



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년04월10일
 (11) 등록번호 10-1383145
 (24) 등록일자 2014년04월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 36/752 (2006.01) A61P 13/08 (2006.01)
 A61P 13/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-0086755
 (22) 출원일자 2012년08월08일
 심사청구일자 2012년08월08일
 (65) 공개번호 10-2014-0020433
 (43) 공개일자 2014년02월19일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR101109771 B1*
 JP2005206546 A
 WO9907381 A1
 KR1020110047824 A
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국인스팜(주)
 전라남도 화순군 동면 동농공길 17
 (72) 발명자
이유현
 서울 강남구 언주로 203, 1005호 (도곡동, 매봉아파트)
김중연
 경기 화성시 용건로 99, 110동 902호 (기안동, 풍성신미주아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
신동인

전체 청구항 수 : 총 6 항

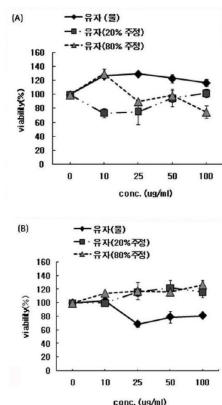
심사관 : 정세준

(54) 발명의 명칭 유자 추출물을 포함하는 전립선 비대증 예방 및 치료를 위한 조성물

(57) 요약

본 발명은 유자추출물을 포함하는 전립선 비대증 예방 및 치료를 위한 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 유자추출물은 인체 전립선암 세포주 세포독성이 높은 세포 생존률 및 전립선비대가 유발된 12주령의 SD 래트 간으로부터 추출된 5-알파(alpha)-리덕타제(reductase) 1형 및 2형에 대한 저해능, 5RD 2형 과발현 전립선 세포주에서의 5RD 활성 억제효과 및 PSA의 mRNA 발현 억제효과를 나타내었으며, 랫트를 이용한 전립선비대 유발실험에서 유의적인 DHT 전환 감소율을 보였으므로 전립선 비대증 예방 및 치료를 위한 약학조성물 및 건강기능식품에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김용재

광주 남구 효사랑길 14, 107동 907호 (봉선동, 포스코더샵아파트)

오규철

광주 남구 봉선로133번길 4, 7동 402호 (봉선동, 금호1차아파트)

전우진

광주 북구 설죽로 595, 106동 1703호 (일곡동, 롯데아파트)

김선오

전남 장흥군 안양면 우드랜드길 288,

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 70011030

부처명 지식경제부

연구사업명 지역산업기술개발사업

연구과제명 지역 특산자원을 대상으로 항스트레스 및 전립선 건강 건강기능식품 소재화

기여율 1/1

주관기관 한국인스팜주식회사

연구기간 2010.11.01 ~ 2011.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

유자 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 예방 및 치료를 위한 약학조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 극성용매에 가용한 추출물인 약학조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 유자는 유자나무 열매의 과피, 과육, 또는 씨를 포함한 약학조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 조성물 총 중량에 대하여 0.001 내지 95 % 중량백분율로 포함됨을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 5

유자 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 예방 및 개선을 위한 건강기능식품.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 건강기능식품 형태는 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환의 형태인 건강기능식품.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 유자추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 예방 및 치료를 위한 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] [문헌 1] Assinder, SJ, Prostate. 68:115-121 (2008).
- [0003] [문헌 2] Tubaro A. et al. Drug Aging 20(3):185-195, 2003.
- [0004] [문헌 3] Zhu YS et al. Steroid enzyme and Cancer 1155:43-56, 2009.
- [0005] [문헌 4] Yoo et al. J. Agric. Food. Chem. 52, 5907-5913, 2004.
- [0006] [문헌 5] Kato-Noguchi et al. Phytochemistry, 61, 849-853, 2002.
- [0007] [문헌 6] Lee et al. J Ethnopharmacol. 118(3):412-7

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 유자 추출물을 유효성분으로 과피, 과육, 씨를 함유하는 전립선 비대증 예방 및 치료를 위한 조성물

에 관한 것이다.

