(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0054481
(43) 공개일자 2021년05월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/355 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61P 13/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/355 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0146983
(22) 출원일자 2020년11월05일
심사청구일자 2020년11월05일
(30) 우선권주장
1020190140268 2019년11월05일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
엄재영
서울특별시 성북구 한천로 713, 505동 1902호
박진봉
서울특별시 도봉구 덕릉로 349, 406동 201호(창동, 주공4단지아파트)
(74) 대리인
위병갑

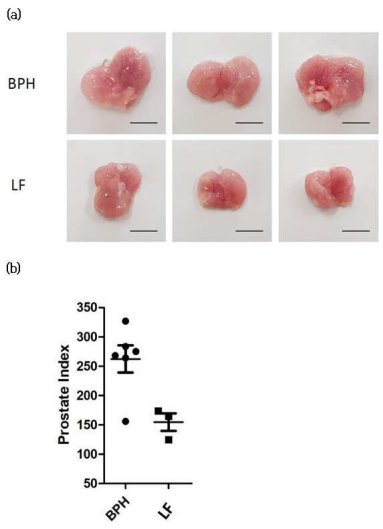
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **금은화 추출물을 포함하는 전립선비대증 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 금은화 추출물을 포함하는 전립성비대증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능성 식품에 관한 것으로, 본 발명의 금은화 추출물은 5알파환원효소의 발현을 억제함으로써 전립선비대증을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 13/08 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)
A61K 2800/782 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711112710
과제번호 2018R1A2A3075684
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공분야 기초연구사업 중견연구 (보호육성분야)
연구과제명 상용한약과 피나스테리드의 상호작용 기전규명을 통한 전립선비대증 개선 효능 증대 및 부작용 완화 연구
기 여 율 1/1
과제수행기관명 경희대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선비대증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 금은화 추출물은 5알파환원효소의 발현을 억제하는 것인 약학적 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 금은화 추출물은 5알파환원효소 2형의 발현을 억제하는 것인 약학적 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 금은화 추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 벤젠, 클로로포름, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산 및 시클로헥산으로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상의 용매에 의해 추출된 것인 약학적 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 용매는 물 및 에탄올로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상의 용매인 약학적 조성물.

청구항 6

제 4 항에 있어서, 상기 용매는 물 또는 에탄올인 것인 약학적 조성물.

청구항 7

금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선비대증 예방 또는 개선용 건강기능성 식품.

청구항 8

제 1 항의 전립선비대증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 인간을 제외한 환자에게 투여하는 것을 포함하는 전립선비대증 예방 또는 치료 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선비대증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능성 식품에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 전립선비대증은 전립선이 비대해져 방광 하부의 요로를 막아 소변의 흐름이 감소된 상태로 정의되었으나, 현재는 ‘50세 이상의 남성에서 빈뇨(8회 이상/일), 야간뇨, 긴박뇨(강하고 갑작스런 요의), 절박뇨(소변을 참기 어려움), 지연뇨(소변의 배출이 지연됨), 단절뇨(소변의 흐름이 끊김), 배뇨시 힘을 주어야 하는 현상 등의 방광 배출 장애를 나타내는 증상을 통칭한 하부 요로증상의 호소’ 로서 전립선비대증을 정의한다.

[0003] 전립선비대증 발생의 가장 주요한 유발인자는 연령 증가와 남성 호르몬이며, 전립선의 조직학적 비대는 35세부터 시작되어 60대 남성의 경우 60%, 80대 남성의 경우 90%에서 전립선의 비대가 나타나며, 이 중 50%의 환자군에서 전립선의 비대로 인한 배뇨장애를 호소한다.

