(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0117153
(43) 공개일자 2019년10월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/53 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61P 19/08 (2006.01) *A61P 19/10* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/53 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0040306
(22) 출원일자 2018년04월06일
심사청구일자 2018년04월06일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
정혁상
서울특별시 성동구 고산자로 160, 108동 701호 (응봉동, 대림 강변 타운)
손영주
서울특별시 강남구 역삼로 315-1, 501동 1601호 (역삼동, 개나리SK뷰)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 하나

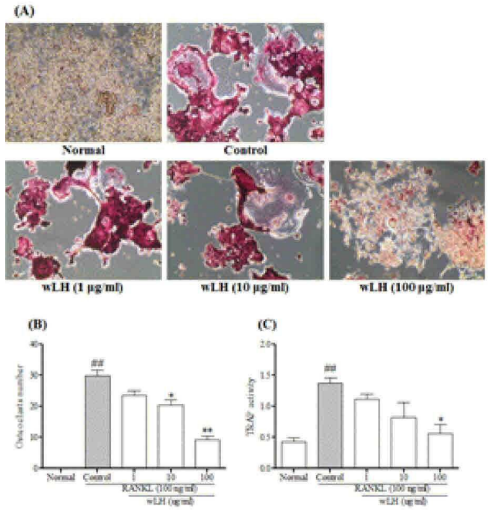
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **택란 추출물을 포함하는 골 질환 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명의 일 실시예는 택란(*Lycopi Herba*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61P 19/08 (2018.01)
A61P 19/10 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/306 (2013.01)

(72) 발명자
김은영
경기도 성남시 중원구 은이로24번길 4, 302호 (은행동, 성진빌라)
김재현
서울특별시 성북구 솔샘로25길 28, 111동 1003호 (정릉동, 정릉풍림아이원아파트)
김좌진
대전광역시 중구 문화로 266 (문화동)
박재호
충청북도 충주시 염밭로 22, 103동 1303호 (용산동, 남산동일하이빌)
정다원
서울특별시 강동구 풍성로 216, 2층 (성내동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017R1A2B4010163
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(미래부)
연구과제명 골절 동물모델에서 골 유합 촉진 한약물의 뼈 형성기전 연구
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교
연구기간 2017.03.01 ~ 2019.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

택란(*Lycopi Herba*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

RANK 신호 경로(RANK signaling pathway)를 억제하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

c-Fos 또는 NFATc1의 발현을 하향 조절하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

파골세포의 분화를 억제하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 추출물은 물, 알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 핵산, 디클로로메탄 또는 이들의 혼합 용매로 추출된 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 골 질환은 골다공증, 골 형성 부전증, 골연화증, 골량 감소증, 골절, 골 결손 및 고관절 감소증으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

택란(*Lycopi Herba*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 골 질환은 골다공증, 골 형성 부전증, 골연화증, 골량 감소증, 골절, 골 결손 및 고관절 감소증으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 골 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 택란 추출물을 유효성분으로 함유하는 골 질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 뼈(bone)는 인체의 연조직과 체중을 지탱해주고 내부기관을 둘러싸서 내부 장기를 외부의 충격으로부터 보호한다.

[0003] 또한 뼈는 근육이나 장기를 구조적으로 지탱할 뿐만 아니라 체내의 칼슘이나 다른 필수 무기질 즉 인이나 마그네슘과 같은 물질을 저장하는 인체의 중요한 부분 중 하나이다.

[0004] 따라서 성장이 끝난 성인의 뼈는 오래된 뼈는 제거하고 새로운 뼈로 대체하는 생성과 흡수 과정을 역동적, 지속적으로 반복 재생하면서 균형을 유지하게 되는데, 이를 골 재형성(bone remodeling)이라고 한다.

[0005] 뼈의 순환(turnover)은 성장과 스트레스에 의해서 일어나는 뼈의 미세한 손상을 회복시키고 그 기능을 유지하는데 필수적이다. 성인에서는 매년 골격의 약 10-30 %가 골흡수-골형성의 리모델링을 통하여 재형성된다.

[0006] 뼈 재형성에는 크게 두 종류의 세포, 뼈를 생성하는 조골세포(osteoblast) 및 뼈를 파괴하는 파골세포(osteoclast)가 관여하며 서로 밀접한 연관성으로 골의 항상성이 유지된다.

[0007] 예를 들어, 조골세포는 RANKL(receptor activator of nuclear factor-κ κB ligand), 및 그의 미끼 수용체인 OPG(osteoprotegerin)과 같은 물질의 분비를 통해 골흡수를 담당하는 파골세포의 분화를 조절함으로써 체내의 골 항상성을 유지한다.

[0008] 즉, RANKL이 파골 전구세포 표면 수용체인 RANK에 결합하면 파골 전구 세포가 파골세포로 성숙화되어 골흡수가 일어나며, OPG가 RANKL과 결합하면 RANKL과 RANK간 결합이 차단되어 파골세포의 형성이 억제된다.

[0009] 전구세포로부터 형성되는 파골세포는 오래된 뼈를 흡수 또는 파괴하며, 뼈에 축적된 소량의 칼슘을 혈류로 방출시켜 신체기능 유지에 사용한다(William J. et al., NATURE.,423, pp.337342, 2033).

