

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2021-0044021
(43) 공개일자 2021년04월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/36 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)*A61P 19/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/36 (2013.01)*A23L 33/105* (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0127076

(22) 출원일자 2019년10월14일

심사청구일자 2019년10월14일

기술이전 희망 : 기술양도

(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

위병갑

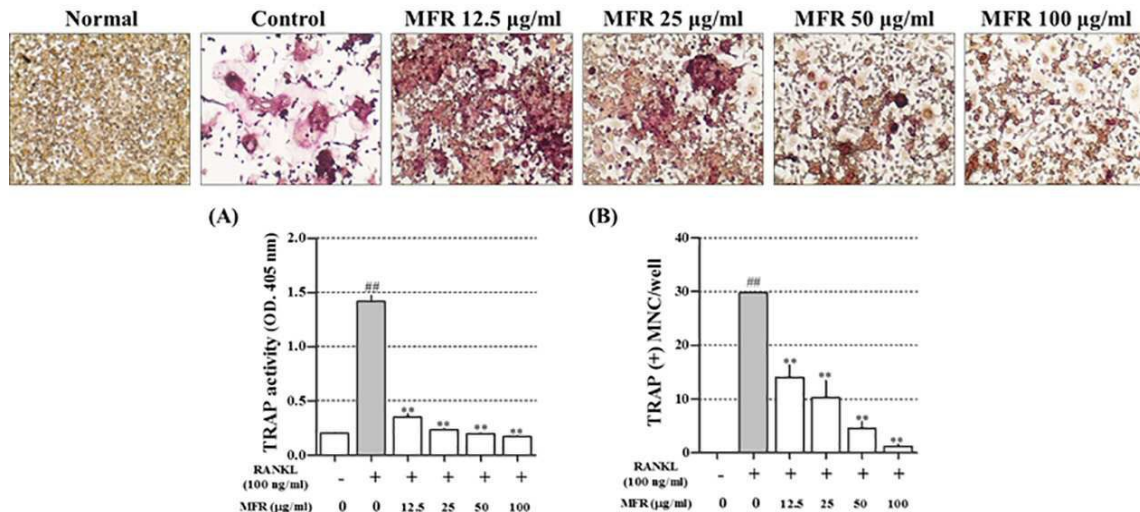
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 왕불류행 추출물을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 왕불류행 추출물의 골 질환 예방 또는 치료 효과에 관한 것으로, 본 발명의 왕불류행 추출물은 세포독성이 없으면서, 파골세포의 분화를 억제하고, 파골세포의 분화 전사인자의 발현을 억제하며, 골 흡수 관련 유전자의 발현을 억제하므로, 이를 골 손실 억제 용도 또는 골 질환 예방 또는 치료 용도로 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 19/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/306 (2013.01)

(72) 발명자

김재현

서울특별시 동대문구 이문로 18, 1105-2호(회경동)

김민선

대전광역시 동구 대전로542번길 78-1, 207동 1401호(천동, 휴먼시아2단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1D1A1B03028505

부처명 한국연구재단

과제관리(전문)기관명 한국연구재단(학술진흥)

연구사업명 이공분야기초연구사업/기본연구지원사업

연구과제명 스테로이드 병용 · 대체 한약물 개발 연구: 골질환 타겟 상승효과 및 부작용 제어 기

술

기 여 율 1/1

과제수행기관명 경희대학교

연구기간 2017.06.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

왕불류행(*Melandrii Herba*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 골 손실 억제용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 무수 또는 함수알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 글리세린, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 부틸렌글리콜로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 하나의 추출용매로 추출된, 골 손실 억제용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 파골세포의 분화 또는 골 흡수를 억제하는, 골 손실 억제용 조성물.