- [0009] 본 발명은 유자 추출물을 함유하는 전립선비대 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 유자 80% 주정 추출물이 전립선 비대 유도 백서와 전립선 세포에서 제2형 5-알파 리덕타아제를 저해하며, 전립선비대를 유발한 동물실험 모델에서도 유의적인 결과를 보였으므로 의약품 및 건강식품의 소재로서 유용하게 사용될 수 있는 유자 80% 주정추출물의 새로운 용도에 관한 것이다.
- [0010] 전립선 비대증은 우리나라 남성의 50세 이후 발병이 급격히 일어나는 남성질환으로 최근 우리나라에서 전립선비대증 질환자의 증가율이 년 20%를 상회할 정도로 가파른 증가를 하고 있다. 이 질환의 경우 전립선이행대 부분의 평활근(smooth cell)과 상피세포(epithelial)의 과도한 증식으로 야기되며, 방광폐색으로 인한 다양한 배뇨장애가 일어난다. 전립선 비대의 한 가지 기전은 남성호르몬인 테스토스테론(testosterone, T)과 디하이드로테스토스테론(dihydrotestosterone, DHT)이 관련되어 있다고 알려져 있다.
- [0011] 남성호르몬에 속하는 T는 전립선내의 5-알파 리덕타아제(5- α -reductase, 5 α RD)에 의하여 활성형 DHT로 전환되며, 전환된 DHT는 안드로젠 수용체(androgen receptor, AR)와 복합체를 이루고 핵 내로 이동하여 전사가 진행된다. 이러한 과정에서 활성형 남성호르몬의 전환에 관여하는 효소인 5 α RD는 type1과 type2 두 종류가 존재하는데, 5 α RD type1은 전립선에서의 분포와 활성은 크지 않지만 간과 피부에 많이 존재하며, 5 α RD type2의 경우는 주로 전립선에서 두드러진 활성과 분포를 보인다. 이들 효소는 정상적인 전립선에도 분포하고 있으나, 전립선비대의 경우 비대해진 부위에서 과발현을 보인다. 그러므로, 5 α RD의 활성을 억제하는 5 α RD inhibitor의 개발은 전립선약물치료의 큰 축을 담당하고 있으며, 전립선치료제로 개발되어 있는 Finasteride의 경우가 5 α RD type2를 억제하는 것으로 serum에서 70%, 전립선에서 90%정도 억제할 수 있으며, type 1의 친화성도 낮추는 역할을 할 수 있다[Assinder, SJ, Prostate. 68:115-121 (2008); Tubaro A. et al. Drug Aging 20(3):185-195, 2003;Zhu YS et al. Steroid enzyme and Cancer 1155:43-56, 2009].
- [0012] 본 발명에 사용된 유자(Citrus junos)는 한국, 중국, 일본 등지에서 재배되며, 독특한 향 때문에 음료나 소스로 사용되고 비타민 C와 phenolic substance가 많이 함유되어 있다고 알려져 있다 (Yoo et al. J. Agric. Food. Chem. 52, 5907-5913, 2004; Kato-Noguchi et al. Phytochemistry, 61, 849-853, 2002).
- [0013] 그러나, 상기 문헌의 어디에도 유자추출물의 전립선 비대증에 대한 의학적 효과가 개시 또는 교시된 바가 없다.
- [0014] 본 발명의 유자추출물은 인체 전립선암 세포주 세포독성이 높은 세포 생존률, 전립선비대가 유발된 12주령의 SD 래트 간으로부터 추출된 5-알파(alpha)-리덕타제(reductase) 1형 및 2형에 대한 저해능 5RD 2형 과발현 전립선 세포주에서의 5RD 활성 억제효과 및 PSA의 mRNA 발현 억제효과를 확인하였으며, 전립선비대동물모델에 투여 시 유의적인 DHT 전환률의 감소를 보였으므로 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 유자 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 예방 및 치료를 위한 약화조성물을 제공한다.
- [0016] 본원에서 정의되는 상기 유자는 유자나무 열매의 과피, 과육, 씨 등, 바람직하게는, 과육 또는 씨를 포함한다.
- [0017] 본원에서 정의되는 상기 추출물은 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 극성용매, 바람직하게는 물 및 주정 혼합용매, 보다 바람직하게는 1: 1-10 혼합비(v/v)의 물 및 주정 혼합용매에 가용한 추출물을 포함한다.
- [0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0019] 본 발명의 유자를 압착하여 즙을 내어 동결 건조하여 마쇄한 후 시료 중량의 약 1 내지 100배, 바람직하게는 약 2 내지 20배에 달하는 부피의 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 극성용매, 바람직하게는 물 및 주정 혼합용매, 보다 바람직하게는 1: 1-10 혼합비(v/v)의 물 및 주정 혼합용매로 20 내지 120℃, 바람직하게는 30 내지 80℃에서 약 1 내지 72시간, 바람직하게는 2 내지 12시간 동안에서 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여, 바람직하게는 열수 추출로 추출한 후 감압여과 및 농축하여 본 발명의 유자 추출물들을 수득할 수 있다.

- [0020] 또한, 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있다 (Harborne J.B. Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis, 3rd Ed., pp6-7, 1998).
- [0021] 상기와 같은 방법으로 얻은 본 발명의 유자 추출물이 인체 전립선암 세포주 세포독성이 높은 세포 생존율, 전립선비대가 유발된 12주령의 SD 래트 간으로부터 추출된 5-알파(alpha)-리덕타제(reductase) 1형 및 2형에 대한 저해능 5RD 2형 과발현 전립선 세포주에서의 5RD 활성 억제효과 및 PSA의 mRNA 발현 억제효과를 확인하고 동물 실험에서 유의적인 보호효과를 얻음으로써 전립선 비대증의 치료 및 예방에 효과적임을 확인할 수 있었다.
- [0022] 또한, 유자추출물은 오랫동안 식용되거나 생약으로 사용되어 오던 약제로서 이로부터 추출된 본 발명의 추출물 들 역시 독성 및 부작용 등의 문제가 없다.
- [0023] 상기 본 발명의 추출물을 함유하는 전립선 비대증 예방 및 치료용 약학조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.1 내지 95 % 중량백분율로 포함한다.
- [0024] 본 발명의 추출물을 포함하는 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 추출물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- [0026] 본 발명에 따른 추출물을 포함하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (Calcium carbonate), 수크로스 (Sucrose) 또는 락토오스 (Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔 (Witepsol), 마크로골, 트윈 (Tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물은 1일 0.0001 내지 200 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 150 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명의 추출물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 (Intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명은 유자 추출물을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 함유하는 전립선 비대증 예방 및 치료를 위한 약학조성물을 제공한다.
- [0030] 본원 발명의 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향료 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다 (대한약전 해설편, 문성사, 한국약학대학 협의회, 제 5 개정판, p33-48, 1989).
- [0031] 또한, 본 발명은 유자 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선 비대증 예방 및 개선을 위한 건강기능식품을 제

공한다.

