



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0162920
(43) 공개일자 2022년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/10 (2022.01) A23L 33/105 (2016.01)
A23P 10/20 (2016.01) A23P 10/28 (2016.01)
A61K 36/284 (2006.01) A61K 36/484 (2006.01)
A61K 36/754 (2006.01) A61K 36/815 (2006.01)
A61P 15/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/10 (2022.01)
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2021-0070886

(22) 출원일자 2021년06월01일

심사청구일자 2021년06월01일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

재단법인 자생의료재단

서울특별시 강남구 강남대로 538(논현동)

(72) 발명자

박경선

서울특별시 성동구 매봉길 15, 103동 1002호(옥수동, 래미안 옥수 리버젠)

조익현

서울특별시 서초구 신반포로 32, 19동 509호(반포동, 반포아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 10 항

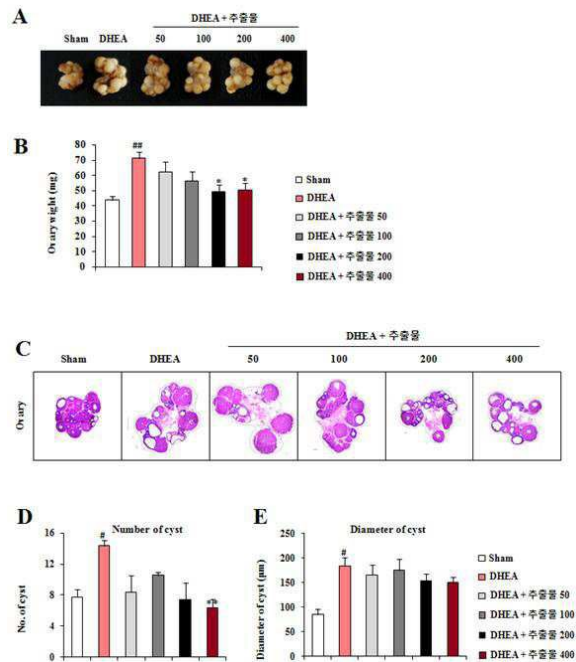
(54) 발명의 명칭 감초, 창출, 오수유 및 구기자 추출물을 포함하는 다낭성 난소 증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 감초(*Glycyrrhizae Radix*), 창출(*Atractylodis Rhizoma*), 오수유(*Evodiae Fructus*) 및 구기자(*Lycii Fructus*) 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 다낭성 난소 증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 감초, 창출, 오수유 및 구기자 혼합 추출물은 디하이드로에피안드로스테론

(뒷면에 계속)

대표도 - 도3



(Dehydroepiandrosterone, DHEA)로 다낭성 난소 증후군이 유도된 마우스 모델에서, 체중 및 혈청 테스토스테론의 농도가 감소하는 것을 확인하였으며, 난소에서는 난소의 크기 감소, 조직학적 변화 및 낭포수 감소효과를 확인하였으며, 자궁에서는 자궁의 크기 감소, 조직학적 변화 및 자궁의 직경이 감소한 것을 확인하였다. 또한, 난소 및 자궁의 염증 및 세포자멸사와 관련된 인자인 p-IkB, p-NFkB, Cleaved caspase-3 및 Progesterone receptor의 발현이 감소한 것을 확인하여, 본 발명의 혼합 추출물이 다낭성 난소증후군의 치료 및 개선에 효과가 있는 것을 확인하였다.

(52) CPC특허분류

A23P 10/20 (2016.08)
A23P 10/28 (2016.08)
A61K 36/284 (2013.01)
A61K 36/484 (2013.01)
A61K 36/754 (2013.01)
A61K 36/815 (2013.01)
A61P 15/08 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

오진희

경기도 구리시 동구릉로238번길 20, 107동 1210호
 (인창동)

(72) 발명자

최종희

경상북도 경주시 외동읍 입실시장길 12-3

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711051458
과제번호	2017R1C1B1006387
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	일반연구자지원사업
연구과제명	다낭성난소증후군으로 인한 난임에서의 배란장애와 자궁내막 수용성 개선을 위한 한
약제제의 치료효과 및 기전 연구	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	강동경희대학교병원
연구기간	2018.03.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711089337
과제번호	2017R1C1B1006387
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	일반연구자지원사업
연구과제명	다낭성난소증후군으로 인한 난임에서의 배란장애와 자궁내막 수용성 개선을 위한 한
약제제의 치료효과 및 기전 연구	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	재단법인 자생의료재단
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

감초(*Glycyrrhizae Radix*), 창출(*Atractylodis Rhizoma*), 오수유(*Evodiae Fructus*) 및 구기자(*Lycii Fructus*) 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 다낭성 난소 증후군의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 혼합 추출물은, 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 저급 알코올 수용액, 헥산 또는 아세톤으로 추출되는 것을 특징으로 하는 다낭성 난소 증후군의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 혼합 추출물은, 감초, 창출, 오수유 및 구기자는 1 : 1 : 1 : 1의 중량비로 혼합된 것을 특징으로 하는 다낭성 난소 증후군의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 혼합 추출물은 혈청 테스토스테론을 감소시키는 것을 특징으로 하는 다낭성 난소 증후군의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 혼합 추출물은 난소 염증반응 인자인 IkB, NF-κB의 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는 다낭성 난소 증후군의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 혼합 추출물은 세포 자멸사 인자인 cleaved caspase-3의 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는 다낭성 난소 증후군의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 혼합 추출물은 세포 자궁의 무게, 자궁의 직경 및 자궁의 점막 두께를 감소시키는 것을 특징으로 하는 다낭성 난소 증후군의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 다낭성 난소 증후군 관련 질환은 고안드로겐 혈증, 무월경, 과소월경, 기능 이상성 자궁출혈, 조기폐경, 난임 및 자궁내막증으로 이루어진 군에서 선택된 1이상인 것을 특징으로 하는 다낭성 난소 증후군의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