청구항 4

왕불류행 추출물을 유효성분으로 함유하는 골 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 골 질환은 골다공증(osteoporosis), 골 감소증(osteopenia), 골 용해성 전이(osteolytic metastasis), 노인성척추후만증(senile kyphosis) 및 파제트병(paget disease)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 골 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서, 파골세포 분화와 관련된 유전자의 발현을 억제하는, 골 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 파골세포 분화와 관련된 유전자는 NFATc1(nuclear factor of activated T cell c1), c-Fos 및 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인, 골 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제 4항에 있어서, 골 흡수와 관련된 유전자의 발현을 억제하는, 골 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, 골 흡수와 관련된 유전자는 MMP-9(matrix methalloproteinase 9), CTK(Cathepsin K) 및 CA2(carbonic anhydrase II)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인, 골 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

왕불류행 추출물을 함유하는 골 질환 개선용 식품 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서, 골 질환은 골다공증(osteoporosis), 골 감소증(osteopenia), 골 용해성 전이(osteolytic metastasis), 노인성척추후만증(senile kyphosis) 및 파제트병(paget disease)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 골 질환 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 왕불류행 추출물의 골 질환 예방 또는 치료 효과에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뼈는 조골세포(osteoblast)에 의한 골 형성과 파골세포(osteoclast)의 균형을 통해 유지된다 (Alliston T. et al. Interfering with bone remodelling. Nature. 2002;416:686-687.). 조골세포와 파골세포의 균형을 유지하는 것은 골 항상성 유지에 필수 요소이다.

[0003] 노령화에 의한 파골세포와 조골세포 간의 균형 붕괴는 조골세포의 골 형성 능력보다 파골세포의 골 파괴 능력이 과도하여 항상성이 깨어짐으로써 발생하며, 이는 노령화에 의한 골 질환의 예방 및 치료 방법은 파골 세포에 의한 골 흡수를 억제하는 것이 중요하다는 것을 의미한다 (Tanaka, Y., et al., 2005). 조골세포의 활성을 증가하는 과도한 파골세포 활성화는 여러 가지 골 질환을 야기하며, 뼈의 질량감소와 골격의 구조적 악화를 특징으로 한다 (Kim N. et al. Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis. J Exp Med. 2005;202:589-595.).

[0004] 파골세포는 조혈모세포에서 유래된 대식세포(macrophage)가 M-CSF(macrophage colony-stimulating factor)와 RANKL(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand)에 의해 여러 분화 단계를 거쳐 생성된다 (Asagiri, M., et al., 2007; Chambers, T.J., 2000). 파골세포의 전구세포 표면에 존재하는 RANK(receptor activator of nuclear factor- κ B)에 RANKL이 결합하게 되면 TRAF6(TNF receptor associated factor 6), c-Fos 및 NFATc1(nuclear factor of activated T cell c1) 등이 활성화되어 파골세포로의 분화(differentiation)를 유도하게 된다 (Sakae T., et al., 2003). 특히, TRAF6의 유도는 p38, ERK(extracellular-signal regulated kinases), JNK(c-Jun N-terminal kinases) 등과 같은 MAPKs(mitogen-activated protein kinases)와 NF- κ B(nuclear factor- κ B), c-Fos 및 NFATc1과 같은 파골세포의 분화에 중요한 인자들을 활성화시킨다 (Dickson, K.M., et al., 2004). 이 중 NFATc1은 파골세포의 분화에 필수적인 중요한 전사인자로 파골세포 지표인 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase), OSCAR(osteoclast-associated receptor), CtsK(cathepsin K), MMP-9(matrix methalloproteinase 9) 및 DC-STAMP(dendritic cell-specific transmembrane protein) 등의 발현을 촉진하여 파골세포의 분화 및 기능을 활성화시켜 (Qing Hong, Z., et al., 2013), 골 흡수, 활성화, 생존 및 분화를 조절한다 (Ginaldi L, Di Benedetto MC, De Martinis M. Osteoporosis, inflammation and ageing. Immun Ageing. 2005 Nov;4;2:14.).