[0004] 전립선비대증의 약물 치료제는 크게 알파차단제와 안드로겐억제제(5알파환원효소 억제제)로 분류된다. 알파차단

제는 전립선요도의 압력과 긴장을 낮추어주는 약물로서 시중에서 판매되는 알파차단제로는 테라조신(terazosin), 독사조신(doxazosin), 탐스로신(tamsulosin), 알푸조신(alfuzosin) 등이 있다. 그러나 알파차단제는 전립선의 비대된 현상을 줄여주는 효과는 없으므로 일시적인 치료방법일 뿐이며, 어지럼증, 무기력증, 두통, 시야 장애 등의 부작용이 보고되었다. 안드로겐억제제는 전립선의 비대 과정에서 핵심적인 역할을 수행하는 5알파환원효소(5α-reductase)를 억제하여 전립선의 비대를 막아주는 약물이다. 5알파환원효소 억제제로서 시중에는 피나스테리드(finasteride)와 두타스테리드(dutasteride)가 판매되고 있다. 그러나 이들 약물은 복용 후 효과가 나타날 때까지 시간이 오래 걸리며, 성기능 관련 부작용이 있다.

[0005] 이와 같이 현재까지 개발 중이거나 시판되고 있는 약물은 대부분 부작용이 많이 나타나므로, 새로운 기전의 전립선비대증 치료제 개발이 요구되고 있다.

[0006] 상기와 같은 문제를 해소하기 위해, 본 발명자들은 금은화 추출물이 전립선 비대를 억제하는 효능을 가지고 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 10-0713088호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 전립선비대증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 전립선비대증 예방 또는 개선용 건강기능성 식품을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 전립선비대증 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기의 목적을 달성하기 위하여,

[0012] 본 발명은 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선비대증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선비대증 예방 또는 개선용 건강기능성 식품을 제공한다.

[0014] 나아가, 본 발명은 본 발명에 따른 전립선비대증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는 전립선비대증 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 천연물 유래 성분으로서 생체친화적이고 부작용이 없는 금은화 추출물을 전립선비대증의 예방 또는 치료에 적용시킨 것으로, 금은화 추출물의 우수한 5알파환원효소 발현 억제 효능 및 전립선비대 억제 효과에 의해 효과적인 전립선비대증 예방 또는 치료용 조성물 및 건강기능성 식품을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명의 금은화 추출물의 전립선 조직 비대 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 금은화 추출물의 추출 용매에 따른 인간 전립선 상피 세포(RWPE-1 세포)의 세포 생존율을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 금은화 추출물의 추출 용매에 따른 5알파환원효소 억제 효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 상세히 설명한다. 이하의 설명에 있어, 당업자에게 주지 저

명한 기술에 대해서는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다.

[0018] 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0020] 본 발명은 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선비대증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능성 식품에 관한 것이다.

[0021] 상기 금은화(Lonicerae Flos)는 인동덩굴 *Lanicera japonica* Thunberg의 꽃봉오리 또는 막 피기 시작한 꽃을 사용하는 한약으로 특유한 냄새가 약간 있고 맛은 담담하며 약간 쓴 성질을 갖는다. 한의학적으로 청열해독, 양혈지혈, 산풍열의 효능이 있으며 강한 항균작용으로 여러 가지 염증성 질환과 감기로 인한 발열 및 외과의 부스럼등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0022] 본 발명의 금은화 추출물은 상기 금은화를 적절한 용매로 추출한 것일 수 있다. 상기 추출하기 위한 적절한 용매는 약학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있다. 예를 들어, 추출 용매로서 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1-4개의 무수 또는 함수 저급 알코올, 프로필렌 글리콜, 부틸렌 글리콜, 글리세린, 아세톤, 에틸 아세테이트, 부틸 아세테이트, 클로로포름, 디에틸 에테르, 디클로로메탄, 헥산, 에테르, 벤젠, 메틸렌 클로라이드, 및 시클로헥산 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다.

[0023] 바람직하게는, 상기 금은화 추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 벤젠, 클로로포름, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산 및 시클로헥산으로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상의 용매를 단독으로 혹은 혼합한 용매에 의해 추출된 것일 수 있다. 보다 바람직하게는, 상기 용매는 물 및 에탄올로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상의 용매를 단독으로 혹은 혼합한 용매인 것일 수 있고, 물 또는 에탄올인 것이 가장 바람직한 것일 수 있다.

[0024] 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다. 본 발명의 금은화 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.