- [0032] 본원에서 정의되는 "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0033] 본 발명의 전립선 비대증 예방을 위한 건강기능식품은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.01 내지 95 %, 바람직하게는 1 내지 80 % 중량백분율로 포함한다.
- [0034] 또한, 전립선 비대증 예방을 위한 목적으로 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태인 건강기능식품으로 제조 및 가공이 가능하다.
- [0035] 본 발명은 전립선 비대증의 개선 및 예방 효과를 나타내는 상기 유자 추출물을 유효성분으로 함유하는 건강보조 식품을 제공한다. 상기 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다.
- [0036] 또한, 전립선 비대증의 예방 및 치료 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 5g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.
- [0038] 상기 외에 본 발명의 추출물은 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, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 시료는 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 시료 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

- [0039] 상술한 바와 같이, 본 발명의 유자 추출물이 인체 전립선암 세포주 세포독성이 높은 세포 생존률, 전립선비대증 유발된 12주령의 SD 래트 간으로부터 추출된 5-알파(alpha)-리덕타제(reductase) 1형 및 2형에 대한 저해능 5RD 2형 과발현 전립선 세포주에서의 5RD 활성 억제효과 및 PSA의 mRNA 발현 억제효과 및 동물실험에서의 전립선비대 억제효과를 확인함으로써 전립선 비대증의 치료 및 예방을 위한 약학조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 유자 물, 20%주정, 80%주정 추출물의 전립선세포주에서 유효범위 검토를 나타내는 도면이며 (A)는 LNCaP, (B)는 PC3 세포에서의 결과를 나타내는 도면이며,
 도 2는 전립선비대증 유도 백서의 간에서 유자 물, 20%주정, 80% 주정 추출물의 5-알파-리덕타아제의 억제효과를 나타내는 그래프이며,
 도 3은 전립선세포주에서 5-알파-리덕타아제 type2에 대한 유자 물, 20%주정, 80%주정 추출물의 억제효과를 나타내는 그래프이며,
 도 4는 전립선세포주에서 유자 80% 주정추출물의 PSA mRNA 발현에 미치는 영향에 관한 도면이며,

도 5는 분리한 혈청으로부터 testosterone 수준에 관한 그래프이며,
 도 6는 분리한 혈청으로부터 DHT 수준을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 이하, 본 발명을 하기 실시예, 참고예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [0042] 단, 하기 실시예, 참고예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 참고예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0043] **실시예 1. 유자 추출물의 제조**
- [0044] 유자 추출물의 5RD type 1과 2의 억제활성을 확인하기 위한 추출물의 제조는 다음과 같은 방법으로 실시하였다.
- [0045] 1-1. 유자 80% 주정 추출물의 제조(CJ80S)
- [0046] 유자(경일약업사, 전남 순천)를 절단하고 압착하여 즙을 제거한 후 전열건조 한 건조 유자 30kg을 추출기(1ton, 명일이엔지)에 정제수 60L, 및 주정(240L)을 투입하고 75 °C에서 4시간 동안 추출하였으며, 여과망을 이용하여 여과하였다. 농축기(1ton, 명일이엔지)를 이용하여 45 °C, 750 mmHg 조건에서 25 Brix로 농축한 후, 정제수 100L를 투입하여 25 Brix로 2차 농축하였다. 농축액을 동결건조기(PVTFD10R, 일신랩)로 동결건조하여 유자 80% 주정 추출물 4,080g을 수득하여 하기 실험예 시료로 사용하였다
- [0047] 1-2. 유자 20% 주정 추출물의 제조(CJ20S)5
- [0048] 유자(경일약업사, 전남 순천)를 절단하고 압착하여 즙을 제거한 후 전열건조 한 건조 유자 30kg을 추출기(1ton, 명일이엔지)에 정제수 240L, 및 주정(60L)을 투입하고 95 °C에서 4시간 동안 추출하였으며, 여과망을 이용하여 여과하였다. 농축기(1ton, 명일이엔지)를 이용하여 45 °C, 750 mmHg 조건에서 25 Brix로 농축한 후, 정제수 100L를 투입하여 25 Brix로 2차 농축하였다. 농축액을 동결건조기(PVTFD10R, 일신랩)로 동결건조하여 유자 20% 주정 추출물 4,440g을 수득하여 하기 실험예 시료로 사용하였다
- [0049] 1-3. 유자 물 추출물의 제조(CJW)
- [0050] 유자(경일약업사, 전남 순천)를 절단하고 압착하여 즙을 제거한 후 전열건조 한 건조 유자 30kg을 추출기(1ton, 명일이엔지)에 정제수 300L를 투입하고 100 °C에서 4시간 동안 추출하였으며, 여과망을 이용하여 여과하였다. 농축기(1ton, 명일이엔지)를 이용하여 45 °C, 750 mmHg 조건에서 25 Brix로 농축하였다. 농축액을 동결건조기(PVTFD10R, 일신랩)로 동결건조하여 유자 물 추출물 4,710g을 수득하여 하기 실험예 시료로 사용하였다
- [0051] **실험예 1. 유자 추출물의 세포독성 실험**
- [0052] 상기 실시예 시료들의 인체 전립선암 세포주에서의 세포독성을 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다(Lee et al. J Ethnopharmacol. 118(3):412-7).
- [0053] 사람의 전립선암 세포주 두 종(LNCaP, PC3; ATCC, USA)을 사용하여 세포독성범위를 검토하였다. LNCaP과 PC3 두 전립선 세포주는 1×10^4 cells/well로 96 웰-플레이트에 접종(seeding)한 후에 37°C에서 18시간 배양하고, 3종의 유자 추출물(물, 20%, 80% 주정 추출물)을 0, 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 처리하여 24시간 경과 후 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide: 1mg/mL, Sigma aldrich, USA)를 넣고 37°C에서 2시간 반응시킨 후, 형성된 포마잔 (formazane)을 흡광도 570nm, 레퍼런스 (reference) 630nm에서 측정하여 확인하였다.
- [0054] 상기 실험 결과, 도 1에서 나타난 바와 같이 유자 80% 추출물이 25 µg/mL까지 세포독성이 높은 세포 생존률을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

