(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년12월09일
(11) 등록번호 10-2338415
(24) 등록일자 2021년12월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/215 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61P 19/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/215 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2021-0054747
(22) 출원일자 2021년04월28일
심사청구일자 2021년04월28일
(56) 선행기술조사문헌
US20160228394 A1*
Pharmaceutical Biology, 54(12), 2864-2870, 2016.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
조선대학교 산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
김춘성
광주광역시 남구 서문대로678번길 7(진월동, 대주아파트)
(74) 대리인
특허법인리채

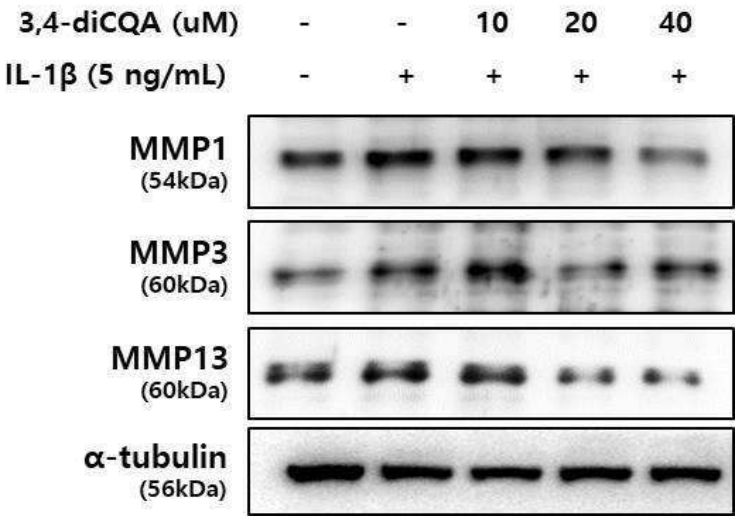
전체 청구항 수 : 총 2 항 심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 **3,4-디카페오일퀴닉산을 포함하는 골관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 골관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로 보다 상세하게는 3,4-다이카페오일퀴닉산(dicaffeoylquinic acid, diCQA) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함함으로써 연골 세포에서 염증 매개체 및 기질 분해 효소 억제 효과가 있어 골관절염의 예방, 치료 또는 개선에 도움을 줄 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61P 19/02 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/306 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525011797
과제번호	202106562
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	빅데이터 기반 해양 바이러스 제어 및 마린바이오틱스 개발
연구과제명	해조류 기반 바이오 헬스케어 유효성 소재 실증 지원
기 여 율	1/1
과제수행기관명	조선대학교 산학협력단
연구기간	2021.04.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

3,4-다이카페오일퀴닉산(dicaffeoylquinic acid, diCQA) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 시험관 내(in vitro)에서 MMP-1, MMP-3, MMP-13 및 ADAMTS4로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 연골 기질 분해 효소의 발현 억제용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 연골 기질 분해 효소는 MMP-1, MMP-3, MMP-13 및 ADAMTS4인, 발현 억제용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 골관절염의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 관절염은 관절에 염증 및 통증이 발생되어 생기는 질환으로서, 퇴행성 관절염(osteoarthristis), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 통풍, 건성 관절염이 있으며, 관절염 환자의 95%가 퇴행성 관절염을 앓고 있다. 퇴행성 관절염(degenerative arthritis)은 관절 연골이 닳아 없어지면서 국소적인 퇴행성 변화가 나타나는 질환으로서, 골관절염(osteoarthritis)이라고도 한다. 퇴행성 관절염은 노령화와 밀접한 연관을 갖는 대표적인 퇴행성 질환으로, 전 인구의 10~15% 정도가 앓고 있으며, 특히 65세 이상의 고령 인구 중 60~80% 정도가 퇴행성 관절염을 앓고 있다.