[0005] 현재 골다공증 치료에 가장 많이 사용되고 있는 치료제는 비스포스포네이트(bisphosphonates) 제제이다 (Cheng MH, et al. Osteoporosis Osteoporosis treatment in postmenopausal women with pre-existing fracture. Taiwan J Obstet Gynecol. 2012;51:153-66.). 하지만, 비스포스포네이트 제제로 치료받은 환자들에게서 많은 부작용이 발견되면서 골다공증 치료제에 대한 문제점이 제기되고 있으므로, 부작용이 적으면서 좋은 치료효과를 낼 수 있는 치료제 개발하기 위한 연구는 진행 중이다.

[0006] 한편, 왕불류행(王不留行)은 장구채(Melandrium firmum Rohrbac)의 열매가 익었을 때의 지상부이다 (Translated by Professors of Herbology in South Korea, Herbology, Seoul, Younglimsa, p 423, 2000). 현재 왕불류행의 항산화에 대한 연구가 이뤄지고 있으나 (Anti-Inflammatory Effects of Melandrii Herba Ethanol Extract via Inhibition of NF- κ B and MAPK Signaling Pathways and Induction of HO-1 in RAW 264.7 Cells and Mouse Primary Macrophages. 2016 Jun 22;21(6)), 이의 골대사 치료효과에 대해서는 개시되거나 고시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 골 손실 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 목적은 골 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 아울러, 본 발명의 목적은 골 질환 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 왕불류행 추출물을 유효성분으로 함유하는 골 손실 억제용 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 왕불류행 추출물을 유효성분으로 함유하는 골 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 아울러, 본 발명은 왕불류행 추출물을 함유하는 골 질환 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따르면, 왕불류행 추출물은 세포독성이 없으면서, 파골세포의 분화를 억제하고, 파골세포의 분화 전사인자의 발현을 억제하며, 골 흡수 관련 유전자의 발현을 억제하므로, 이를 골 손실 억제 용도 또는 골 질환 예방 또는 치료 용도로 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 왕불류행 열수 추출물의 세포독성을 확인한 도이다.

도 2는 왕불류행 열수 추출물 처리에 의한 파골세포 분화능을 확인한 도이다.

도 3은 왕불류행 열수 추출물 처리에 의한 파골세포 액틴 고리 형성 억제 효과를 확인한 도이다.

도 4는 왕불류행 열수 추출물 처리에 의한 파골세포의 분화 전사인자인 NFATc1 및 c-Fos의 단백질 발현 억제 효과를 확인한 도이다.

도 5는 왕불류행 열수 추출물 처리에 의한 파골세포 분화 관련 NFATc1, c-Fos 및 TRAP와, 골 흡수 관련 MMP-9, CTK 및 CA2의 유전자 발현 억제 효과를 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 상세히 설명한다. 이하의 설명에 있어, 당업자에게 주지 저명한 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 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다.

[0016] 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.

[0018] 일 측면에서, 본 발명은 왕불류행 추출물을 유효성분으로 함유하는 골 손실 억제용 조성물에 관한 것이다.

[0019] 일 구현예에서, 본 발명의 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 무수 또는 함수알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 글리세린, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 부틸렌글리콜로 이루어진 군에서 선택된 적어도 어느 하나의 추출용매로 추출될 수 있으며, 열수로 추출된 것이 더욱 바람직하다.

[0020] 본 발명에서 사용되는 용어 "추출물(extract)"은 생약을 적절한 침출액으로 짜내고 침출액을 증발시켜 농축한 제제를 의미하는 것으로, 이에 제한되지는 않으나, 추출처리에 의해 얻어지는 추출액, 추출액의 회석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 이들의 조정제물 또는 정제물일 수 있다. 상기 우슬 추출물 또는 왕불류행 추출물은 통상의 기술분야에 공지된 일반적인 추출방법, 분리 및 정제방법을 이용하여 제조할 수 있다. 상기 추출방법으로는, 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게 열탕 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 방법을 사용할 수 있다.