[0055] 실험예 2. 백서의 간을 이용한 5-알파-리덕타제(RD) 1형 및 2형 저해능 실험

[0056] 상기 실시예 시료들의 백서 간을 이용한 5-알파-리덕타제 1형 및 2형에 대한 저해활성을 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Tatemichi S, J Urol. 2006 Sep;176(3):1236-41).

[0057] 5RD type1 및 2의 저해정도를 확인하기 위하여 전립선비대가 유발된 12주령의 수컷 SD rat (샘타코, 대한민국)의 간을 적출하여 이용하였다. 전립선비대유도를 위하여 7주령의 SD rat(샘타코, 대한민국)을 3일간 적응시킨 후에 4주동안 estrogen (E8875, Sigma aldrich, USA)과 testosterone propionate(F0675, Tokyo Chemical Industry, Japan)를 각각 00.625mg/μl와 62.5 mg/μl 의 농도로 일주일에 1회 피하 주사하여 전립선 비대를 유발시키고 회생시켜 장기를 적출하였다. 적출된 장기는 10배의 인산완충액(phosphate buffer, pH 7.4)로 균질화시킨 후에 3,000 rpm에서 원심분리하여 효소원으로 사용하였다. 3종류 유자 추출물은 실험예 1의 결과로부터 25 μg/mL의 농도를 적용하였으며 5RD의 저해능을 측정하기 위해서 ELISA assay(Bio Vendor, Bruno, Czecho)를 이용하였다. 본 ELISA assay는 T에서 DHT로의 전환을 측정하는 방식으로 양성 대조군(positive control)은 현재 사용되고 있는 5RD type 2의 저해제인 Finasteride (T0028, TCI, Tokyo, Japan) 50 nM의 농도로 사용하였다.

[0058] 상기 실험 결과, 유자의 물 및 80% 주정추출물에서 양성 대조군보다 높은 저해능을 확인하였다.(도 2참조)

[0059] 실험예 3. 5RD type2 과발현 전립선 세포주에서 유자 추출물의 5RD 활성 억제능 실험

[0060] 상기 실시예 시료들의 5RD type2 과발현 전립선 세포주에서의 5RD 활성 억제능에 대한 저해활성을 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Assinder SJ, Prostate. 2008,68(2):115-21;Asada Y et al. Clin Endocrinol Metab. 2001,86(6):2875-80).

[0061] 전립선비대에 주로 관련되어 있다고 알려져 있는 5RD type 2의 억제활성검토를 위하여 LNCaP 세포주(CRL-1740, ATCC, USA)에 SRD5A2가 과발현된 세포주를 제작하여 사용하였으며 제작된 세포주는 10%(w/v) 소태아혈청(fetal bovine serum) 함유 RPMI1640 배지(LM011-01, WeIGENE, USA)에서 배양하였다. 제작된 세포주를 대상으로 5RD type 2의 활성을 검토하기 위하여 6 웰 플레이트에 6 X 10⁵ 세포/웰로 접종하여 70% 증만도(confluence)에 다다른 후에 Charcoal stripped Fetal Calf Serum(F6765, Sigma, USA)를 함유한 RPMI 배지로 48시간동안 처리하였다. Charcoal-strip의 기간동안 각 유자 추출물을 25 μg/mL의 농도로 처리하였으며 이후 배지를 걷어 실험예 2에서 실시한 동일한 ELASA assay를 이용하여 활성을 측정하였다.

[0062] 본 실험 결과는 도 3와 같으며, testosterone 혹은 testosterone과 Finasteride 및 각 추출물을 처리한 후 결과로 작성하였다. testosterone 처리군에서 DHT로의 전환을 100로 볼 때, 80% 주정 추출물의 경우 1.7배의 저해효과를 보였으며 다른 추출물군에 비하여 저해효과가 가장 높은 것으로 확인되었다.

[0063] 실험예 4. 5RD type2 과발현 전립선 세포주에서 80% 유자 추출물의 PSA 변화에 미치는 영향 실험

[0064] 상기 실시예 시료들의 5RD type2 과발현 전립선 세포주에서의 PSA 변화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다(Lee et al. J Ethnopharmacol. 2008, 118(3):412-7).