[0004] 골관절염의 원인은 노화 현상이나 과다한 체중과 관계가 깊으며, 나이가 많아질수록 여성에서 많이 발병되고 있다. 초기 증상은 한 개 또는 두 개의 관절이 강직과 함께 쑤시는 듯한 동반 통증이 나타나며, 장기화되면 관절 주변에 골의 과잉 형성 및 관절의 변형 등을 초래하게 된다. 골관절염이 유발되는 기전으로는 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)의 생성이 증가하고 콜라게네이즈(collagenase), 스트로멜라이신(stromelysin) 등과 같은 MMPs의 분비가 증가되어 관절연골 기질의 손상을 유발한다.

[0005] 현재 임상적으로 사용되고 있는 골관절염의 치료로는, 진통제, 스테로이드제, 비스테로이드계 항염증제 등과 같은 약물 치료제나 히알루론산, 글루코사민, 콘드로이틴 등의 연골 보호제를 이용하거나, 관절경 수술, 경골 근위부 절골술, 관절부분 치환술, 슬관절 전치환술 등의 외과적 치료에 의한다. 그러나 약물 치료제의 경우는 통증이나 염증 반응 자체를 비특이적으로 완화시키는 효과만을 가지고 있으며, 연골 보호제는 단지 연골 세포에 영양을 공급해 주거나 충격을 완화시킴으로써 관절을 보호해 주는 역할을 할 뿐이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1896020호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 골관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 골관절염 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 1. 3,4-다이카페오일퀴닉산(dicaffeoylquinic acid, diCQA) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 골관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0012] 2. 3,4-다이카페오일퀴닉산(dicaffeoylquinic acid, diCQA) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 골관절염 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 약학적 조성물 및 식품 조성물은 연골 세포에서 염증 매개체 및 기질 분해 효소 억제 효과가 있어 골관절염의 예방, 치료 또는 개선에 도움을 줄 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 3,4-dicaffeoylquinic acid(3,4-diCQA)의 백서 초대 연골 세포의 생존력에 대한 효과를 나타낸 것이다.

도 2는 3,4-diCQA의 백서 초대 연골 세포에서 IL-1β에 증가된 아질산염(nitrite)의 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 3 및 도 4는 3,4-diCQA의 백서 초대 연골 세포에서 IL-1β에 증가된 iNOS, COX-2 및 TNF-α 억제 효과를 웨스턴 블롯 분석(도 3) 또는 RT-PCR(도 4)을 통해 나타낸 것이다.

도 5는 3,4-diCQA의 백서 초대 연골 세포에서 IL-1β에 증가된 MMP-1, MMP-3 및 MMP-13 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 6은 3,4-diCQA의 백서 초대 연골 세포에서 IL-1β에 증가된 ADAMTS4 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 7은 3,4-diCQA의 백서 초대 연골 세포에서 IL-1β에 증가된 아그레칸(aggrecan) 분해 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 8은 3,4-diCQA의 백서 초대 연골 세포에서 IL-1β에 증가된 MMP의 활성 억제 효과를 나타낸 것이다.

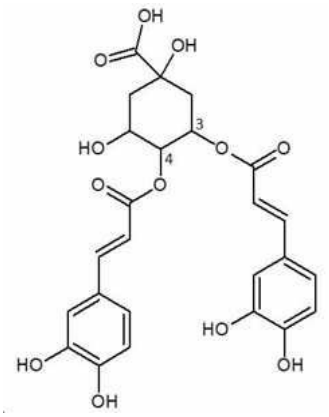
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 설명한다.

[0019] 본 발명은 골관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0020] 약학 조성물은 3,4-다이카페오일퀴닉산(dicaffeoylquinic acid, diCQA) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함한다.

[0021] 3,4-다이카페오일퀴닉산은 하기 식을 갖는 화합물일 수 있다.



[0022]

[0023] 본 발명의 조성물은 연골 세포에서 염증 매개체 및 기질 분해 효소를 억제하여 우수한 골관절염의 예방 또는 치

료 효과가 있다.