감초(*Glycyrrhizae Radix*), 창출(*Atractylodis Rhizoma*), 오수유(*Evodiae Fructus*) 및 구기자(*Lycii Fructus*) 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 다낭성 난소 증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 다낭성 난소 증후군 관련 질환은 고안드로겐 혈증, 무월경, 과소월경, 기능 이상성 자궁출혈, 조기폐경, 난임 및 자궁내막증으로 이루어진 군에서 선택된 1이상인 것을 특징으로 하는 다낭성 난소 증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 감초(*Glycyrrhizae Radix*), 창출(*Atractylodis Rhizoma*), 오수유(*Evodiae Fructus*) 및 구기자(*Lycii Fructus*) 추출물을 함유하는 다낭성 난소 증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 다낭성 난소 증후군은 가임 여성의 4~12%가 영향을 받고 있는 내분비대사 질환이다. 1990년 미국 국립보건원(National Institutes of Health)에서 제시한 다낭성 난소 증후군의 진단 기준은 만성 무배란 및 임상적 또는 생화학적 고안드로겐 혈증의 두 가지 모두를 요구한다. 반면 2003년 개정된 유럽/미국 생식내분비학회 연합의 진단 기준은 만성 무배란, 임상적 또는 생화학적 고안드로겐 혈증, 그리고 커진 난소의 가장자리를 따라 10여개의 작은 난포가 염주모양을 하고 있는 양상의 세 가지 기준 중에서 두 가지 이상을 만족하는 경우에 다낭성 난소 증후군으로 정의하고 있다.

[0003] 아직 다낭성 난소 증후군의 발병 원인은 명확히 밝혀지지 않고 있다. 다른 복합성 질환들과 마찬가지로 다낭성 난소 증후군의 발병에도 유전적 인자 및 환경적 인자가 모두 작용하는 것으로 여겨진다. 연구의 기법이 발달해 가면서 일차적 병태 생리의 초점은 난소에서 시상하부-뇌하수체 축으로 옮겨갔고, 이후 인슐린 작용의 결함 쪽으로 옮겨가고 있는 추세이다. 다양한 유전학적 요인과 다낭성 난소 증후군의 연관성에 관한 연구 결과들이 보고되고 있지만, 아직까지 임상적으로 적용 가능한 유전학적 검사는 없는 상태이다.

[0004] 다낭성 난소 증후군의 증상으로는 (1) 희발월경(oligomenorrhea)이나 무월경(amenorrhea), (2) 안드로겐과다혈증(hyperandrogenism) 및/또는 남성호르몬과다증(hyperandrogenemia), (3) 형태학적인 다낭(polycystic ovary morphology)이다. 이외에도 나이와 몸무게를 대상으로 한 조사를 토대로 살펴보면 대조군과 비교해서 약 50%의 다낭성 난소 증후군 여성에게서 혈청 내 황체형성 호르몬의 과분비(luteinizing hormone hypersecretion), 인슐린 저항성(insulin resistance), 및 보상적 고인슐린혈증(compensatory hyperinsulinemia) 등의 생화학적 특징이 공통적으로 나타난다.

[0005] 다낭성 난소 증후군 관련 질환의 일례로, 난소부전증(premature ovarian failure)은 난소기능이 정상적으로 작용하지 않는 경우에 발생하는 것으로서 배란성 주기 부정증(不整症), 황체 기능 부전증, 무배란성 주기 부정증으로 분류한다. 무배란성 주기증은 사춘기, 갱년기에서는 생리적으로도 나타나지만 성숙부인에서는 불임이 된다. 황체 기능 부전증은 황체 기능의 퇴행이 빨라, 불임과 유산의 원인이 된다. 배란성 주기 부정증은 주기의 길이에만 이상이기 때문에 난포기의 길이의 이상 때문으로 보고 있다. 이러한 난소 부전증은 기본적으로 연령이 많아져 폐경이 될 시기가 오면 폐경기 증상으로 나타날 수도 있지만 비정상적으로 40세 미만에서 이러한 증상이 나타나 임신에 어려움이 발생하기도 한다. 이러한 상태에서 증상이 더 악화되면 조기폐경으로 이어지게 된다.

[0006] 또한, 난소 기능의 감소로 야기된 시상하부-뇌하수체-난소로 이어지는 성선 축의 기능 실조가 원인이 되고 이로 인하여 성호르몬, 지질 및 심혈관계 대사, 골대사, 기억 작용 등의 신체 및 정신적인 변화가 나타난다. 갱년기의 시작은 폐경과 더불어 시작되며 폐경기 여성은 호르몬 불균형과 갈습 결핍 및 체내 산화적 스트레스 증가로 여러 질병의 위험에 처하게 된다. 즉, 폐경기의 에스트로겐 변화로 관상동맥 질환, 골다공증, 알츠하이머 등 질환의 발병률은 급증하게 되고, 특히 폐경기 이후 에스트로겐 감소는 급속한 골 손실을 초래하게 된다.