[0010] 상기 대사는 물리적 영향, 호르몬 체계 및 국소 인자에 의해 조절되는데, 여러 요인에 의해 골 흡수가 골 형성을 초과하여 골량이 한계 이하로 감소하게 되면 골조직의 손상을 동반한 각종 골질환이 발생한다.

[0011] 이러한 골조직 손상을 동반한 질환의 치료와 관련하여 과거에는 주로 골 무기질, 즉 칼슘과 인의 대사 이상만을 중심으로 연구가 진행되어 왔으며, 그 기전 규명에 있어서 진전을 보지 못하였다. 따라서, 파골세포 분화 억제 물질을 개발하기 위하여 많은 연구가 진행되고 있다.

[0012] 한편, 한의학에서 주로 사용하는 한약재들은 발병 원인 및 증상이 복합적으로 나타나는 만성, 난치성 질환의 예방 및 치료에 있어 멀티 타겟 기전에 의해 보다 근본적인 치료제로서의 가능성이 대두되고 있다.

[0013] 또한, 이러한 한약재를 원료로 사용하는 치료제의 경우 화학 약품 사용에 따라 발생할 수 있는 다양한 부작용을 최소화할 수 있기 때문에, 현존하는 의약품 성분의 대체 소재로 주목 받고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명은 전술한 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 천연물 유래의 성분을 함유하여 부작용을 최소화하면서도 골 질환의 개선 효과가 우수한 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 천연물 유래 성분을 포함하는 골 질환 개선용 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 일 측면에 따르면, 택란(*Lycopi Herba*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 제공된다.

[0017] 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 RANK 신호 경로(RANK signaling pathway)를 억제할 수 있다.

[0018] 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 c-Fos 또는 NFATc1의 발현을 하향 조절할 수 있다.

[0019] 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 파골세포의 분화를 억제할 수 있다.

[0020] 일 실시예에 있어서, 상기 추출물은 물, 알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 핵산, 디클로로메탄 또는 이들의 혼합 용매로 추출될 수 있다.

[0021] 일 실시예에 있어서, 상기 골 질환은 골다공증, 골 형성 부전증, 골연화증, 골량 감소증, 골절, 골 결손 및 고관절 감소증으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있다.

[0022] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 택란(*Lycopi Herba*) 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 일 측면에 따르면, 약학적 조성물 내지 건강기능식품의 일 성분으로 천연 한약재인 택란 추출물을 사용함으로써 부작용을 최소화하면서도 골 질환 개선 효과를 향상시킬 수 있다.

[0024] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 택란 추출물(wLH) 처리에 따른 세포 생존률을 측정한 결과이다.

도 2는 파골세포 분화에 대한 택란 추출물 처리 농도에 따른 (A) TRAP 염색, (B) TRAP 양성 다핵형 파골세포의 수(osteoclast number) 및 (C) TRAP 효소 활성(TRAP activity)의 분석 결과이다.

도 3은 파골세포 골 흡수능에 대한 택란 추출물 처리 농도에 따른 (A) TRAP 염색 및 파골세포에 의한 흡수 구멍(Pit) 이미지 및 (B) 흡수 면적(Pit area/Total area)의 그래프이다.

도 4는 택란 추출물 처리에 대한 NFATc1 단백질의 발현량을 웨스턴 블롯(western blot) 방법으로 측정한 결과이다.

도 5는 택란 추출물 처리에 대한 c-Fos 단백질의 발현량을 웨스턴 블롯(western blot) 방법으로 측정한 결과이다.

도 6은 택란 추출물 처리에 대한 TRAP, NFATc1, c-Fos, CTK, MMP-9 및 CAII mRNA의 발현량을 실시간 정량 중합효소 연쇄반응(Real-time quantitative PCR)으로 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0027] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0028] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다.

[0029] 이하, 본 발명의 실시예를 상세히 기술하나, 하기 실시예에 의해 본 발명이 한정되지 아니함은 자명하다.

[0030] 본 발명의 일 측면에 따른 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 택란(*Lycopi Herba*) 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명자들은 파골세포 분화 억제 활성을 갖는 우수한 식물 생약을 발굴하기 위해, 다양한 생약 원료에 대한 추출 방법을 구체화하였으며 파골세포 분화 억제 활성이 극대화된 상기 골 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 개발하였다.

[0032] 상기 “택란(*Lycopi Herba*)”은 꿀풀과(*Labiatae*) 식물인 쉽싸리(*Lycopus lucidus Turcz.*)의 꽃이 피기 전의 지상부로서, “호란, 용조 또는 호포”로도 호칭된다.

[0033] 상기 택란은 주로 산과 들의 습한 곳에서 서식하며, 여름철 꽃이 피는 시기에 전초를 베어 햇볕에서 말려 사용한다. 상기 택란은 냄새가 없고 맛은 쓰고 매우며 성질은 약간 따뜻하며, 산후 복통과 부종, 월경 장애, 상처, 타박상, 부스럼 등의 치료에 사용되어 왔다.

[0034] 그러나, 상기 택란이 골다공증과 같은 골 질환의 개선 효과 또는 관련한 작용 기전이나 효능은 현재까지 알려진 바 없으며, 본 발명자들은 상기 택란 추출물의 파골세포 분화 억제 활성 효과를 규명하고자 하였다.