[0024] 염증 매개체란 혈관 또는 세포에 작용하여 순차적 염증 반응을 촉진하는 메신저로, 예를 들면 사이토카인(cytokine), 케모카인(chemokine), 산화질소(nitric oxide), 산소자유기(oxygen free radicals), 단백질, 펩티드, 당단백질, 프로스타글란딘 및 류코트리엔을 포함하는 아라키돈산 대사산물(arachidonic acid metabolites) 등일 수 있고, 구체적으로 아질산염(nitrite), iNOS, COX-2, TNF-α, L-1β, IL-6, IL-15, IL-8, GRO-α 등일 수 있다.

[0025] 연골 기질 분해 효소란 연골 세포를 둘러싸고 있는 세포외기질(예컨대, 아그레칸(aggrecan), 제2형 콜라겐(type Ⅱ collagen))을 직접적으로 분해함으로써 연골 조직의 점진적 퇴행을 유도하는 효소로, 예를 들면 MMPs 및 아그레카나제(aggrecanase)인 ADAMTS 등일 수 있다.

[0026] 관절염은 관절에 염증 또는 통증이 발생되어 생기는 질환으로, 골관절염(osteoarthristis), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 통풍, 건성 관절염이 있으며, 각 관절염마다 발생 원인 또는 치료 방법이 상이하다. 골관절염은 퇴행성 관절염(degenerative arthritis)이라고도 하며, 관절 연골이 닳아 없어지면서 국소적인 퇴행성 변화가 나타나는 질환이다. 골관절염은 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)의 생성이 증가하거나, 콜라게네이즈(collagenase), 스트로멜라이신(stromelysin) 등의 MMPs나 아그레카나제(aggrecanase)의 분비가 증가함으로써 관절 연골 기질이 손상되어 유발될 수 있다.

[0027] 용어 "약학적으로 허용 가능한"은 화합물 또는 조성물이 투여되는 개체, 세포, 조직 등에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는 특성을 나타내는 것을 의미한다.

[0028] 용어 "약학적으로 허용 가능한 염"은, 본 발명에 따른 특정 화합물과 비교적 무독성인 산 또는 염기를 이용해서 조제되는 염을 의미한다. 약학적으로 허용 가능한 염은 예를 들어 산 부가염 또는 금속염일 수 있다.

[0029] 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 형성될 수 있다. 이러한 약학적으로 무독한 염은 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴- 1,4-디오에이트, 핵산-1, 6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 를투엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β_하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함할 수 있다. 예를 들어, 산 부가염은 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 염을 수화성 유기 용매, 예컨대 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜 수득할 수 있다.

[0030] 금속염은 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염일 수 있다. 금속염은 염기를 사용하여 제조할 수 있으며, 예를 들어, 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고 여액을 증발 및/또는 건조시켜 수득할 수 있다.

[0031] 용어 "예방"은 전체 예방 뿐만 아니라 병태의 발병 또는 재발병의 가능성의 경미한, 실질적인 또는 큰 감소를 포함하여 예방될 병태 또는 재발생 또는 재발하는 병태의 발병 가능성의 임의의 정도의 감소를 초래하는 예방적 조치를 지칭하고, 가능성 감소의 정도는 적어도 경미한 감소이다.

[0032] 용어 "치료"는 치유뿐만 아니라 경미한 완화, 실질적인 완화, 주요 완화를 포함하는 임의의 정도의 완화를 포함하여 치료될 병태를 앓고 있는 대상체 또는 환자에게 유리한 효과를 초래하는 처치를 지칭하고, 완화 정도는 적어도 경미한 완화이다.

[0033] 본 발명의 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 조성물에 함유될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오즈, 덱스트로즈, 수크로스, 덱스트린, 말토덱스트

린, 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 있으나, 이에 제한되지 않는다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면 활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제되나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며 이에 제한되지는 않으나, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.