[0065] 상기의 실험예에서 5RD type1과 2에서 탁월한 저해능을 보인 80% 주정추출물을 대상으로 제작된 전립선 세포주에서 전립선암의 타겟인 prostate specific antigen (PSA)의 변화를 검토하였다. PSA는 전립선의 상피세포에서 합성되는 단백질 효소로 전립선암의 선별에 이용되는 유용한 종양표지자로 5RD 저해를 이용한 전립선비대예방 소재의 선별시 반드시 검토하여 전립선암의 진단에 오류가 없도록 해야하는 요인이다(Lee et al. J Ethnopharmacol. 2008, 118(3):412-7).

[0066] 전립선암세포를 6 웰 플레이트에 10%(w/v) 소태아혈청 함유 RPMI 1640 배지에 3일 배양하고 LNCaP 세포주를 10% CS-FCS 함유 RPMI 1640 배지(일부삭제)로 교환하여 다시 3일간 배양한 후 50nM 농도의 합성 안드로젠 R1881(R0908, Sigma, USA)를 처리하였다. 다시 6시간 후 최종농도 25μg/mL로 유자80% 주정 추출물을 처리하여 16시간 경과 후에 총 RNA를 추출하여 하기 표 1과 같은 조건으로 RT-PCR을 시행하였다. 관련 표적 유전자의 프

라이머(target gene primer)는 다음과 같다:

표 1

| | | | |
|-------|----------------|-----------------------------------|--------|
| PSA | Forward primer | 5'-GCCACCCAGGAGCCAGCACT-3' | 서열번호 1 |
| | Reverse primer | 5'-GGCCCCCAGAATCACCCGAGCAG-3' | 서열번호 2 |
| GAPDH | Forward primer | 5'-CGCGGGGCTCTCCAGAACATCATCC-3' | 서열번호 3 |
| | Reverse primer | 5'-CTCCGACGCCTGCTTCACCACCTTCTT-3' | 서열번호 4 |

본 실시예에서 유자 80% 주정추출물은 PSA의 mRNA 발현을 25 µg/mL의 농도에서 억제하는 것으로 나타났다 (도 4).

실험예 5. 급성독성실험

6 주령의 특정병원체부재 (Specific pathogen-free, SPF) SD계 랫트를 사용하여 급성독성실험을 실시하였다. 각 그룹당 2마리씩의 동물에 본 발명의 유자 추출물을 100 mg/kg의 용량으로 1회 경구투여 하였다. 실험 물질 투여 후 동물의 폐사여부, 임상증상 및 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 강장기와 흉강 장기의 이상여부를 관찰하였다.

본 실험 수행 결과, 실험 물질을 투여한 모든 동물에서 특기할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사 및 부검 소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과, 본 발명의 추출물은 랫트에서 각각 100 mg/kg 까지도 독성변화를 나타내지 않았으며, 경구투여 최소치사량 (LD₅₀)은 100 mg/kg 이상인 안전한 물질로 판단되었다.

실험예 6. 전립선비대를 유발한 백서에서 유자 80%주정 추출물 급여의 효과

상기 실시예 시료들의 전립선비대를 유발한 백서에서 유자 80%주정 추출물 급여에 의한 영향을 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다(Jang H et al. J Agric Food Chem. 2010 Dec 22;58(24):12686-12691;Shin IS et al.Food Chem Toxicol. 2012 50(3-4):884-8).

6-1. 실험 준비

6-1-1. 실험동물 안정화

분양한 래트(male rat, 8주령, 250-300 g, (주)샘타코)는 먹이와 물을 자유섭취 하게하여 72시간 안정화시키고 안정화 이후에 거세술(castration)을 실시하였다.

6-1-2. 시료 준비

실시예에서 얻은 시료(CJ80S;80% 주정추출물)를 여과한 후엔 동결건조하여 실험에 사용하였다.

6-2. 실험시료 투여

거세된 상기 래트(castrated rat)에 testosterone propionate(F0675, Tokyo Chemical Industry, Japan)를 3mg/kg농도로 4주간 투여하여 전립선비대를 유도하였으며, 전립선비대가 유도된 4주 후 준대를 이용하여 유자 80%주정 추출물을 하기 표 2의 스케줄대로 다시 4주간 경구투여하였다.

표 2

| 그룹명 | 시료투여량 | 투여 volume(ml) |
|----------------|----------|---------------|
| Control* | - | 3ml/kg |
| TP-treated | - | 3ml/kg |
| TP-treated/50 | 50mg/kg | 3ml/kg |
| TP-treated/100 | 100mg/kg | 3ml/kg |

| | | |
|---|----------|--------|
| TP-treated/200 | 200mg/kg | 3ml/kg |
| TP-treated/Finasteride | 10mg/kg | 3ml/kg |
| *Control을 제외한 다른 그룹의 rat은 3mg/kg testosterone propionate를 8주간 투여하였음 | | |

[0082] **6-3. 채혈 및 장기적출**

[0083] 실험 시작 후 8주 후, 실험시료 투여 4주 후에 래트를 희생시켜 심장을 채혈하고 전립선을 적출하였으며, 채혈한 혈액은 3000rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하여 (1) 전립선 무게, (2) 혈청중 테스토스테론 수준, (3) 혈청 중 DHT 수준 (4) T(테스토스테론)에서 DHT로의 전환비율을 각각 측정하여 하기 표 3 내지 표 4과 도5 내지 6에 나타내었다.