[0035] 상기 조성물은 파골세포(osteoclast)의 분화를 억제할 수 있다. 상기 파골세포는 척추 동물의 뼈가 성장하는 과정에서 불필요하게 된 뼈 조직을 파괴 또는 흡수하는 대형의 다핵세포로서 뼈의 밀도를 저하시키고 골다공증을 포함하는 다양한 골 질환을 유발할 수 있다.

[0036] 상기 조성물은 RANK 신호 경로(RANK signaling pathway)를 억제할 수 있고, c-Fos 또는 NFATc1의 발현을 하향 조절할 수 있다.

[0037] 상기 파골세포의 분화는 RANKL이 RANK 수용체와 결합되어 개시될 수 있다. 구체적으로, 상기 RANKL이 RANK에 결합하면 TRAF6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6)와 같은 생물 분자가 활성화될 수 있다.

[0038] 상기 TRAF 패밀리 멤버인 TRAF2, TRAF5, TRAF6는 파골세포의 분화에 필요한 NF-Kb 및 AP-1(activator protein-1) 등의 전사인자를 활성화할 수 있다.

[0039] 상기 RANKL 신호에 의해 활성화된 TRAF6는 PI3K, TAK1(transforming growth factor β-activated kinase), Akt/PKB, 및 JNK, ERK, p38을 포함하는 MAPKs, NF-kB, c-Fos, Fra-1, CREB(cyclic-AMP-responsive-element-binding protein), NFATc1(nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1) 등을 활성화할 수 있다.

[0040] 상기 경로에 의해 카텝신 K(cathepsin K), TRAP(tartrate-resistant acid phospatase), 칼시토닌 수용체 및 OSCAR(osteoclast-associated receptor) 등 파골세포-특이적 유전자들이 발현될 수 있다.

[0041] 상기 택란 추출물은 파골세포 분화에 직접적으로 관련된 RANK 신호 경로(RANK signaling pathway)를 억제하며, 상기 신호 경로에 관여하는 핵심 기전인 c-Fos 또는 NFATc1의 발현을 하향 조절함으로써 골 형성을 촉진할 수 있다.

[0042] 상기 “추출물”은 용매와 추출재료를 특정 조건하에서 접촉시킴으로써 추출재료에 함유된 유효성분을 분리해낸 것으로, 상기 추출물은 택란에 대한 추출 공정에 의해 원료 내의 유효성분을 포함할 수 있다.

[0043] 상기 택란 추출물은 천연물로부터 추출물을 추출하는 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라, 즉, 통상적인 온도, 압력의 조건 하에서 통상적인 용매를 사용하여 추출할 수 있다. 예컨대, 상기 택란 추출물은 물, 알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 헥산, 디클로로메탄 또는 이들의 혼합 용매를 사용하여 추출할 수 있으며, 바람직하게는 물을 사용할 수 있다.

[0044] 또한, 상기 추출 방법은 열수 추출, 냉침 추출, 환류 추출, 초음파 추출 등의 다양한 방법을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 열수 추출을 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 상기 골 질환은 조골세포의 활성 촉진 또는 파골세포의 활성 억제를 통해 골량 증가가 필요 또는 요구되는, 상태 또는 질병을 의미하는 것으로 골다공증, 골 형성 부전증, 골연화증, 골량 감소증, 골절, 골 결손 및 고관절 감소증으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있으나, 파골세포 분화 촉진에 의해 발생하는 질환 또는 병태라면 특별히 제한되지 않는다.

[0046] 상기 “유효성분으로 포함하는”은 투여하고자 하는 개체에 대한 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 택란 추출물을 포함하는 것을 의미하며, 택란 추출물은 생체 안전성이 우수하므로 당업자가 다양한 변수를 고려하여 양적 상한을 적절히 조정할 수 있다.

[0047] 상기 “예방”은 동물의 병리학적 세포의 발생 또는 세포의 손상, 소실의 정도의 감소를 의미한다. 예방은 완전할 수 있으며 또는 부분적일 수도 있다. 이 경우에는 개체 내의 병리학적 세포의 발생 또는 파골세포 증식 등이 상기 골 질환 예방 및 치료용 조성물을 사용 하지 않은 경우와 비교하여 감소하는 현상을 의미할 수 있다.

[0048] 또한, 상기 “치료”는 골 질환의 하나 이상의 증상을 개선하거나, 증상의 진행을 저지하는 것을 의미하며, 통상적으로 사용되는 치료의 의미를 포괄할 수 있다.

[0049] 상기 택란 추출물은 화학물질 등과 달리 천연물 유래의 물질을 그대로 이용하는 것이므로, 이의 섭취 내지 투여에 따른 치명적인 부작용의 발생을 최소화할 수 있다.

[0050] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 발명의 용어 "약학적으로 허용 가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다.

[0051] 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0052] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 생리식염수, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록 시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 덱스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜 및 리퀴드 파라핀으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용 가능하다. 상기 성분들은 상기 유효성분인 택란 추출물에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.

[0053] 또한, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화 하여 사용할 수 있다.

[0054] 상기 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 택란 추출물과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제, 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 또는 젤라틴 등을 혼합하여 조제할 수 있다. 상기 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제가 사용될 수도 있다.