[0025] 예를 들어, 상기 금은화의 추출은, 상기 추출용매를 금은화 중량의 5 내지 30배 부피의 양으로 첨가하여 추출하는 것일 수 있다. 추출온도는 20 내지 50℃인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 추출시간은 10 내지 72시간인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 상기 전립선비대증은 5알파환원효소의 발현에 의해 발생되는 전립선일 수 있고, 바람직하게는 5알파환원효소 2형의 발현에 의해 발생되는 전립선일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 상기 금은화 추출물은 5알파환원효소의 발현을 억제하여 전립선비대를 개선시키는 것일 수 있고, 바람직하게는 5알파환원효소 2형의 발현을 억제하여 전립선비대를 개선시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 상기 5알파환원효소(5α-환원효소)는 테스토스테론으로부터 디하이드 로테스토스테론 생합성에 있어 가장 중요한 효소이기 때문에 양성 전립선비대증의 조절을 위한 주요 표적으로 인식되고 있다. 3종의 5알파환원효소 중 I형(1형)과 II 형(2형)은 임상적으로 가장 중요하다. 그 중 간질과 상피의 전립선 핵막에 위치한 2형은 양성 전립선비대증과 관련된 디하이드로테스토스테론 생성에 더 관여한다고 보고되었다. 테스토스테론과 디하이드로테스토스테론은 남성 생식 기관의 발달에 중요한 역할을 하지만 디하이드로테스토스테론은 테스토스테론보다 안드로겐 수용체에 대한 친화도가 높다. 안드로겐 수용체에 대한 디하이드로테스토스테론의 높은 친화성은 테스토스테론보다는 전립선 상피세포 및 간질세포의 증식을 촉진시키는 데 필요한 안드로겐 의존 성장 인자의 전사 활성

을 강력하게 자극할 수 있다. 이 과정은 안드로겐 수용체를 핵으로 전이 시켜 발생하는 안드로겐 반응요소(AREs)의 DNA 서열에 결합하기 위해 특정 안드로겐 수용체의 보조 활성제 동원을 필요로 한다.

[0030] 본 발명의 일실시예에서는 금은화 추출물이 전립선비대증이 유발된 래트에서 증가된 전립선 중량을 감소시키고, 인간 전립선 상피세포에서 5알파환원효소 2형의 발현 수준을 감소시킴으로써, 양성 전립선비대증을 예방, 치료 또는 개선시킬 수 있음을 확인하였다(실험예 1 내지 4 참조).

[0032] 본 발명에 따른 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 전립선비대증 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양의 금은화 추출물을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.

[0033] 상기에서 "약학적으로 유효한 양"이란 상기 생리활성성분이 동물 또는 사람에게 투여되어 목적하는 생리학적 또는 약리학적 활성을 나타내기에 충분한 양을 말한다. 그러나 상기 약학적으로 유효한 양은 증상의 정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.

[0034] 또한, 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있으며, 경구 또는 비경구 투여를 위한 다양한 형태로 제형화 될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀젼, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.

[0036] 본 발명에 따른 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 목적하는 효과를 상승시킬 수 있는 공지의 화합물과도 병행하여 투여할 수 있다.

[0038] 나아가 본 발명에 따른 조성물은 상기 기술한 바와 같이 약학적 조성물로 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 건강기능식품으로도 사용할 수 있다. 예컨대, 식품의 주원료, 부원료, 식품 첨가제, 기능성 식품 또는 음료로 용이하게 활용할 수 있다.

[0039] 상기 “식품”이란, 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품첨가제, 기능성식품 및 음료를 모두 포함하는 것을 말한다.

[0040] 상기 식품용 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합체, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 캔디류, 쵸코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과실음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면스프 등)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0041] 또한, 상기 “기능성 식품” 또는 “건강기능성 식품”이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물 공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미하며, 구체적으로는 건강 기능성 식품일 수 있다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희

석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0042] 상기 건강보조식품의 종류로는 이에 제한되지는 않으나, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 형태 일 수 있다.

[0044] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 전립선비대증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는 전립선비대증 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0045] 본 발명의 치료 방법은 상기 약학적 조성물을 치료적 유효량으로 개체에 투여하는 것을 포함한다. 특정 개체에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 개체의 연령, 체중, 일반건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 목적에 적합한 조성물의 유효량은 전술한 사항을 고려하여 결정하는 것이 바람직하다.