[0021] 본 발명에 있어서, 상기 추출물은 추출용매로 추출하거나 추출용매로 추출하여 제조한 추출물에 분획용매를 가하여 분획함으로써 제조할 수 있다. 상기 추출용매는 이에 제한되지 않으나, 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매 등을 사용할 수 있으며, 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 4의 알코올이나, 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매, 헥산 또는 디크로로메탄의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매를 사용할 수 있다. 또한, 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 열수를 사용할 수

있다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 용매로서 열수를 이용하여 추출한 뒤 동결 건조한 왕불류행 열수 추출물을 제조하였다.

[0022] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 파골세포의 분화 또는 골 흡수를 억제할 수 있다.

[0023] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 왕불류행 열수 추출물을 5 내지 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 포함할 수 있다.

[0024] 일 측면에서, 본 발명은 왕불류행 추출물을 유효성분으로 함유하는 골 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0025] 일 구현예에서, 골 질환은 골다공증, 골 감소증, 골 용해성 전이, 노인성척추후만증 및 파제트병으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 골다공증인 것이 더욱 바람직하다.

[0026] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 파골세포 분화와 관련된 유전자의 발현을 억제할 수 있으며, 파골세포 분화와 관련된 유전자는 NFATc1, c-Fos 및 TRAP으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0027] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 골 흡수와 관련된 유전자의 발현을 억제할 수 있으며, 골 흡수와 관련된 유전자는 MMP-9, CTK 및 CA2(carbonic anhydrase II)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0028] 본 발명에 따른 상기 조성물은 염, 바람직하게는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하며, 상기 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산을 포함한다. 또한 상기 무기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 염산, 브롬산, 황산 및 인산을 포함한다.

[0029] 본 발명의 약학 조성물에는 보조제(adjuvant)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 면역성을 증가시킬 수 있다.

[0030] 본 발명의 용어, "치료"란, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미하며, 본원에서 사용된 상기 치료란 용어는 치료하는 행위를 말한다. 따라서 포유동물에 있어서 골질환의 치료 또는 치료요법은 하기의 하나 이상을 포함할 수 있다:

[0031] (1) 골질환의 성장을 저해함, 즉, 그 발달을 저지시킴;

[0032] (2) 골질환의 확산을 예방함, 즉, 전이를 예방함;

[0033] (3) 골질환을 경감시킴;

[0034] (4) 골질환의 재발을 예방함; 및

[0035] (5) 골질환의 증상을 완화함(palliating)

[0036] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.

[0037] 만약, 수혜동물이 조성물의 투여에 견딜 수 있거나, 조성물의 그 동물에의 투여가 적합한 경우라면, 조성물은 "약학적으로 또는 생리학적으로 허용가능함"을 나타낸다. 투여된 양이 생리학적으로 중요한 경우에는 상기 제제는 "치료학적으로 유효량"으로 투여되었다고 말할 수 있다. 상기 제제의 존재가 수혜 환자의 생리학적으로 검출가능한 변화를 초래한 경우라면 상기 제제는 생리학적으로 의미가 있다.

[0038] 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정된 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어있다.

[0039] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한

양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0040] 본 발명의 조성물은 또한 생물학적 체제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0041] 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.

[0042] 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다.

[0043] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 본 발명에서 사용되는 용어, "투여"란, 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 주사 제형으로 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[0045] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 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 약학적 조성물에 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.

[0046] 본 발명의 약학 조성물은 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화될 수 있다. 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질, 연질 캡슐제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로오스 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로오스, 나트륨 카복시메틸셀룰로오스 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다. 또한, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제제이며, 주사용 제제의 용매로서 물, 링거액, 등장성 생리식염수 또는 현탁액을 들 수 있다. 상기 주사용 제제의 멸균 고정 오일은 용매 또는 현탁 매질로서 사용할 수 있으며 모노-, 디-글리세라이드를 포함하여 어떠한 무자극성 고정오일도 이러한 목적으로 사용될 수 있다. 또한, 상기 주사용 제제는 올레산과 같은 지방산을 사용할 수 있다.