[0055] 본 명세서에서 사용된 용어 “분획물(fraction)”은 각종 구성성분 또는 혼합물로부터 각각의 성분 또는 특정의 그룹으로 분리하는 조작, 즉 크로마토그래피, 전기영동, 원심분리 등을 사용하여 분리된 각 성분 내지 그룹을 의미한다.

[0056] 상기 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0057] 상기 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 사용될 수 있다. 상기 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르가 사용될 수 있다. 상기 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴이 사용될 수 있다.

[0058] 상기 택란 추출물을 포함하는 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양이 대상체에 투여될 수 있다.

[0059] 상기 “약제학적으로 유효한 양”은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0060] 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 바람직하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0061] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 택란을 열수추출 후 동결 건조하여 분말 엑스를 수득하였다. 수득된 택란 추출물은 세포독성이 없고(도 1), 파골세포의 골 흡수능을 감소시키며(도 2), 파골세포의 분화와 관련된 유전자의 발현을 억제할 수 있다(도 3 내지 6).

[0062] 따라서, 상기 택란 추출물은 골 질환의 주요 원인으로 알려진 파골세포 분화를 효과적으로 억제하는 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0063] 본 발명의 다른 측면은 택란(*Lycopi Herba*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0064] 즉, 상기 조성물은 약학 조성물 뿐만 아니라 식품 조성물일 수도 있다. 상기 식품은 육류, 스낵류, 낙농제품, 음료수 등을 예시할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 통상적인 건강기능식품을 모두 포함하는 개념으로

이해될 수 있다.

[0065] 상기 건강기능식품은 건강기능식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, 상기 기능성은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미할 수 있다.

[0066] 상기 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 식품 첨가물은 다른 규정이 없는 한 식품의 약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 적합성 여부를 판단할 수 있다.

[0067] 상기 식품 첨가물 공전에 기재된 품목은 예컨대 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류를 들 수 있다.

[0068] 상기 건강기능식품은 골 질환 개선을 위한 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있으며, 예컨대, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 보조 식품, 식품 첨가제 등에 사용될 수 있다.

[0069] 상기 건강기능식품은 골 질환 개선을 목적으로, 전체 중량 대비 1.0 내지 10.0 중량%의 상기 조성물을 포함할 수 있다. 상기 조성물이 1.0 중량% 미만이면 골 질환 개선 효과가 충분히 구현되지 않을 수 있고 10.0 중량% 초과이면 제품 본연의 품질이 구현되지 않거나 비용 효율이 저하될 수 있다.

[0070] 또한, 상기 건강기능식품은 골 질환 개선을 목적으로 정제, 과립, 분말, 캅셀, 액상의 용액 및 환으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조 및 가공될 수 있다.

[0071] 구체적으로 상기 정제 형태의 건강기능식품은 택란 추출물 또는 이의 분획물, 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와의 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축 성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수 있으며, 필요에 따라 적당한 제피제로 제피할 수도 있다.

[0072] 상기 캅셀 형태의 건강기능식품 중 경질캅셀제는 통상의 경질캅셀에 가지 추출물 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물 또는 그의 입상물 또는 제피한 입상물을 충진하여 제조할 수 있으며, 연질캅셀제는 택란 추출물 또는 이의 분획물, 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 젤라틴 등 캅셀기제에 충진하여 제조할 수 있다.

[0073] 상기 연질캅셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 솔비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0074] 상기 환 형태의 건강기능식품은 택란 추출물 또는 이의 분획물, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 전분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의를 입힐 수도 있다.

[0075] 상기 과립형태의 건강기능식품은 택란 추출물 또는 이의 분획물, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다

[0076] 또한, 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함할 수 있다.

[0077] 이하, 첨부된 도면을 참고하여 본 발명의 실시예에 관하여 상세히 서술하나, 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0078] **제조예 1 : 택란 열수 추출물(wLH)의 제조**

[0079] 택란 500g을 증류수 5000mL에 첨가하여 100℃에서 2시간 동안 전탕 후 2시간 냉각하고, 여과한 후, 동결건조하여 택란 건조 분말 엑기스를 수득하였다. 세포 배양시 사용한 택란은 0.22㎛ 멸균 필터로 여과하여 사용하였다.

[0080] **제조예 2 : 세포 배양**

[0081] 마우스의 대식세포주인 RAW264.7 세포는 한국세포주은행(Korean Cell line bank, NO. 40071)에서 분양받아 사용하였다.

[0082] 10% FBS(Fetal Bovine Serum) 및 1%의 P/S(페니실린 및 스트렙토마이신)를 포함하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지에 상기 세포를 분주하여 95%의 습도, 37℃, 5% CO_2의 조건에서 배양하였다.

[0083] **실시예 1 : 세포독성 분석**

[0084] 택란 추출물의 세포독성을 알아보기 위해 상기 제조예 1의 택란 추출물을 상기 제조예 2의 세포에 처리한 후 MTT assay를 이용하여 세포 증식을 측정하였다.

[0085] 구체적으로, 상기 세포를 24시간 동안 안정화 후 배양액에 택란 추출물 0, 1, 10, 100 ㎍/mL을 각각 처리한 후 동일한 조건의 배양기에서 24시간 동안 배양하였다.