[0007] 한편, 감초(甘草, *Glycyrrhizae Radix*)는 인체의 비위(脾胃)를 건강하게 할 뿐만 아니라 오장육부의 한열사기(寒熱邪氣)를 치료하고 근골을 튼튼하게 할 뿐만 아니라 각종 종기와 부스럼 등을 치료하고 온갖 약초의 독을 해독시키는 작용을 가지며 폐의 활동을 돕고 청열해독(淸熱解毒)의 효과가 큰 약초이다. 또한, 각종 약품의 중독 및 식물의 중독을 해독할 뿐만 아니라, 특유의 향과 맛을 갖기 때문에 감초는 고래로 한방에서 없어서는 안 될 기본적인 유용한 약제로 사용되어 오고 있다. 감초의 주요 성분으로는 감미질인 글리시리진, 플라보노이드의 일종인 리키리틴, 서당, 포도당, 만니톨, 아스파라긴 등을 들 수 있다. 특히 글리시리진은 감초에 독특한 단맛을 부여하는 성분이다.

[0008] 창출(蒼朮, *Atractylodis Rhizoma*)은 중국의 화북, 산서 등에 분포하는 국화(Compositae)과 식물인 높이 80 cm에 이르는 여러해살이 풀인 삼주(*Atractylodes japonica* KOIDZ.)속의 뿌리줄기로써 길이 3-10 cm, 지름 10-25 mm의 불규칙하게 구부러진 원주형으로 바깥면은 어두운 회갈색-어두운 황갈색이다. 횡단면은 거의 원형이고, 엷은 갈색-적갈색의 분비물에 의한 가는 점이 있으며, 약리작용으로 건위작용, 이뇨작용, 발한작용, 진정작용,

혈당저하작용, 강장작용 등이 있는 것으로 알려져 있다. 창출은 봄 또는 가을에 캐서 물에 씻어 잔뿌리를 다듬고 햇볕에 말린 것으로 다년생 초본으로 각지의 산에 자란다. 삽주의 뿌리(창출)에는 약 1.5%의 정유와 카로틴, 이눌린, 고무질, 알카로이드 반응이 있고, 또한 전초는 사포닌, 쿠마린 반응이 있다. 옛 동의문헌의 서술 자료와 그림을 보면 조선 삽주의 뿌리가 창출에 보다 해당된다 할 수 있으며, 창출은 달고 맵고 따뜻하여 진정작용, 조혈작용, 오줌내기작용이 있으며, 동의치료에서는 실증에 의한 콩팥기능장애로 오줌이 적을 때, 위장염, 붓기, 어지러움증과 온몸이 아플 때 오줌내기, 땀내기 약 등으로 동의처방에 배합하는 매우 중요한 한약이다. 민간에서는 설사와 토하는 것을 멈추게 하는 데와 소화불량증, 당뇨병, 기침 및 통풍치료에 종종 사용하여 오래 먹으면 장수한다는 말이 전해져 오고 있다.

[0009] 오수유(吳茱萸, *Evodiae Fructus*)는 중국 원산으로 경주지방에서 심고 있으며, 높이가 5 m에 달하고 어린 가지에 털이 있다. 한방에서는 열매를 약재로 이용한다. 성분은 휘발성 정유를 함유하고 있는데, 주성분은 에보덴(evoden), 오시멘(ocimene), 에보딘(evodin)이며, 알칼로이드 성분으로 에보디아민(evodiamine), 루타에카르핀(rutaecarpine)이 들어 있다. 건위, 구충, 해독 및 이뇨제로 사용한다고 알려져 있으며, 항암활성, 항염증작용, 심혈관계질환관련 효능, 간경화억제 효능 등이 보고되었다.

[0010] 구기자(枸杞子, *Lycii Fructus*)는 가지과에 속하는 낙엽송 소관목으로, 아시아 지방이 원산지이며, 우리나라의 충남 청양군과 전남 진도군을 비롯한 중국, 대만, 일본, 유럽 등지에 자생하거나 재배되고 있다. 생약제로 열매인 구기자는 세포복제, 메티오닌(methionine) 대사, 해독반응에 중요한 역할을 담당하는 베타인, 베타카로틴, 콜레스테롤, 글리신, 리놀산, 니코틴산, 피실린(physlien, zeaxanthin dipalmitate), 비타민 B1, 비타민 B2 등이 함유되어 있으며, 잎인 구기엽에는 cytidylic acid B, 하이포잔틴(hypoxanthine), 이노신(inosine), 피로글루탐산(pyroglutamic acid) 등이 함유되어 있다. 뿌리인 지골피(地骨皮)에는 항균성을 지닌 시나믹 산(cinnamic acid)와 쿠코아민(kukoamine) A, 리놀레익 산(linoleic acid) 등이 존재한다. 구기자는 몸이 허약하여 생신 병을 다스리고 근골을 단단하게 하며 눈에 좋다.

[0011] 본 발명의 감초, 창출, 오수유 및 구기자는 단독으로 항염, 항암, 대사성 질환 및 다양한 적응증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물이 알려져 있으나, 이들을 혼합한 추출물의 다량성 난소 증후군에 대한 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대해서는 알려지지 않았다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 감초(*Glycyrrhizae Radix*), 창출(*Atractylodis Rhizoma*), 오수유(*Evodiae Fructus*) 및 구기자(*Lycii Fructus*) 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 다량성 난소 증후군의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 감초(*Glycyrrhizae Radix*), 창출(*Atractylodis Rhizoma*), 오수유(*Evodiae Fructus*) 및 구기자(*Lycii Fructus*) 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 다량성 난소 증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 감초(*Glycyrrhizae Radix*), 창출(*Atractylodis Rhizoma*), 오수유(*Evodiae Fructus*) 및 구기자(*Lycii Fructus*) 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 다량성 난소 증후군의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 감초(*Glycyrrhizae Radix*), 창출(*Atractylodis Rhizoma*), 오수유(*Evodiae Fructus*) 및 구기자(*Lycii Fructus*) 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 다량성 난소 증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 감초(*Glycyrrhizae Radix*), 창출(*Atractylodis Rhizoma*), 오수유(*Evodiae Fructus*) 및 구기자(*Lycii Fructus*) 혼합 추출물은 디하이드로에피안드로스테론(Dehydroepiandrosterone, DHEA)로 다량성 난소 증후군이 유도된 마우스 모델에서, 체중 및 혈청 테스토스테론의 농도가 감소하는 것을 확인하였으며, 난소에서는 난소의 크기 감소, 조직학적 변화 및 낭포수 감소효과를 확인하였으며, 자궁에서는 자궁의 크기 감소, 조직학적 변화