[0046] 상기 환자는 임의의 포유동물에 적용가능하며, 상기 포유동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등의 가축을 포함한다.

[0048] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예들은 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0050] **<실시예 1> 금은화 추출물의 제조**

[0051] 본 발명의 실험에 사용한 금은화(Lonicerae flos, LF)는 두손애약초(Youngchun, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 물(증류수) 및 에탄올 수용액을 이용하여 추출 용매를 달리한 금은화 추출물을 제조하였다. 질소 농축된 금은화 추출물은 DMSO(dimethyl sulfoxide, $(CH_3)_2SO$)에 녹여서 실험에 사용하였다.

[0053] 1-1. 금은화 물 추출물의 제조

[0054] 금은화 100 g에 2 L의 물을 넣고 36 ℃에서 48 시간 동안 흔들어주면서 가열하지 않고 추출 하였으며, 질소 농축시켜 용매를 제거하여 분말 상태의 금은화 물 추출물(LJEE 0%, LF, 수율 16.6%)을 수득하였다.

[0056] 1-2. 금은화 30% 에탄올 추출물의 제조

[0057] 금은화 100 g에 2 L의 30%(v/v) 에탄올 수용액을 넣고 36 ℃에서 48 시간 흔들어주면서 추출 하였으며, 질소 농축시켜 용매를 제거하여 분말 상태의 금은화 30% 에탄올 추출물(LJEE 30%, 수율 18.0%)을 수득하였다.

[0059] 1-3. 금은화 50% 에탄올 추출물의 제조

[0060] 금은화 100 g에 2 L의 50%(v/v) 에탄올 수용액을 넣고 36 ℃에서 48 시간 흔들어주면서 추출 하였으며, 질소 농축시켜 용매를 제거하여 분말 상태의 금은화 50% 에탄올 추출물(LJEE 50%, 수율 20.8%)을 수득하였다.

[0062] 1-4. 금은화 70% 에탄올 추출물의 제조

[0063] 금은화 100 g에 2 L의 70%(v/v) 에탄올 수용액을 넣고 36 ℃에서 48 시간 흔들어주면서 추출 하였으며, 질소 농축시켜 용매를 제거하여 분말 상태의 금은화 70% 에탄올 추출물(LJEE 70%, 수율 19.8%)을 수득하였다.

[0065] 1-5. 금은화 100% 에탄올 추출물의 제조

[0066] 금은화 100 g에 2 L의 100%(v/v) 에탄올 용매를 넣고 36 ℃에서 48 시간 흔들어주면서 추출 하였으며, 질소 농축시켜 용매를 제거하여 분말 상태의 금은화 100% 에탄올 추출물(LJEE 100%, 수율 9.2%)을 수득하였다.

[0068] **<실험예 1> 전립선비대증의 유발**

[0069] 전립선비대증을 유발하기 위해 래트 14마리의 서혜부에 4주간 TP(5mg/kg/day)를 주입하였다. 4주간의 전립선비대증 유발 이후 추가적인 4주간 TP를 주입한 질병대조군과 추가적인 4주간 TP와 함께 금은화 추출물(LF, 150 mg/kg/day)를 주입한 실험군으로 처치를 달리하여 실험을 진행하였다.

[0071] **<실험예 2> 조직 무게 측정 및 체중 보정을 통한 prostate index 측정**

[0072] 전립선비대증의 유발 및 금은화 추출물의 개선 효과를 확인하기 위해 실험예 1에서와 같이 총 8주간의 실험 후 래트들의 전립선 조직의 부피 및 무게를 측정하였다. 또한 체중에 따른 조직 무게의 차이를 보정하기 위해 전립선의 무게 mg을 체중 100g에 대하여 나누어 prostate index를 계산하였다. 전립선 조직의 측정 결과는 도 1에 나타냈으며, 금은화 추출물 처리 군이 질병대조군에 비해 전립선 조직의 비대를 억제하였으며, 이는 조직의 부피(도 1a)와 체중 100g에 대하여 전립선조직의 무게(mg)를 보정한 prostate index(도 1b) 모두에서 개선 효과를 보였음을 확인할 수 있었다.