[0036] 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 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0037] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서, "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. 본 발명의 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. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0038] 본 발명의 약학적 조성물에서 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg당 1 내지 6000 ㎎, 바람직하게는 60 내지 600 ㎎을 1회 또는 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0040] 본 발명은 골관절염 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0041] 식품 조성물은 3,4-다이카페오일퀴닉산(dicaffeoylquinic acid, diCQA) 또는 이의 식품학적으로 허용되는 염을 포함한다.

[0042] 본 발명의 조성물은 연골 세포에서 염증 매개체 및 기질 분해 효소를 억제하여 우수한 골관절염의 예방 또는 개선 효과가 있다.

[0043] 3,4-다이카페오일퀴닉산, 염증 매개체, 기질 분해 효소, 골관절염, 용어 “예방” 및 “치료”는 전술한 범위 내의 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044] 용어 “개선”은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0045] 용어 "식품학적으로 허용 가능한"은 화합물 또는 조성물이 투여되는 개체, 세포, 조직 등에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는 특성을 나타내는 것을 의미한다.

[0046] 용어 "식품학적으로 허용 가능한 염"은, 본 발명에 따른 특정 화합물과 비교적 무독성인 산 또는 염기를 이용해서 조제되는 염을 의미하며, 식품학적으로 허용 가능한 염은 예를 들어 산 부가염 또는 금속염일 수 있고, 산 부가염 및 금속염은 전술한 범위 내의 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 본 발명의 식품 조성물은 골관절염 예방 또는 개선을 목적으로, 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

[0048] 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격

및 기준에 의하여 판정한다.

[0049] 식품 첨가물 공전에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0050] 예를 들어, 정제 형태의 식품 조성물은 상기 조성물을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 식품 조성물은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.

[0051] 캅셀 형태의 식품 조성물 중 경질 캅셀제는 통상의 경질 캅셀에 상기 조성물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충진하여 제조할 수 있으며, 연질 캅셀제는 상기 조성물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캅셀기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캅셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0052] 환 형태의 식품 조성물은 상기 조성물과 부형제, 결합제, 붕해제 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.

[0053] 과립 형태의 식품 조성물은 상기 조성물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0054] 식품 조성물은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류. 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.

[0055] 식품 조성물은 영양제의 용도로 경구 적용될 수 있으며, 적용 형태는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들면 경구 투여되는 경우, 하루 섭취량은 5000mg 이하인 것이 바람직하고, 하루 섭취량이 2000mg 이하인 것이 보다 바람직하며, 하루 섭취량이 500 내지 1500mg, 또는 650mg인 것이 가장 바람직하다. 캡슐제 또는 정제로 제제화하는 경우, 1일 1회 1정을 물과 함께 투여할 수 있다.

[0057] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0059] **실시예**

[0060] **방법**

[0061] 1. 시약

[0062] 3,4-dicaffeoylquinic acid (catalog No. PHL80425), Sulfanilamide, N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride, phosphoric acid 및 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. IL-1β(Interleukin-1β)는 ProSpec-Protein Specialists (Rehovot, Israel)에서 구입했다. Dulbecco's modified Eagle's medium/nutrient mixture F-12 (DMEM/F12) 및 penicillin-streptomycin solution은 WELGENE (Daegu, Republic of Korea)에서 구입했다. 소 태아 혈청(FBS, Fetal bovine serum)은 iNtRON Biotechnology (Gyeonggido, Republic of Korea)에서 구입했다. Collagenase type II는 Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, NJ, USA)에서 구입했다. 1차 및 2차 항체는 anti-α-tubulin (ThermoFisher Scientific, Seoul, Republic of Korea) 및 anti-inducible NO synthase (iNOS) (Abcam, Cambridge, MA, USA)를 제외하고 모두 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입했다. 사용된 모든 항체의 킬로 달톤(kDa)은 다음과 같다; iNOS (130-140 kDa), COX-2 (74 kDa), TNF-α (17 kDa), MMP1 (54 kDa), MMP3 (60 kDa), MMP13 (60 kDa), Adamts-4 (90 kDa) 및 α-tubulin(56 kDa).