및 자궁의 직경이 감소한 것을 확인하였다. 또한, 난소 및 자궁의 염증 및 세포자멸사와 관련된 인자인 p-IkB (phospho I-kappa-B), p-NF-kB (phospho nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), Cleaved caspase-3 및 Progesterone receptor의 발현이 감소한 것을 확인하여, 본 발명의 혼합 추출물이 다낭성 난소증후군의 치료 및 개선에 효과가 있는 것을 확인하여, 관련 산업에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 본 발명의 혼합추출물을 투여한 마우스에서, 투여 후 20일 후의 체중을 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 혼합추출물을 투여한 마우스에서, 투여 후 20일 후의 혈청 테스토스테론 농도를 정량화 한 것이다.
- 도 3은 본 발명의 혼합추출물을 투여한 마우스에서, 투여 후 20일 후의 난소를 관찰한 것이다(A: 난소 크기 육안 관찰, B: 난소 무게 비교, C: 난소 H&E 염색 관찰, D: 낭포 수 정량화, E: 낭포 지름 정량화).
- 도 4는 본 발명의 혼합추출물을 투여한 마우스에서, 투여 후 20일 후의 자궁을 관찰한 것이다(A: 자궁 육안 관찰, B: 자궁 H&E 염색 관찰, C: 자궁 직경 정량화).
- 도 5는 본 발명의 혼합추출물을 투여한 마우스에서, 투여 후 20일 후의 난소 염증 관련 인자 및 세포자멸사 인자의 발현을 웨스턴 블랏으로 확인한 도이다(A: 웨스턴 블랏 결과, B: p-IkB 정량화, C: p-NFkB 정량화, D: Cleaved caspase-3 정량화).
- 도 6은 본 발명의 혼합추출물을 투여한 마우스에서, 투여 후 20일 후의 자궁 염증반응 및 세포자멸사 인자의 발현을 웨스턴 블랏으로 확인한 도이다(A: 웨스턴 블랏 결과, B: p-IkB 정량화, C: p-NFkB 정량화, D: Cleaved caspase-3 정량화, E: Progesterone receptor 정량화).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명은 감초(*Glycyrrhizae Radix*), 창출(*Atractylodis Rhizoma*), 오수유(*Evodiae Fructus*) 및 구기자(*Lycii Fructus*) 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 다낭성 난소 증후군의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명에서 사용되는 용어 “예방”은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0020] 본 발명에서 사용되는 용어 “개선”은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0021] 본 발명의 식품 조성물은 본 발명의 유효성분을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0022] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 상기 약학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조 식품류 등이 있다.
- [0023] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 추출물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제를 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 기능성 식품 조성물은 다낭성 난소 증후군의 예방 또는 치료 목적으로, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공될 수 있다. 본 발명에서 '건강기능성 식품 조성물'이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하

며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 목적으로 섭취하는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 '식품 첨가물 공전'에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다. 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분을 부형제, 결합제, 봉해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다. 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다. 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분과 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다. 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분의 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

- [0025] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 감초, 창출, 오수유 및 구기자 혼합 추출물은, 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 저급 알코올 수용액, 헥산 또는 아세톤으로 추출되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 물이다.
- [0026] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 혼합 추출물은, 감초, 창출, 오수유 및 구기자는 1 : 1 : 1 : 1의 중량비로 혼합된 것일 수 있으며, 감초, 창출, 오수유 및 구기자로 이루어진 군에서 1이상의 것이, 상기의 혼합비 미만으로 혼합되면, 약제학적으로 유효하지 않으며, 상기 혼합비를 초과하여 혼합되면, 세포독성과 같은 부작용이 나타날 수 있어, 상기의 혼합비가 최적인 것이다.
- [0027] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 혼합 추출물은 혈청 테스토스테론을 감소시키는 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 혼합 추출물은 난소 염증반응 인자인 IkB, NF-kB의 발현을 억제시키는 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 혼합 추출물은 세포 자멸사 인자인 cleaved caspase-3의 발현을 억제시키는 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 혼합 추출물은 세포 자궁의 무게, 자궁의 직경 및 자궁의 점막 두께를 감소시키는 것일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 다낭성 난소 증후군 관련 질환은 고안드로겐 혈증, 무월경, 과소월경, 기능 이상성 자궁 출혈, 조기폐경, 난임 및 자궁내막증으로 이루어진 군에서 선택된 1이상인 것일 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명은 감초(*Glycyrrhizae Radix*), 창출(*Atractylodis Rhizoma*), 오수유(*Evodiae Fructus*) 및 구기자(*Lycii Fructus*) 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 다낭성 난소 증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0034] 본 발명에서 “약제학적으로 허용가능한”이란 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 활성 물질의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 것을 의미한다.
- [0035] 본 발명에서 사용되는 용어 “치료”는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0036] 본 발명의 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(adjutant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있으나, 예를 들어 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 더 포함하여 그 효과를 증가시킬 수 있다.
- [0037] 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분을 약제학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서,

약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0038] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0039] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0040] 본 발명에 따른 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0041] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 개체의 연령, 체중, 성별, 신체 상태 등을 고려하여 선택된다. 상기 약학 조성물 중 포함되는 유효성분의 농도는 대상에 따라 다양하게 선택할 수 있음은 자명하며, 바람직하게는 약학 조성물에서 0.01 ~ 5,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 포함되는 것이다. 그 농도가 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 미만일 경우에는 약학 활성이 나타나지 않을 수 있고, 5,000 $\mu\text{g/ml}$ 를 초과할 경우에는 인체에 독성을 나타낼 수 있다.