[0084] **6-4. 측정결과**

[0085] **6-4-1. 전립선 무게 실험**

[0086] 상기 실험 결과, 적출된 전립선 무게 면에서, 본원 발명의 시료를 투여한 래트의 전립선 무게가 전체 체중 대비하여 시료농도에 농도의존적으로 체중 대비 전립선무게를 감소시킴을 확인하였다.

표 3

Prostate 무게

[0087]

| Groups | Prostate (g) | Prostate weight ratio (mg/100g of BW) |
|-----------------|--------------|---------------------------------------|
| Castraion | 0.35±0.04 | 0.085±0.008 |
| BPH | 1.74±0.16 | 0.486±0.037 [#] |
| BPH+CJ80S 50 | 2.01±0.29 | 0.561±0.076 |
| BPH+CJ80S 100 | 1.54±0.18 | 0.421±0.024 |
| BPH+CJ80S 200 | 1.36±0.13 | 0.367±0.029 |
| BPH+Finasteride | 1.49±0.07 | 0.379±0.027 |

Castration : Olive oil injection(s.c.) + PBS(p.o.), BPH : TP(s.c.) + BPS(p.o.), Finasteride : TP(s.c.) + finasteride(10mg/kg, p.o.), *Citrus junos* 50 - 200 : TP(s.c.) + *C. junos*(50, 100 and 200 mg/kg, respectively, p.o.). [#]p<0.05 when compared with the castration group *p<0.05 when compared with the BPH group.

[0088] **6-4-2. 테스토스테론 수준 측정 실험**

[0089] 상기 실험 결과, 분리된 혈청 중 테스토스테론 수준 면에서, CJ 80S를 투여한 래트의 테스토스테론 수준이 시료 농도에 농도의존적으로 유의적으로 감소하였음을 확인하였다(도 5).

[0090] **6-4-3. DHT(디히드로 테스토스테론) 수준 측정 실험**

[0091] 상기 실험 결과, 분리 혈청에서 측정된 다하이드로테스토스테론(DHT) 수준 면에서, CJ 80S를 투여한 래트의 DHT 수준이 전 농도에 유의적으로 효과를 나타내어 유의적으로 감소함을 확인하였다(도 6).

[0092] **6-4-4. T에서 DHT로의 전환비율 측정 실험**

[0093] 상기 실험 결과, 테스토스테론에서 다하이드로테스토스테론으로 변환시키는 5-알파 리덕타아제의 활성을 검토하기 위하여, 상기 도5와 6의 실험 결과로부터 다음 식에 의해서 산출되는 값을 통하여 테스토스테론에서 디하이드로테스토스테론의 전환율을 계산하여 시료의 효과를 확인하였다. 전환율은 하기 수학적 1과 같이 BPH군의 전환율을 1로 보았을 때 상대값으로 표시하였다.

수학식 1

전환율(Conversion ratio) = Testosterone / Dehydrotestosterone

[0094]

표 4

[0095]

| Groups | Conversion ratio (T to DHT) |
|-----------------|-----------------------------|
| Castraion | 0.08±0.003 |
| BPH | 1.00±0.046 |
| BPH+CJ80S 50 | 0.73±0.058 |
| BPH+CJ80S 100 | 0.77±0.069 |
| BPH+CJ80S 200 | 0.62±0.035 |
| BPH+Finasteride | 0.84±0.057 |

Castration : Olive oil injection(s.c.) + PBS(p.o.), BPH : TP(s.c.) + PBS(p.o.), Finasteride : TP(s.c.) + finasteride(10mg/kg, p.o.), *Citrus junos* 50 - 200 : TP(s.c.) + *C. junos*(50, 100 and 200mg/kg, respectively, p.o.).

[0096]

하기에 본 발명의 추출물을 포함하는 약학조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0097]

제제예 1. 산제의 제조

[0098]

CJ80S 추출물 ----- 20 mg

[0099]

유당 ----- 100 mg

[0100]

탈크 ----- 10 mg

[0101]

상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0102]

제제예 2. 정제의 제조

[0103]

CJ20S 추출물 ----- 10 mg

[0104]

옥수수전분 ----- 100 mg

[0105]

유당 ----- 100 mg

[0106]

스테아린산 마그네슘 ----- 2 mg

[0107]

상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0108]

제제예 3. 캡슐제의 제조

[0109]

CJW 추출물 ----- 10 mg

[0110]

결정성 셀룰로오스 ----- 3 mg

[0111]

락토오스 ----- 14.8 mg

[0112]

마그네슘 스테아레이트 ----- 0.2 mg

[0113]

통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0114]