[0086] 배양된 세포들은 MTT assay solution 처리 후 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0087] 세포 독성 측정 결과는 시료의 흡광도를 대조군(택란 추출물 0 ㎍/mL, control, con)의 흡광도에 대한 백분율로 표시하였다.

[0088] 측정 결과, 택란 추출물 1, 10, 100 ㎍/mL을 처리하였을 때 세포 독성이 나타나지 않았다(도 1).

[0089] **실시예 2 : 파골세포 분화능 평가**

[0090] 택란 추출물이 파골세포 분화에 미치는 영향을 알아보기 위해 상기 제조예 2의 세포에 RANKL을 처리하여 파골세포로의 분화를 유도하고, TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase) 염색법을 이용하여 파골세포 분화능을 분석하였다.

[0091] 구체적으로, 상기 제조예 2의 RAW 264.7 세포에 RANKL 100 ng/mL를 처리하고 택란 추출물 0, 1, 10, 100 ㎍/mL을 각각 처리한 후 5일 동안 배양하였다. 배양된 세포는 TRAP assay kit를 사용하여 염색하였다.

[0092] 현미경을 사용하여, 100배율에서 핵이 3개 이상인 TRAP 양성 다핵형 파골세포(MNCs)를 파골세포로 계수하였다. RAW 264.7 세포에 RANKL을 처리하지 않은 세포는 정상군(normal, nor)으로 하였다.

[0093] 대조군의 경우 정상군에 비해 TRAP 양성 다핵형 파골세포가 다수 생성되었으나, 택란 추출물을 함께 처리한 실험군의 경우 택란 추출물 농도에 의존적으로 TRAP 양성 다핵형 파골세포 형성이 억제되었다(도 2A).

[0094] TRAP 양성 다핵형 파골세포를 파골세포로 간주하고 계수한 결과, TRAP 양성 다핵형 세포 수 역시 택란 추출물 농도 의존적으로 감소하였다(도 2B).

[0095] 4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate(sigma aldrich, MO, USA) 4.93 mg, 0.5 M acetate 850 ㎕ 및 tartrate acid solution 150 ㎕를 섞어 만든 시약 50 ㎕와 세포를 배양한 배지 50 ㎕를 새로운 96-well plate에 투입하였다.

[0096] 37 ° C에서 60분 동안 반응시킨 후, 0.5M NaOH를 50 ㎕를 투입하여 반응을 종료 시키고, 405nm에서 흡광도를 측정함으로써 TRAP 효소 활성(TRAP activity)을 평가하였다.

[0097] 측정 결과, 택란 추출물을 함께 처리한 실험군에서는 택란 추출물 농도에 의존적으로 TRAP 효소 활성이 감소하였다(도 2C).

[0098] 상기 결과는 택란 추출물은 파골세포의 분화능을 억제하는 효과가 우수함을 시사한다.

[0099] **실시예 3 : 파골세포의 골 흡수능 평가**

[0100] 택란 추출물이 파골세포의 골 흡수능에 미치는 영향을 알아보기 위해, 상기 제조예 2의 세포를 안정화한 후 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화를 유도하고 파골세포가 생성한 pit를 측정하여 파골세포의 골 흡수능을 분석하였다.

[0101] 상기 RAW 264.7 세포를 osteo assay strip well plate(Coring incorporated, New York, USA)에서 24시간 동안 안정화하였다. RANKL 100 ng/mL을 첨가한 배양액으로 교환하고 택란 추출물 0, 1, 10, 100 ㎍/mL을 각각 처리한 후 5일 동안 배양하였다.

[0102] 배양된 세포들은 4% NaClO를 사용하여 제거한 후 현미경을 통해 파골세포에 의하여 형성된 흡수 구멍(resorption pit)을 관찰하고, 파골세포에서 의하여 형성된 흡수 구멍의 크기(Pit area)와 전체 크기(Total area)의 비율을 측정하여 파골세포의 골 흡수능을 분석하였다.

[0103] 관찰 결과, 정상군에 비해 대조군에서 흡수 구멍이 유의하게 증가하였으며, 택란 추출물을 처리한 실험군에서는 택란 추출물 농도에 의존적으로 흡수 구멍의 형성이 감소되었다.

[0104] 특히, 100 ㎍/mL의 농도로 처리한 실험군에서 흡수 구멍의 형성이 유의하게 감소하였다($p<0.05$)(도 3).

[0105] 상기 결과는 택란 추출물에 파골세포의 골 흡수능을 억제하는 효과가 있음을 시사한다.

[0106] **실시예 4 : NFATc1 및 c-Fos 단백질 발현 억제 활성 평가**

[0107] 택란 추출물이 파골세포 분화의 주된 기전인 NFATc1(nuclear factor of activated T cells 1) 및 c-Fos 단백질 발현에 미치는 영향을 웨스턴 블롯(western blot)을 통해 분석하였다.

[0108] 보다 구체적으로, 제조예 2의 RAW 264.7 세포에 RANKL 100 ng/mL을 처리한 후 택란 추출물 0, 1, 10, 100 μg/ml을 각각 처리한 뒤 1일 동안 배양하였다.