[0043] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0045] <실시예 1> 다낭성 난소 증후군 동물모델

[0046] <1-1> 동물모델 및 실험군 분류

[0047] Sprague Dawley 계통의 암컷 흰쥐(Narabiotec Co., Ltd., Seoul, Republic of Korea; 6주령)를 명암주기(명주기 08:00 to 20:00)와 일정한 온도($23 \pm 2^\circ\text{C}$)와 습도($55 \pm 15\%$)가 유지되는 실험환경에서, 사료와 물을 자유롭게 공급하며 사육하였다. 상기 동물들은 실험 1주일 전에 실험환경에 적응시켰다. 7주령(42 일령)의 흰쥐($165 \pm 3 \text{ g}$)를 실험군 당 5마리씩 배치하였다. 실험 군으로는 1)Sham 군: Sesame oil (60 mg/kg/day)을 피하로 투여하고 생리식염수를 구강으로 투여한 군; 2) DHEA군: 디하이드로에피안드로스테론(Dehydroepiandrosterone, DHEA) (60 mg/kg/day)를 피하로 투여하고, 생리식염수를 구강으로 투여한 군; 및 3) DHEA + 추출물 군: DHEA (60 mg/kg/day)를 피하로 투여하고, 복합 추출물(50, 100, 200 및 400 mg/kg/day)을 구강으로 투여한 군;으로 분류 하였다.

[0049] <1-2> 다낭성 난소 증후군의 유도

[0050] DHEA에 의한 다낭성난소증후군의 동물모델을 유도하기 위하여 기존의 논문(에 있는 방법을 활용하였다(Jang et al., 2018). 구체적으로는 DHEA (Millipore, Darmstadt, Germany)를 100% ethyl alcohol에 녹인 다음에 sesame oil (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 희석하였다. DHEA 혼합액(DHEA 60 mg/kg/day)을 20일 동안 하루에 한 번씩 등쪽의 피하로 투여하였다. Sham군에는 DHEA가 포함되지 않은 sesame oil을 투여하였다.

[0052] <실시예 2> 감초, 창출, 오수유 및 구기자 혼합 추출물의 제조

[0053] 본 발명의 복합 추출물을 제조하기 위하여, 건조된 감초(*Glycyrrhizae Radix*), 창출(*Atractylodis Rhizoma*), 오수유(*Evodiae Fructus*) 및 구기자(*Lycii Fructus*)를 1:1:1:1의 비율로 혼합하여 총 250 g을 추출에 사용하였다. 혼합한 약제를 환류추출기에 증류수 2.5 L와 함께 넣고, 1.5시간 동안 방치한 다음에 가열하여 탱크가 끓기 시작하는 시점부터 1.5시간 동안 더 가열하였다. 추출액을 여과지로 감압하여 여과한 후, 여과액을 진공감압농축기를 사용하여 농축액을 만든 다음 동결건조기를 이용하여 분말시료로 조제하였다.

[0055] <실시예 3> 감초, 창출, 오수유 및 구기자 혼합 추출물의 체중 변화 확인

[0056] 실험동물에 DHEA를 투여하면, 실험동물의 체내에 testosterone의 양이 증가하여 융성화되어서 체중이 증가하게 되며(Kim EJ, Jang M, Choi JH, Park KS, Cho IH. An Improved Dehydroepiandrosterone-Induced Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Post-pubertal Improve PCOS's Features. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Dec 4;9:735.), 본 발명에서는 DHEA를 투여하기 전부터, 매일 체중을 측정하였으며, 본 발명의 혼합 추출물을 투여한 후 20일에 체중을 확인하였다.

[0057] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이 DHEA군의 평균 체중은 267.3 g으로 Sham군의 245.4 g에 비하여 유의적으로 증가하였으나, DHEA+추출물군의 평균 체중은 266.0 g ~ 248.1 g으로 DHEA군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였다.

[0059] <실시예 4> 감초, 창출, 오수유 및 구기자 혼합 추출물의 호르몬 변화 확인

[0060] DHEA에 의한 다낭성난소증후군에서 증가한다고 알려진 생식호르몬인 테스토스테론의 발현을 혈청학적인 방법으로 분석하였다(Luchetti et al., 2004). 동물모델 유도 후, 20일째에 혈액을 채취하고, 원심 분리로 혈청을 분리하고, 테스토스테론에 대한 효소면역키트(ELISA, enzyme-linked immunosorbent serologic assay kit; Mercodia, Uppsala, Sweden)를 이용하여 테스토스테론의 발현 정도를 확인하였다. 혈액을 채취하기 전에 12 시간 이상 공복상태를 유지하였다.

[0061] 그 결과 도 2에 나타낸 바와 같이 DHEA 투여 후, 20일째에 ELISA분석을 통하여, 혈청 testosterone의 양을 측정한 결과, DHEA군의 평균 발현량은 2,523.67 pg/ml로 Sham군의 164.82 pg/ml에 비하여 유의적으로 현저하게 증가하였으나, DHEA+추출물군의 평균 발현량은 1,756.8 pg/ml ~ 1,113.07 pg/ml로 DHEA군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였다.