- [0047] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 관절염 또는 골다공증의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0048] 일 측면에서, 본 발명의 왕불류행 추출물을 함유하는 골 질환 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.
- [0049] 일 측면에서, 골 질환은 골다공증, 골 감소증, 골 용해성 전이, 노인성척추후만증 및 파제트병으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 골다공증인 것이 더욱 바람직하다.
- [0050] 본 발명의 조성물을 식품 조성물로 사용하는 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상의 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 상기 조성물은 유효성분 이외에 식품학적으로 허용가능한 식품보조첨가제를 포함할 수 있으며, 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0051] 본 발명에서 사용되는 용어 "식품보조첨가제"란 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 충전제, 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.
- [0052] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능식품이 포함될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어 "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐, 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 통상의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 통상의 기술분야에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 건강기능식품의 제형 또한 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 건강기능식품은 관절염 또는 골다공증 치료제의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.
- [0053] 또한, 본 발명의 조성물이 사용될 수 있는 건강식품의 종류에는 제한이 없다. 아울러 본 발명의 추출물 또는 이의 분획물을 활성성분으로 포함하는 조성물은 당업자의 선택에 따라 건강기능식품에 함유될 수 있는 적절한 기타 보조 성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림 류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 추출물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 조성물은 천연 재료를 원료로 하므로 약학 조성물 또는 식품 조성물로 사용할 경우에도 일반적인 합성 화합물에 비하여 부작용이 덜할 수 있으므로, 안전하게 약학 조성물 및 건강기능식품에 포함되어 유용하게 사용될 수 있다.
- [0056] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.
- [0058] **실시예 1. 왕불류행 추출물 제조**
- [0059] 왕불류행(王不留行, Melandrii Herba) (옴미허브, 한국) 150g을 증류수 1500mL에 첨가하여 2시간 동안 열수 추출하였다. 열수 추출물을 여과지(Whatman, No 2)를 사용하여 여과하고, 동결건조하여 분말화하였다. 건조된 왕불류행 열수 추출물(water extract of Melandryum firmum Rohrbach, MFR)은 19g이었으며, 수득율은 12.7%였다. 분말화한 MFR을 사용하기 전까지 냉장보관 하였다.

[0061] **실시예 2. 세포 독성 확인**

[0062] RAW 264.7 세포를 100 μ l 디쉬에서 10% FBS 및 1% P/S가 혼합된 DMEM 배지를 사용하여 배양하였다. 세포 배양은 37°C에서 95%의 습도로 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. RAW 264.7 세포 5000개를 96-웰 플레이트에 분주하고 24시간 동안 배양하고, 배지를 제거하고 새 배지를 첨가하면서, 상기 실시예 1에서 제조한 MFR 분말을 멸균 필터 (포어 사이즈 0.22 μ m)로 여과하여 새 배지에 12.5, 25, 50 또는 100 μ g/ml 농도로 첨가한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 그 후, MTS 분석 용액을 처리한 뒤 ELISA 기기로 490nm에서 흡광도를 측정함으로써 세포 생존율을 확인하고, 아무것도 처리하지 않은 대조군에 대한 백분율로 세포독성을 표기하였다.

[0063] 그 결과, 왕불류행 열수 추출물은 모든 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다 (도 1).

[0065] **실시예 3. 파골세포 분화 억제능 확인**

[0066] 상기 실시예에서와 같이 RAW 264.7 세포 5000개를 96-웰 플레이트에 분주하고 24시간 후에 RANKL (100 ng/ml) 과 MFR 12.5, 25, 50 또는 100 μ g/ml를 첨가한 배지로 교환하여 5일 동안 배양하였다. 그 후, 분화된 파골세포는 TRAP (tartrateresistant acid phosphatase) kit를 사용하여 염색하였다. 그 후, 4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate (sigma aldrich, MO, USA) 4.93 mg, 0.5 M acetate 850 μ L 및 tartrate acid solution 150 μ L를 섞어 만든 시약과 배양한 배지 50 μ L를 넣고, 60분 동안 37°C에서 반응시켰다. 이 후 0.5M NaOH를 50 μ L 처리하여 반응을 종료시킨 후 ELISA 기기로 405nm에서의 흡광도를 측정하였다. 현미경을 사용하여 관찰하고, 핵이 3개 이상인 세포를 다핵의 파골세포로 계수하였다. 여기서, 세포에 RANKL을 처리하지 않은 세포를 정상군으로 확인하였다.