[0109] 배양된 세포들은 protease inhibitor와 phosphatase inhibitor가 들어있는 RIPA buffer(1 M Tris (pH 7.4), 3 M NaCl, NP-40, 10% Na deoxycholate, 10% SDS)를 이용하여 용해시키고 단백질을 추출하였다.

[0110] SDS-PAGE and Western blotting을 실시하여 세포에서 단백질을 분리하고, 분리된 단백질을 nitrocellulose transfer membrane에 옮겼다.

[0111] TBST(0.05% Tween-20 in Tris-buffered saline, pH 7.4)에 녹인 5% 탈지유를 이용하여 막에 있는 비특이적 결합부위를 모두 블로킹하였다.

[0112] NFATc1 및 c-Fos를 1차 항체로서 각각 항-NFAT(Santacruz, CA, USA) 및 항-c-fos(Cell Signaling, Danvers, MA, USA)에 반응시켰다.

[0113] PBST로 5회 세정하고 호스라디시 페록시다제(hoseradish peroxidase: HRP)가 결합된 2차 항체와 반응시킨 후 ECL Advance(Amersham Pharmacia Biotech, NY, USA)로 발색시켜 분석하였다.

[0114] 분석 결과 NFATc1 단백질의 발현은 대조군에서 정상군에 비해 유의하게 증가하였으며, 택란 추출물을 함께 처리한 실험군에서는 택란 추출물 농도 의존적으로 NFATc1의 단백질 발현이 감소하였다.

[0115] 특히, 택란 추출물 100 μg/mL을 처리한 실험군에서 NFATc1 단백질 발현이 유의하게 감소하였다($p<0.05$)(도 4).

[0116] 또한, c-Fos 단백질의 발현은 대조군에서 정상군에 비해 유의하게 증가하였으며, 택란 추출물을 1 μg/mL 처리한 실험군에서는 대조군과 비슷한 경향을 보였으나, 택란 추출물 10, 100 μg/mL을 처리한 실험군의 경우 택란 추출물 농도에 의존적으로 c-Fos의 단백질 발현량이 감소하였다.

[0117] 특히, 택란 추출물 100 μg/mL을 처리한 실험군에서 c-Fos 단백질 발현이 유의하게 감소하였다($P<0.05$)(도 5).

[0118] **실시예 5 : RANK 신호 경로 억제 활성 평가**

[0119] 택란 추출물이 파골세포 분화의 주된 기전인 TRAP, NFATc1, c-Fos, CTK(Cathepsin K), MMP-9(matrix metalloproteinase-9) 및 CAII(Carbonic anhydrase II)의 mRNA 발현에 미치는 영향을 실시간 정량 중합효소 연쇄반응(Real-time quantitative PCR)을 통해 분석하였다.

[0120] 구체적으로, 상기 제조예 2에서 제조한 RAW 264.7 세포에 RANKL 100 ng/mL을 처리하고 택란 추출물 0, 1, 10, 100 μg/mL를 각각 처리한 후 4일 동안 배양하였다.

[0121] 배양된 세포에 Trizol 용액(Invitrogen, USA)을 처리하여 전체 RNA(total RNA)를 추출하였다.

[0122] 추출한 2 μg 의 RNA를 제조의 지시에 따라 reverse transcriptase를 사용하여 cDNA(complementary DNA)로 합성하였다. 합성한 cDNA는 KAPA PCR kit(Kapa Biosystems)를 사용하여 real-time PCR을 수행하였다.

[0123] GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)를 이용하여 mRNA 농도를 표준화(normalization) 하였다.

[0124] Image J software(Ver. 1.46, National Institutes of Health)를 사용하여 각 band density의 데이터 분석을 진행하였으며, 실험에 사용된 프라이머 서열은 하기 표 1과 같다.

표 1

구분	서열	
TRAP	Forward	5'-ACTTCCCCAGCCCTTACTACCG-3'
	Reverse	5'-TCAGCACATAGCCCACACCG-3'
NFATc1	Forward	5’-TGCTCCTCCTCCTGCTGCTC-3'
	Reverse	5’-CGTCTTCCACCTCCACGTCG-3'

c-Fos	Forward	5′-ATGGGCTCTCCTGTCAACAC-3'
	Reverse	5′-GGCTGCCAAAATAAACTCCA-3'
MMP-9	Forward	5’-CGACTTTTGTGGTCTTCCCC-3'
	Reverse	5’-TGAAGGTTTGGAATCGACCC-3'
RANK	Forward	5′-AAACCTTGGACCAACTGCAC-3'
	Reverse	5′-ACCATCTTCTCCTCCCHAGT-3'
CAII	Forward	5’-CTCTCAGGACAATGCAGTGCTGA-3'
	Reverse	5’-ATCCAGGTCACACATTCCAGCA-3'
CTK	Forward	5’-AGGCGGCTATATGACCACTG-3'
	Reverse	5’-CCGAGCCAAGAGAGCATATC-3'
CTR	Forward	5’-TGCATTCCCGGGATACACAG-3'
	Reverse	5’-AGGAACGCAGACTTCACTGG-3'
GAPDH	Forward	5’-ACTTTGTCAAGCTCATTTCC-3'
	Reverse	5’-TGCAGCGAACTTTATTGATG-3'

[0126] 그 결과, c-Fos 및 TRAP의 mRNA 발현이 정상군에 비해 유의하게 증가하였으며, 택란 추출물을 1 μg/mL 처리한 실험군에서는 대조군과 비슷한 경향을 보였다.