[0063] <실시예 5> 감초, 창출, 오수유 및 구기자 혼합 추출물의 난소 및 자궁의 조직학적 변화 확인

[0064] 다낭성 난소 증후군에서 난소와 자궁의 무게가 증가하는 것으로 보고(Rezvanfar et al., 2007; Manneras et al., 2007)되고 있어, 이를 검증하기 위하여, DHEA 투여하고 20일째에, 흰쥐를 이소플루란(isoflurane)으로 흡입 마취하고, 경주 탈골로 안락사한 다음, 난소와 자궁을 채취하여 무게를 측정하였다. 또한 왼쪽 난소의 전체와 왼쪽 자궁의 중간부위(약 0.5 cm)를 4% paraformaldehyde 액에 24시간 동안 침지하여 고정하였다. 일반적인 방법으로, 파라핀블록을 만들고, 절편(4 μm 두께)을 제작하였으며, 난소는 최대한 넓은 단면의 절편을 그리고 자궁은 가로 단면의 절편을 제작하였다. 절편을 헤마톡시린-에오진(H&E) 염료로 염색하고 광학현미경으로 관찰하고, Image J 프로그램(<https://imagej.nih.gov/ij/>)을 활용하여 분석하였다.

[0065] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이 난소에서는, DHEA 군에서 난소의 크기와 무게는 증가하였으나, DHEA+추출물 군에서는 DHEA군에 비하여 감소하였다(도 3A 및 도 3B). 또한, 난소의 파라핀조직 절편을 헤마톡시린-에오진(H&E)으로 염색하고 광학현미경으로 관찰한 결과, DHEA군의 난소에서는 다수의 낭포가 관찰되었으며, DHEA+추출물군의 난소에서 낭포의 수와 크기가 DHEA군에 비하여 감소하였고, Sham군과 추출물 단독군에서는 비정상적인 낭포가 관찰되지 않았다(도 3C 내지 도 3E).

[0066] 또한, 도 4에 나타낸 바와 같이, 자궁에서는, DHEA 군에서 자궁의 크기는 증가하였으나, DHEA+추출물군에서는 DHEA군에 비하여 감소하였다(도 4A). 또한, 자궁의 파라핀조직 절편을 헤마톡시린-에오진(H&E)으로 염색하고 광학현미경으로 관찰한 결과, 자궁에서는 직경과 점막의 두께는 DHEA군에서 증가하였으나, DHEA+추출물군에서 감

소하였다(도 4B 및 도 4C). Sham군에서는 특이한 소견이 관찰되지 않았다.

[0068] <실시예 6> 웨스턴 블롯 분석

[0069] 다낭성 난소 증후군을 가진 환자나 DHEA에 의한 동물모델의 난소는 염증반응과 세포자멸사를 동반하므로(Bas D, Abramovich D, Hernandez F, Tesone M. Altered expression of Bcl-2 and Bax in follicles within dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries in rats. Cell Biol Int. 2011 May;35(5):423-9.), 본 발명의 복합 추출물이 다낭성난소증후군의 동물모델의 난소와 자궁에서 염증반응과 세포자멸사를 억제하는지를 검증하기 위하여 이와 관련한 신호기전을 웨스턴 블롯 분석을 통하여 조사하였다. DHEA 투여 후 20일째에, 위의 방법으로 안락사하고 난소와 자궁을 분리하여 동결 보관하였다. 난소와 자궁 조직에 단백질 용해 완충액(protein lysis buffer; 10 mM 트리스, 0.5 mM EDTA, 0.25 M 수크로스) 200 μ l를 넣고 분쇄기로 조직을 으갠 후 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 소혈청알부민을 사용한 Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 방법을 이용하여 각 개체의 단백질을 정량한 뒤 30 μ g의 단백질을 10% SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 분리하여 PVDF (polyvinylidene difluoride) 멤브레인(membrane, Gendepot, Barker, TX, USA)으로 이동시켰다. PVDF 멤브레인은 5% 탈지유(skimmed milk, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에서 1시간 동안 블로킹시켰다. TBST로 수세한 후 1차 항체를 3% 탈지유에 희석시켜 4℃에서 하루 동안 반응시켰다. 1차 항체로는 토끼 항-phospho-inhibitory subunit of nuclear factor (NF)- κ B α (p-I κ B α , 1:1,000, 1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 토끼 항-p-NF- κ B (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology) 및 토끼 항-cleaved caspase-3 (1:500; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 사용하였다. 그리고 tris buffered saline buffer with tween 20 (TBST)로 10분씩 3회 수세하고, 2차 항체와 함께 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체(Vector Laboratories)와 반응 후 TBST로 수세하고, enhanced chemiluminescence (ECL) system (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)으로 단백질의 변화를 측정하였다. 단백질의 변화 및 정량 분석은 이미지 장비 ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad)를 이용하였다. 각 단백질의 발현 수준은 토끼 항-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 1:5,000; Cell Signaling Technology)로 표준화하였다.

[0070] 그 결과, 난소에서는 염증반응의 주요 신호기전인 NF- κ B 기전의 핵심인자인 p-I κ B와 p-NF- κ B의 단백질 발현은 Sham군에 비하여 DHEA군에서 증가하였으나, DHEA+추출물군에서 농도 의존적으로 감소하였다(도 5A 내지 도 5C). 또한, 세포자멸사의 정도를 확인하기 위하여 세포자멸사 과정에 관여하는 주요 인자인 cleaved caspase-3의 단백질 발현의 정도를 한 결과, cleaved caspase-3의 단백질 발현은 Sham군에 비하여 DHEA군에서 증가하였으나, DHEA+추출물군에서 농도 의존적으로 감소하였다(도 5D).

