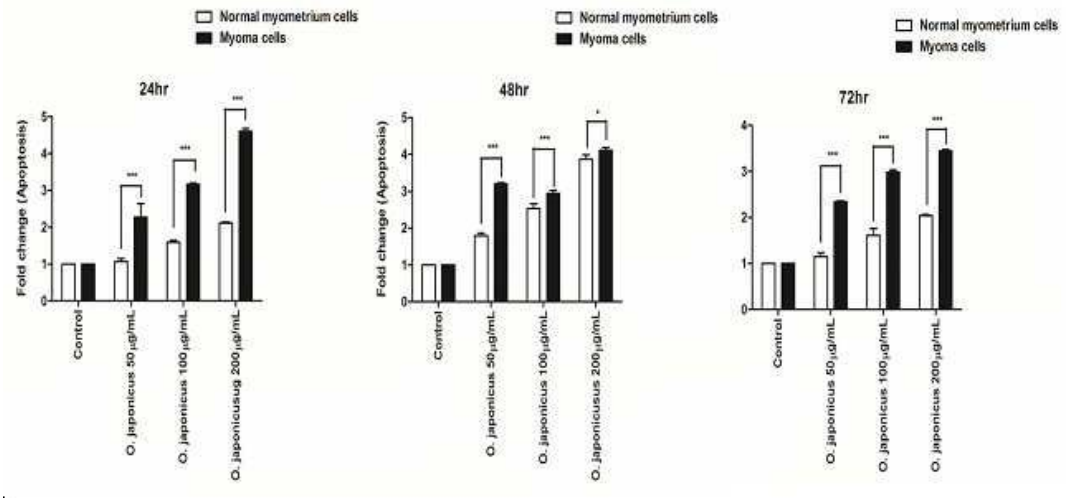
도면5c


Cell cycle analysis
72hr Results
N. myometrium – RVS
Sub-G1 3.61%
Sub-G1 2.55%
Sub-G1 3.54%
Sub-G1 3.99%
Sub-G1 14.98%
Sub-G1 7.59%

도면5d



도면6a



도면6b