[0127] 반면, 택란 추출물 10, 100 μg/mL을 처리한 실험군의 경우 택란 추출물 농도에 의존적으로 TRAP의 mRNA 발현량이 감소하였다.

[0128] 특히, 택란 추출물 100 μg/mL을 처리한 실험군에서 c-Fos 및 TRAP의 mRNA 발현량이 유의하게 감소하였다 ($P<0.01$).

[0129] 또한, 대조군에서 NFATc1, RANK, CAII 및 CTK의 mRNA 발현이 정상군에 비해 유의하게 증가하였으며, 택란 추출물을 함께 처리한 실험군에서는 택란 추출물 농도에 의존적으로 RANK, CAII 및 CTK의 mRNA 발현이 감소하였다.

[0130] 특히, 택란 추출물 10, 100 μg/mL을 처리한 실험군에서 NFATc1, RANK, CAII 및 CTK mRNA 발현이 유의하게 감소하였다($p<0.01$).

[0131] 한편, MMP-9의 mRNA 발현의 경우, 대조군에서는 정상군에 비해 MMP-9의 mRNA 발현량이 유의하게 증가하였으나, 대조군과 택란 추출물을 처리한 실험군 간에는 유의한 차이가 없었다(도 6).

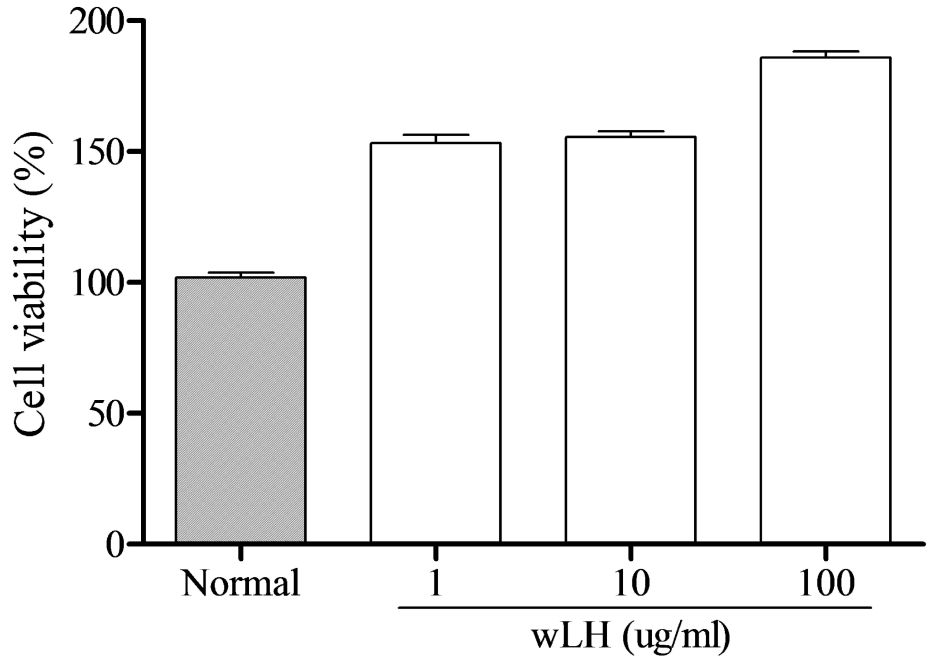
[0132] 상기 결과는 택란 추출물이 파골세포의 분화와 관련된 유전자의 발현을 억제하여 우수한 파골세포 분화 억제 활성을 가지고, 골 질환을 효과적으로 완화 또는 개선시킬 수 있음을 시사한다.

[0133] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

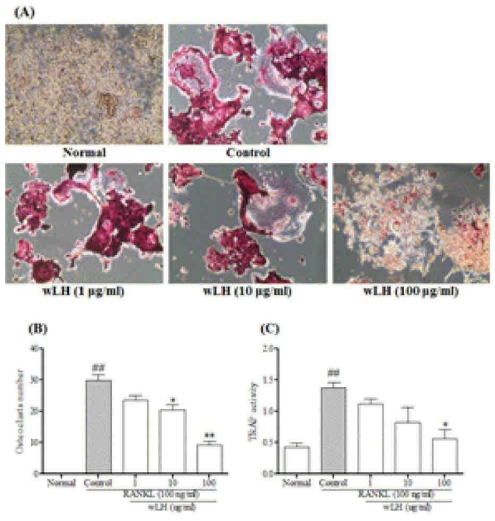
[0134] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