[0071] 또한, 자궁에서는 염증반응의 주요 신호기전인 NF- κ B 기전의 핵심인자인 p-I κ B와 p-NF- κ B의 단백질 발현은 Sham군에 비하여 DHEA군에서 증가하였으나, DHEA+추출물군에서 농도 의존적으로 감소하였다(도 6A 내지 도 6C). 또한, 세포자멸사의 정도를 확인하기 위하여 세포자멸사 과정에 관여하는 주요 인자인 cleaved caspase-3의 단백질 발현의 정도를 한 결과, cleaved caspase-3의 단백질 발현은 Sham군에 비하여 DHEA군에서 증가하였으나, DHEA+추출물군에서 농도 의존적으로 감소하였다(도 6D).

[0072] 또한, 다낭성난소증후군을 가진 환자나 DHEA에 의한 동물모델의 자궁은 자궁내막의 수용성이 감소하는 것으로 알려져 있어서(Hu et al., 2018), 자궁조직을 사용하여 자궁내막의 수용성의 대표적인 마커인 progesterone receptor의 단백질 발현의 정도를 확인하였다. 그 결과, progesterone receptor의 단백질 발현은 Sham군에 비하여 DHEA군에서 증가하였으나, DHEA+추출물군에서 농도 의존적으로 감소하였다(도 6E).

[0074] <실시예 7> 통계학적 분석

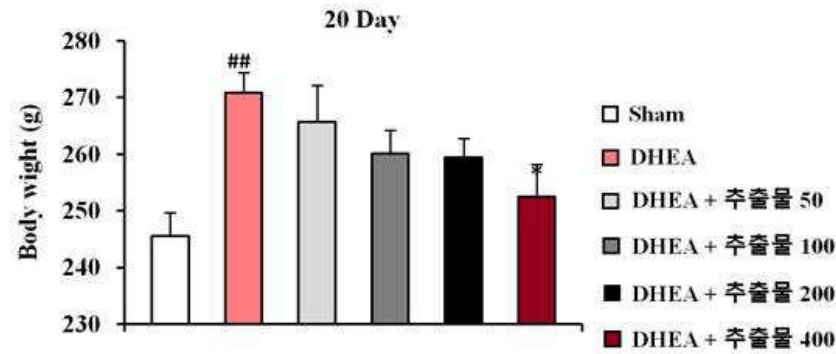
[0075] 본 발명에서 얻어진 모든 결과는 SPSS 21 버전을 이용하여 분석하였으며, 실험결과는 mean $\pm$ standard error (평균 $\pm$ 표준오차) 값으로 표시하였다. 통계적 유의성 검증은 ANOVA (일원배치 분산분석)를 이용하여 분석 후 Tukey post hoc로 사후 분석하였고, 유의확률(p-value) 값은 $p < 0.05$ 및 $p < 0.01$ 미만인 경우에만 인정하였다.

[0076] 따라서, 본 발명의 감초, 창출, 오수유 및 구기자 혼합 추출물은 디하이드로에피안드로스테론(Dehydroepiandrosterone, DHEA)로 다낭성 난소 증후군이 유도된 마우스 모델에서, 체중 및 혈청 테스토스테론의 농도가 감소하는 것을 확인하였으며, 난소에서는 난소의 크기 감소, 조직학적 변화 및 낭포수 감소효과를 확인하였으며, 자궁에서는 자궁의 크기 감소, 조직학적 변화 및 자궁의 직경이 감소한 것을 확인하였다. 또한, 난

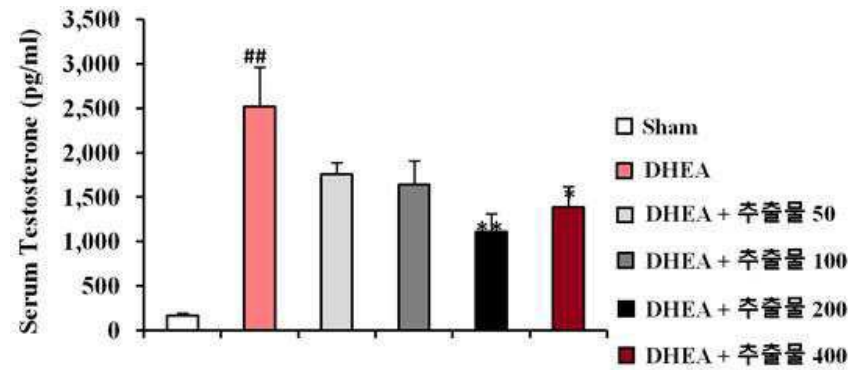
소 및 자궁의 염증 및 세포자멸사와 관련된 인자인 p-IkB, p-NFkB, Cleaved caspase-3 및 Progesterone receptor의 발현이 감소한 것을 확인하여, 본 발명의 혼합 추출물이 다낭성 난소증후군의 치료 및 개선에 효과가 있는 것을 확인하였다.