제제예 4. 주사제의 제조

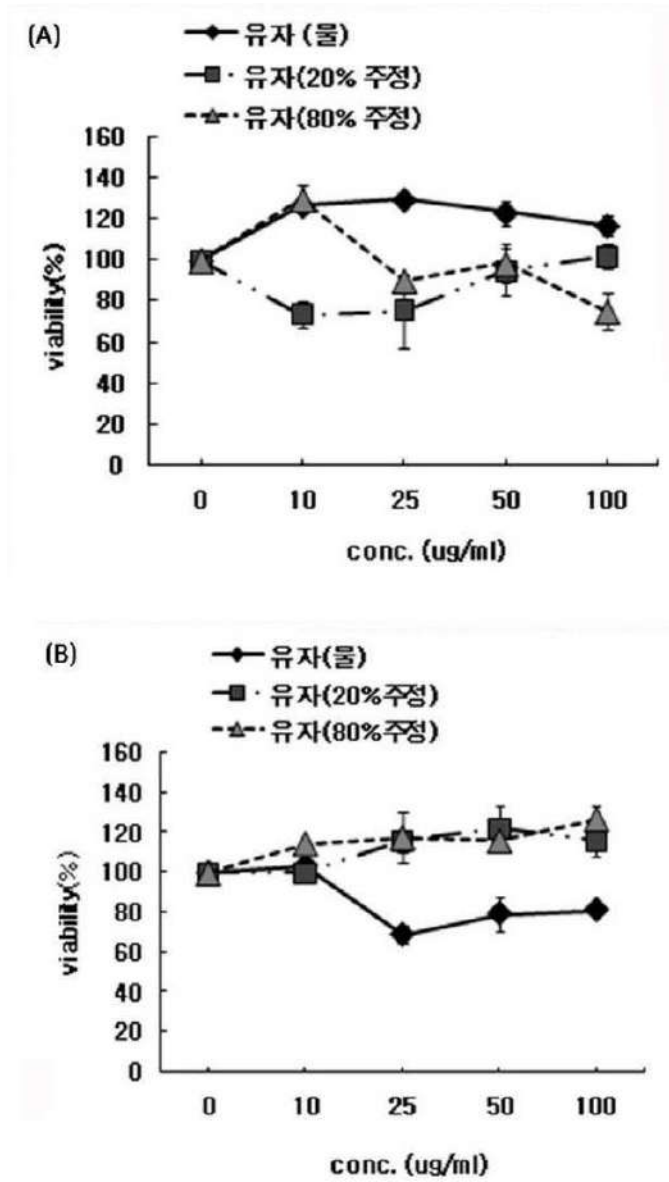
- [0115] CJ80S 추출물 ----- 10 mg
- [0116] 만니톨 ----- 180 mg
- [0117] 주사용 멸균 증류수 ----- 2974 mg
- [0118] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ----- 26 mg
- [0119] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0120] **제제예 5. 액제의 제조**

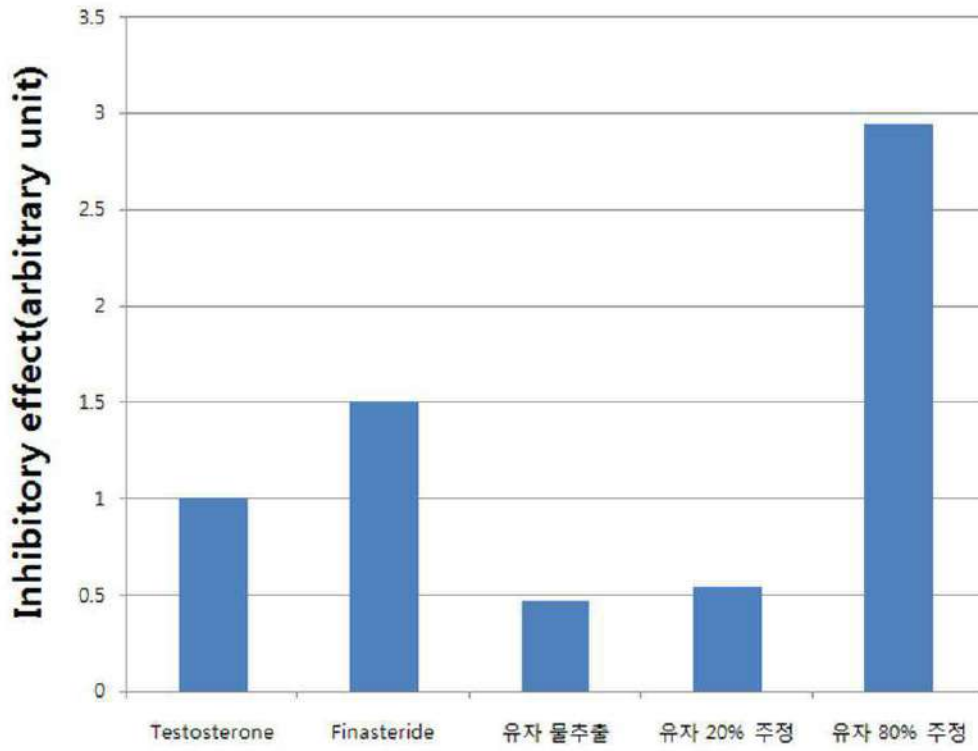
- [0121] CJ20S 추출물 ----- 20 mg
- [0122] 이성화당 ----- 10 g
- [0123] 만니톨 ----- 5 g
- [0124] 정제수 ----- 적량
- [0125] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