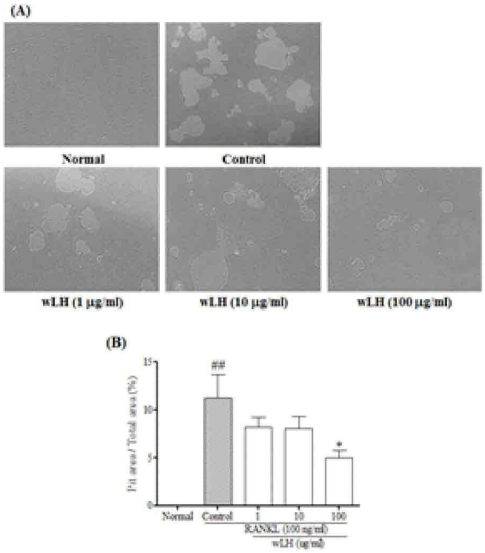
도면1


200
150
100
50
0
Cell viability (%)
Normal
1
10
100
wLH (ug/ml)

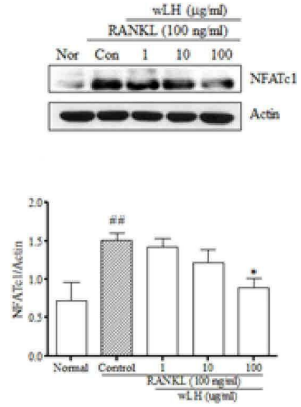
도면2


(A)
Normal
Control
wLH (1 μg/ml)
wLH (10 μg/ml)
wLH (100 μg/ml)
(B)
(C)

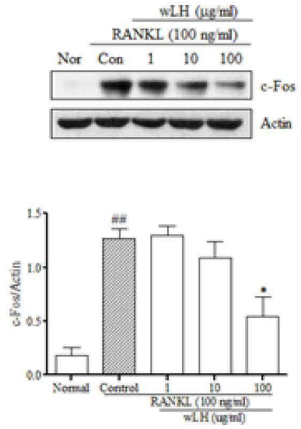
도면3


(A)
Normal
Control
wLH (1 μg/ml)
wLH (10 μg/ml)
wLH (100 μg/ml)
(B)
Pit area / Total area (%)
##
*
Normal
Control
1
10
100
RANKL (100 ng/ml)
wLH (ug/ml)

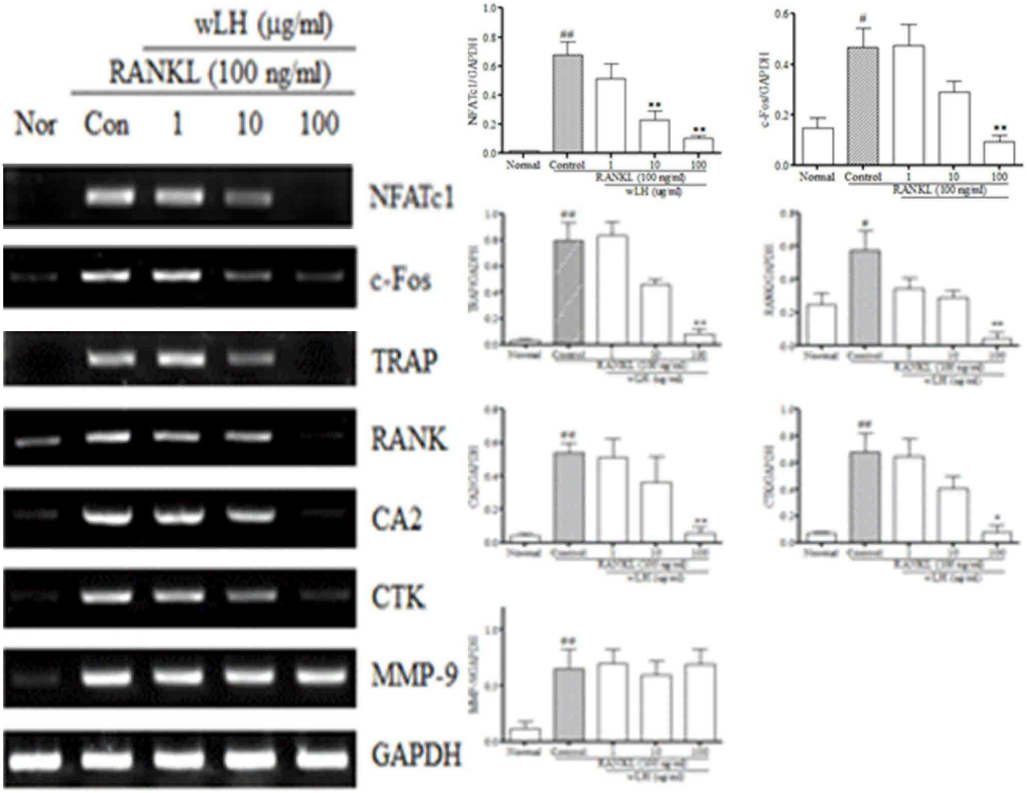
도면4


wLH (μg/ml)
RANKL (100 ng/ml)
Nor
Con
1
10
100
NFATc1
Actin
NFATc1/Actin
##
*
Normal
Control
RANKL (100 ng/ml)
wLH (ug/ml)

도면5


wLH (μg/ml)
RANKL (100 ng/ml)
Nor
Con
1
10
100
c-Fos
Actin
c-Fos/Actin
##
*
Normal
Control
RANKL (100 ng/ml)
wLH (ug/ml)

도면6


wLH (μg/ml)
RANKL (100 ng/ml)
Nor
Con
1
10
100
NFATc1
c-Fos
TRAP
RANK
CA2
CTK
MMP-9
GAPDH