[0067] 그 결과, 대조군(RANKL만 처리한 군)은 정상군에 비해 다핵의 파골세포가 관찰되었고, MFR을 처리한 실험군에서는 농도에 의존적으로 파골세포가 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (도 2). 또한, TRAP 효소 활성(TRAP activity)을 측정한 결과, 대조군은 정상군에 비해 TRAP 효소 활성이 증가한 반면, MFR을 처리한 군에서는 농도에 의존적으로 TRAP 효소 활성이 감소하는 것으로 나타났다 (도 2).

[0069] **실시예 4. 파골세포 액틴 고리 억제 효과 확인**

[0070] 상기 실시예에서와 같이 RAW 264.7 세포 5000개를 96-웰 플레이트에 분주하고 24시간 후에 RANKL (100 ng/ml) 과 MFR 12.5, 25, 50 또는 100 μ g/ml를 첨가한 배지로 교환하여 5일 동안 배양하였다. 그 후, 동일한 배지로 2일마다 교환하여 성숙한 파골세포를 형성할 때까지 배양한 뒤 배지를 제거하고 4% 포름알데하이드로 고정된 뒤 0.1% 트리톤 X-100 (in PBS)를 1분 동안 처리하여 세포의 투과성을 높였다. 그 후, Acti-stainTM488 Fluorescent Phalloidin으로 F-액틴 고리를 염색한 뒤 면역현광현미경을 사용하여 관찰하였다.

[0071] 그 결과, 대조군 (RANKL 처리군)은 정상군 (RANKL 무처리군)에 비해 성숙한 액틴 고리가 형성된 반면, MFR을 처리한 실험군에서는 정상적인 액틴고리 형성이 이루어지지 않는 것으로 나타났다 (도 3).

[0073] **실시예 5. 파골세포 분화 전사인자 발현 억제 효과 확인**

[0074] 상기 실시예에서와 같이 RAW 264.7 세포를 60 π 디쉬에 분주하고 24시간 뒤, RANKL (100 ng/ml)과 MFR 12.5, 25, 50 또는 100 μ g/ml를 처리하고 1일 동안 배양하였다. 그 후, 프로테아제 억제제 및 포스파테이즈 억제제가 들어있는 RIPA 버퍼 (1 M Tris (pH 7.4), 3 M NaCl, NP-40, 10% Nadeoxycholate 및 10% SDS)로 세포에서 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 정량하여 10% polyacrylamide/SDS 겔에서 전기영동한 뒤, nitrocellulose transfer 멤브레인에 트랜스퍼하였다. 그 후 멤브레인을 TBST(0.05% Tween-20 in Tris-buffered saline, pH 7.4)에 녹인 5% 스킵밀크로 블로킹하고 항-NFATc1 항체 및 항-c-Fos 항체로 반응시켰다. 그 뒤, 2차 항체로 반응시키고 ECL 용액 (Santacruz, California USA)으로 발색시켜, X-ray 필름에 현상하였다.

[0075] 그 결과, NFATc1 단백질의 경우 대조군이 정상군에 비해 단백질 발현이 증가하였으나, MFR을 처리한 군에서는 MFR 농도 의존적으로 NFATc1 발현이 감소하였다 (도 4). 또한, c-Fos 단백질의 경우에도 정상군에 비해 대조군의 발현이 증가하였으나, MFR을 처리한 군에서는 MFR 농도 의존적으로 발현이 감소하는 것으로 나타났다 (도 4). 이를 Actin을 통해 정량하였을 때도 MFR을 처리한 실험군의 NFATc1/c-Fos 발현이 모든 농도에서 유의한 정

도로 억제되는 것으로 나타났다 ($p<0.05$ 및 $p<0.01$).