[0074] **<실험예 3> 추출 용매에 따른 세포 독성 측정**

[0075] 추출 용매에 따른 금은화 추출물의 세포 독성을 확인하기 위해 인간 전립선 상피 세포인 RWPE-1세포를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다.

[0076] 세포는 96 웰 플레이트 (96-well plate) 에 1 x 10^5 cell/200㎕ 로 각 웰에 배양하였으며 CO_2가 5%로 유지되는 36℃ 세포배양기에서 24 시간 배양하였다. 추출물은 DMSO를 용매로 사용하여 20 mg/ml 로 희석하였으며 도 2 에 기재된 농도로 각 well에 처리하였다. 약물이 처리된 플레이트는 CO_2가 5%로 유지되는 36℃ 세포배양기에서 24 시간 배양하였다. 이후 새로운 배양액으로 교체한 뒤 WST-1 세포 증식 분석 혼합액 (Biomax, Seoul, Korea)을 10 ㎕/200㎕씩 각 웰에 추가하여 CO_2 가 5%로 유지되는 36℃ 세포배양기에서 4 시간 배양하였다. 배양이 끝난 플레이트는 분광광도계를 이용하여 440nm 파장의 흡광도를 측정하였다.

[0077] DMSO를 단독으로 넣은 웰을 기준으로 세포독성을 정량화 한 결과, 금은화 물 추출물은 500㎍/ml, 금은화 30% 에탄올 추출물은 100㎍/ml, 금은화 50% 에탄올 추출물은 50㎍/ml, 금은화 70% 에탄올 추출물과 100% 에탄올 추출물에서는 10㎍/ml의 농도까지 세포 독성이 없음을 확인하였다(도 2).

[0079] **<실험예 4> 추출 용매에 따른 5알파환원효소 억제 효과 측정**

[0080] 인간 전립선 상피세포인 RWPE-1을 8 x 10^5/2ml로 배양하여 CO_2가 5%로 유지되는 36℃ 세포배양기에서 24 시간 배양하였다. 플레이트의 배양액을 새것으로 교체한 후 TP(4㎛M)를 30분 전처리 하였다. 이후 용매별 금은화 추출물을 실험예 3에서 측정한 독성이 없는 농도로 처리하여 CO_2가 5%로 유지되는 36℃ 세포배양기에서 8 시간 배양하였다. 전립선비대증을 유발시킨 세포 모델을 웨스턴 블롯(western blot) 분석법을 사용하여 추출 용매에 따른 금은화 추출물의 5알파환원효소 2형(5α-reductase-2, 5AR2)의 발현 억제 효과를 분석하였다.

[0081] 용매별 추출물이 처리된 세포를 RIPA 버퍼 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1% 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulphate, SDS), 0.1% Triton X-100, 1% Nonidet P-40, 0.5% 소듐 데옥시콜레이트(sodium deoxycholate), 150 mM NaCl 및 1 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드(phenylmethylsulphonyl fluoride))로 용해시킨 후, 8% 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔(sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel) 전기영동으로 분리하고 나이트로셀룰로스(nitrocellulose) 멤브레인으로 옮겼다. 멤브레인은 실온에서 1시간 동안 5% 탈지유가 함유된 TBST(10mM Tris, 150mM NaCl 및 0.05% Tween20, pH 7.6)로 블로킹하고, TBST로 세척 한 후, 5알파환원효소 2형(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 또는 액틴(β-actin, Santa Cruz