도면

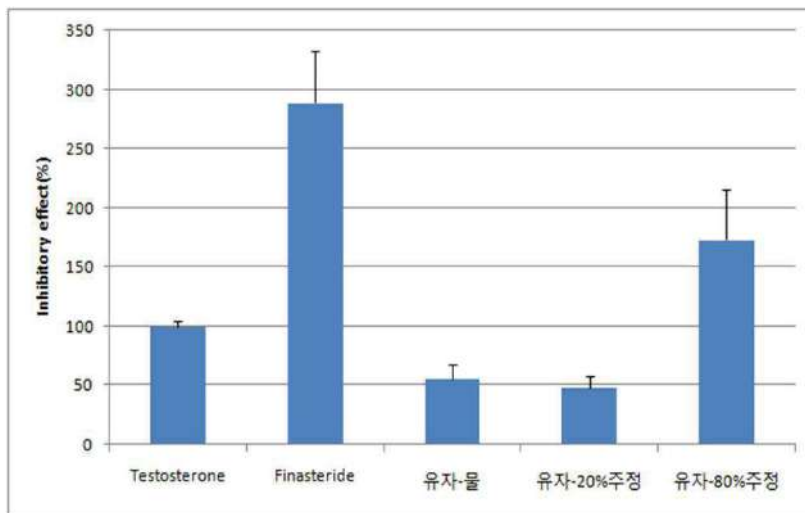
도면1



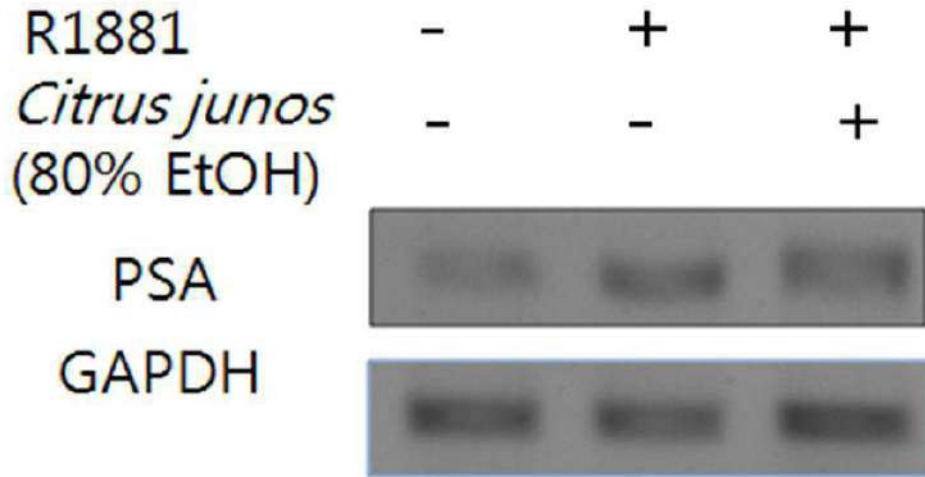
도면2



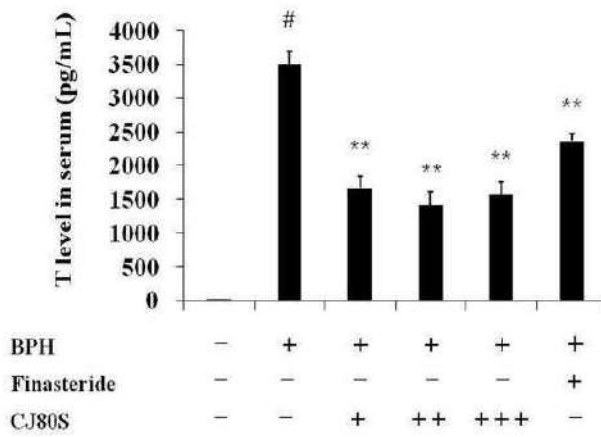
도면3



도면4

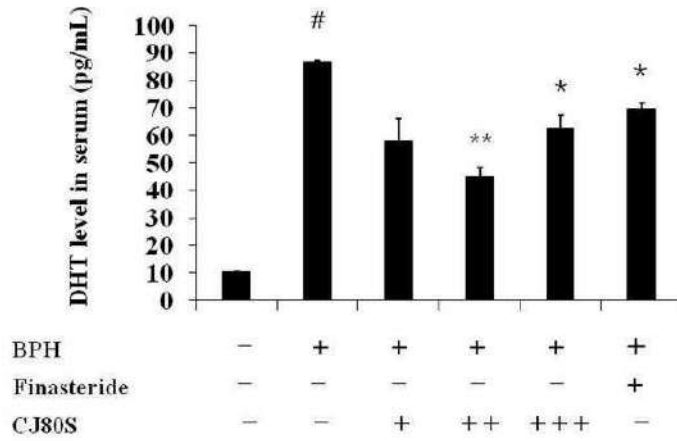


도면5



Castration: Olive oil injection (s.c.) + PBS (p.o.), BPH: TP (s.c.) + PBS (p.o.), Finasteride: TP (s.c.) + finasteride (10 mg/kg, p.o.), *C. junos* 50-200: TP (s.c.) + *C. junos* (50, 100 and 200 mg/kg, respectively, p.o.)
 # Significantly different at the $p < 0.01$ level compared with the castration group., ** at the $p < 0.01$ level compared with the BPH group.

도면6



Castration: Olive oil injection (s.c.) + PBS (p.o.), BPH: TP (s.c.) + PBS (p.o.), Finasteride: TP (s.c.) + finasteride (10 mg/kg, p.o.), *C. junos* 50-200: TP (s.c.) + *C. junos* (50, 100 and 200 mg/kg, respectively, p.o.)
 # Significantly different at the $p < 0.01$ level compared with the castration group., *Significantly different at the $p < 0.05$ level and ** at the $p < 0.01$ level compared with the BPH group.