실시예 6. 파골세포 분화 및 골흡수 관련 유전자 발현 확인

상기 실시예에서와 같이 RAW 264.7 세포를 6-웰 플레이트에 분주한 후 24시간 뒤에, RANKL 100 ng/ml과 MFR 12.5, 25, 50 또는 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 함께 처리한 뒤에 4일 동안 배양하였다. 배양된 세포에 Trizol 용액 (Invitrogen, USA)을 처리하여 전체 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 2 μg 으로 정량한 뒤, 역전사효소 (reverse transcriptase)를 사용하여 cDNA(complementary DNA)로 합성하였다. 합성된 cDNA, Taq 폴리머레이즈 (polymerase) 및 하기 표 1의 프라이머들을 사용하여 real-time PCR을 수행하였다. 이 후, 결과물을 1.2% 아가로스 젤에서 전기영동하여 SYBR 그린으로 염색하였다. 발현 분석은 GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)를 이용하여 mRNA 농도를 표준화하였고, Image J software (Ver. 1.46, National Institutes of Health)를 사용하여 각 밴드의 밀도(band density)를 분석하였다.

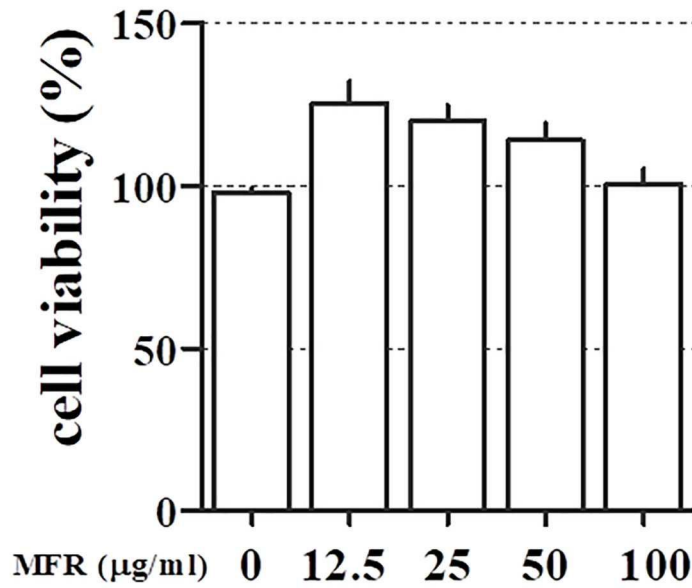
표 1

구분	Sequence	
NFATc1	Forward	5'-TGC TCC TCC TCC TGC TGC TC-3'
	Reverse	5'-CGT CTT CCA CCT CCA CGT CG-3'
c-Fos	Forward	5'-ATG GGC TCT CCT GTC AAC AC-3'
	Reverse	5'-GGC TGC CAA AAT AAA CTC CA-3'
TRAP	Forward	5'-ACT TCC CCA GCC CTT ACT ACC G-3'
	Reverse	5'-TCA GCA CAT AGC CCA CAC CG-3'
MMP-9	Forward	5'-CGA CTT TTG TGG TCT TCC CC-3'
	Reverse	5'-TGA AGG TTT GGA ATC GAC CC-3'
CTK	Forward	5'-AGG CGG CTA TAT GAC CAC TG-3'
	Reverse	5'-CCG AGC CAA GAG AGC ATA TC-3'
CAII	Forward	5'-CTC TCA GGA CAA TGC AGT GCT GA-3'
	Reverse	5'-ATC CAG GTC ACA CAT TCC AGC-3'
Actin	Forward	5'-TTC TAC AAT GAG CTG CGT GT-3'
	Reverse	5'-CTC ATA GCT CTT CTC CAG GG-3'