Biotechnology, Inc.) 1차 항체와 함께 4℃에서 밤새동안 배양하였다. 이어서 멤브레인을 실온에서 2시간 동안 적절한 horseradish peroxidase (Jackson Lab.)가 부착된 2차 항체(Amersham Biosciences, Westborough, MA, USA)와 반응시켰다. 목적 단백질 밴드는 제조자의 지시에 따라 강화된 화학발광(enhanced chemiluminescence, ECL) 용액(Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)을 사용하여 LAS 이미지 게이지(LAS Image Gauge) 프로그램에서 측정하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0082] 도 3에 나타낸 바와 같이, 질병 대조군(TP로 전립선비대증을 유발시킨 vehicle 처리 세포)의 경우 정상군(vehicle 처리 세포)보다 5알파환원효소 2형(5AR2)의 발현이 크게 증가하였으나, 금은화 추출물을 투여한 실험군의 경우 5알파환원효소의 발현 증가가 완화됨을 확인하였고, 특히, 금은화 물 추출물 및 금은화 100% 에탄올 추출물에서 발현이 가장 크게 억제됨을 확인하였다.

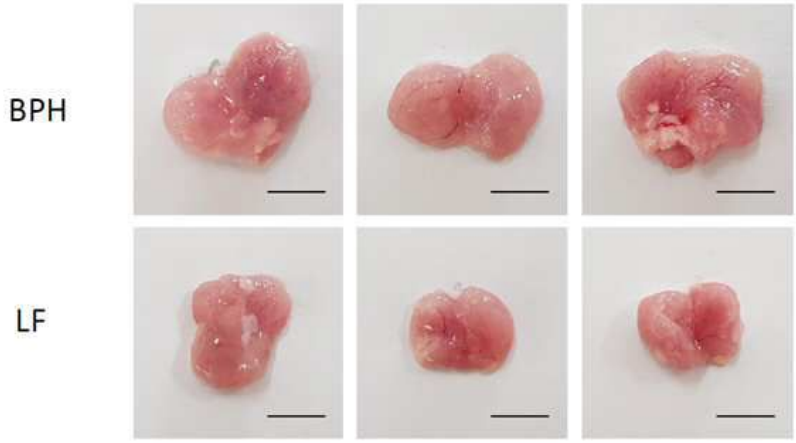
[0083] 따라서, 본 발명의 금은화 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 전립선비대증의 예방, 치료 및 개선용으로 효과적으로 사용될 수 있다.

[0085] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시 예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