도면

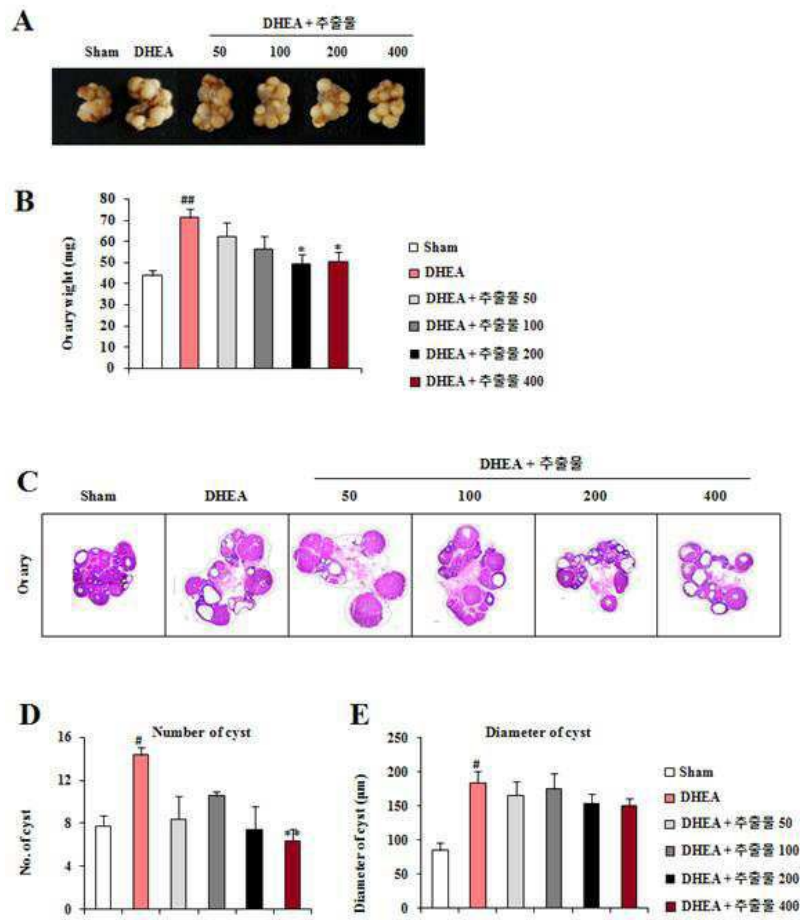
도면1



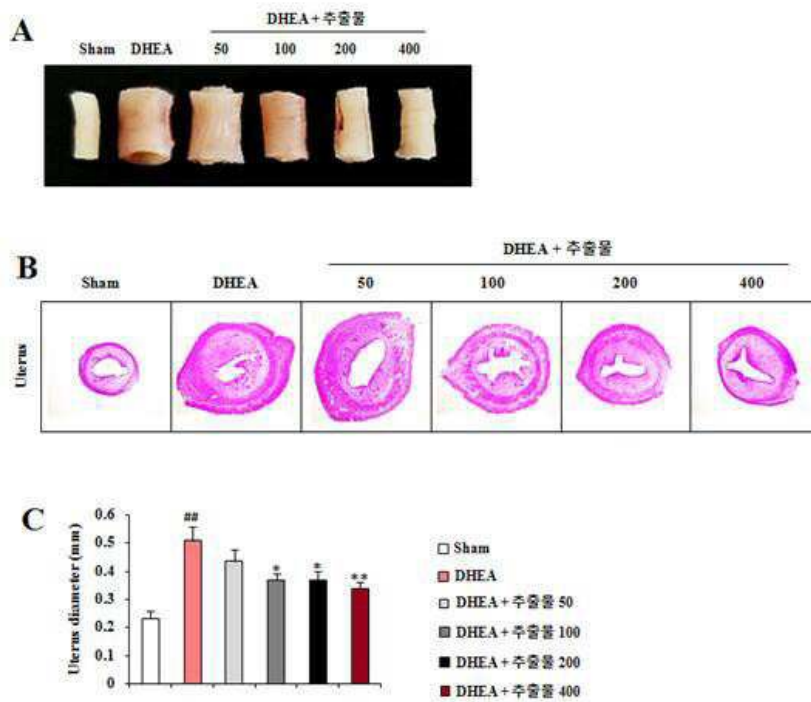
도면2



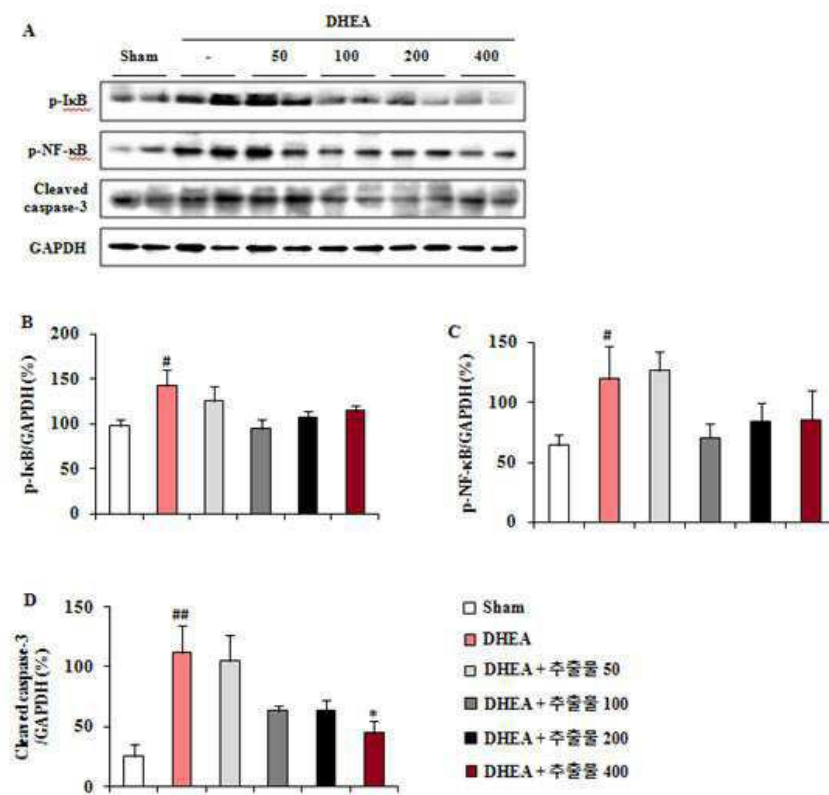
도면3



도면4



도면5



도면6