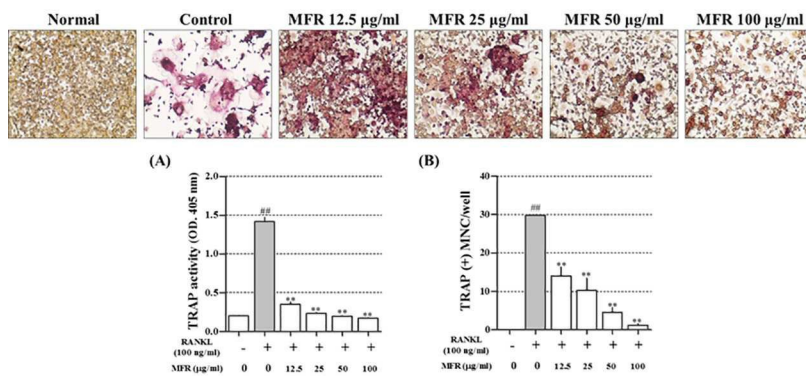
MFR이 파골세포 분화의 주된 기전의 지표인 NFATc1, c-Fos 및 TRAP과 골 흡수 관련 기전의 지표인 MMP-9, CTK 및 CA2의 mRNA 발현에 미치는 영향을 분석한 결과, 대조군에서는 NFATc1, c-Fos, TRAP, MMP-9, CTK 및 CA2의 mRNA 발현이 정상군에 비해 유의하게 증가한 반면, MFR 처리군에서는 NFATc1, c-Fos, TRAP, MMP-9, CTK 및 CA2가 MFR의 농도에 의존적으로 유의하게 발현이 억제되는 것으로 나타났다 ($p<0.05$, $p<0.01$) (도 5).

도면

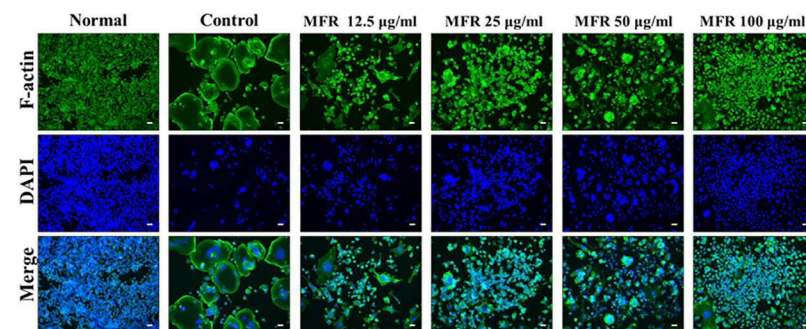
도면1



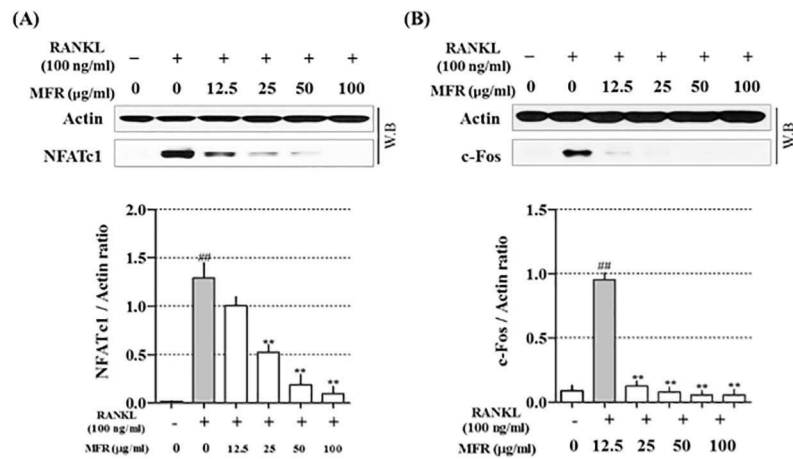
도면2



도면3



도면4



도면5