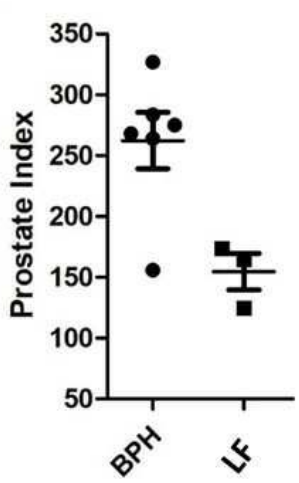
도면

도면1

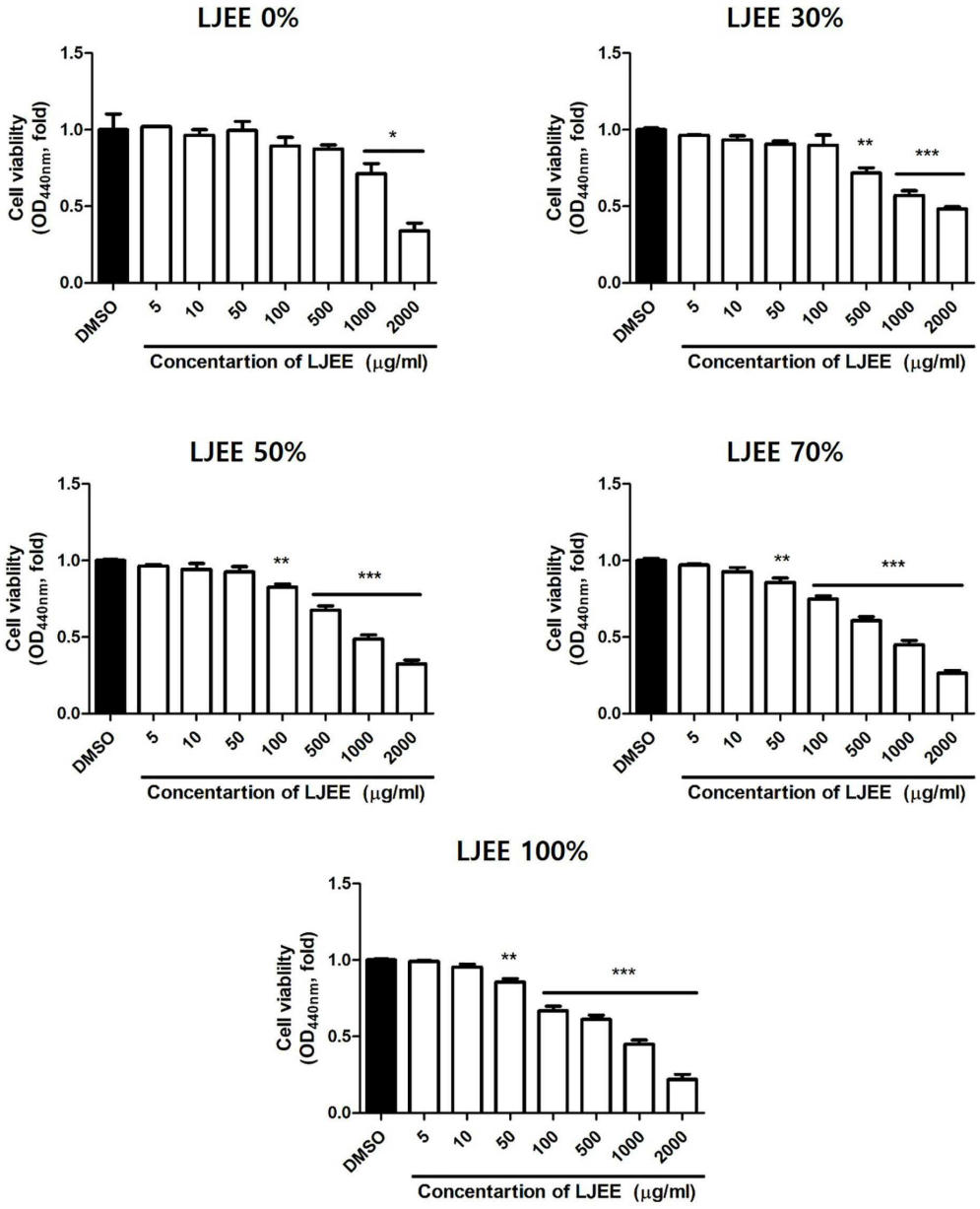
(a)



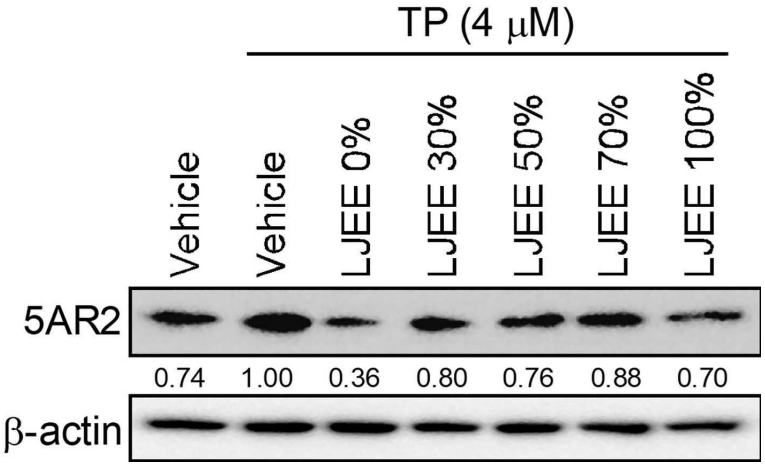
(b)



도면2


LJEE 0%
LJEE 30%
LJEE 50%
LJEE 70%
LJEE 100%
Cell viability (OD440nm, fold)
1.5
1.0
0.5
0.0
DMSO
5
10
50
100
500
1000
2000
Concentartion of LJEE (μg/ml)
*
**
***

도면3


TP (4 μM)
Vehicle
Vehicle
LJEE 0%
LJEE 30%
LJEE 50%
LJEE 70%
LJEE 100%
5AR2
0.74
1.00
0.36
0.80
0.76
0.88
0.70
β-actin