[0063] 2. 초대 연골 세포 분리 및 배양

[0064] 멸균 조건 하에서, 생후 5일된 Sprague-Dawley 백서의 해부된 무릎 연골을 DMEM/F12에 용해된 0.3% (w/v) collagenase type II로 효소적으로 소화시키고(enzymatically digested), 부드럽게 교반하면서 37℃에서 45분 동안 두 번 반복했다. 그 후 다시 한번 연골을 0.3% (w/v) collagenase type II로 37℃에서 5시간 동안 부드럽게 저어주면서 소화시켰다. 효소 소화 반응 후에도 소화되지 않은 세포와 잔해를 세포 스트레이너(0.45 μm)로 여과 한 후 연골 세포를 분리하였다. 연골 세포는 10% FBS 및 항생제(100 U/mL 페니실린 및 100 mg/mL 스트렙토마이신)를 포함하는 DMEM/F12에서 37℃에서 5 % CO_2로 배양했다. 실험동물 사육 및 시술의 모든 방법은 조선대

학교 동물실험윤리위원회(CIACUC2018-S0046)의 승인을 받았다.

[0065] 3. 세포 생존율 분석

[0066] 세포 생존율 분석을 위해, 분리된 백서의 초대 연골 세포를 $1x10^6$ cells/mL로 12-웰 배양 플레이트에 접종하고 3일 동안 배양했다. 그런 다음 다양한 농도의 3,4-diCQA(0, 5, 10, 20, 40 및 80 uM)로 24시간 동안 처리한 후, MTT 용액(5 mg/mL)을 각 웰(100 μL/웰)에 첨가하고 37℃에서 4시간 동안 추가 배양하였다. 이 후, MTT 용액이 포함된 세포 배양 배지를 제거한 후 DMSO를 각 웰당 1 mL씩 첨가하고 마이크로 플레이트 리더(Epoch BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 사용하여 590nm에서 흡광도를 측정했다.

[0067] 4. Reactive Nitrogen Species (RNS) 측정

[0068] 백서 초대 연골 세포는 12-웰 배양 플레이트에 1×10^6 cells/mL로 접종한 후, 18시간 동안 배양하였다. 18시간 배양한 후, 3,4-diCQA(0, 5, 10, 20, 40 및 80 uM)를 처리하고 1시간 뒤 IL-1β (5 ng/mL) 처리하여 24시간 배양하였다. Nitrite oxide (NO) 생성은 Griess 시약을 사용하여 NO의 안정한 산화 생성물인 아질산염(NO_2^-)의 축적을 측정하여 나타내었다. 간략히 말하면, 100 μl의 세포 배양 배지를 100 μl의 Griess 시약(1% (w/v) sulfanilamide 및 0.1% (w/v) naphthylethylenediamine in 5% (v/v) phosphoric acid)와 혼합하고, 실온에서 5분 동안 반응한 뒤, 흡광도 540nm에서 측정하였다. 모든 실험에서 신선한 배양 배지를 블랭크로 사용했다. 아질산 나트륨 표준 곡선을 기반으로 아질산염을 정량화했다.

[0069] 5. 총 RNA 분리 및 역전사 중합 효소 연쇄 반응(RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction)

[0070] 총 RNA는 Trizol 시약 (GeneAll, Seoul, Korea)을 사용하여 분리하였으며, 총 RNA (1μg)는 MMLV-transcriptase (Enzynomics, Daejeon, Republic of Korea)를 사용하여 역전사반응 뒤 nTaq DNA Polymerase를 이용하여 cDNA를 합성하였으며, 특정 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 아가로스 겔 전기 영동(agarose gel electrophoresis)을 거쳤다. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)를 정규화를 위한 내부 대조군으로 사용하였다. 프라이머 서열은 표 1에 나와있다.

[0071] [표 1]

[0072]

유전자 이름	프라이머 서열		서열 번호
rat iNOS (211 bp)	sense	5′-GCATCGGCAGGATTCAGTGG-3′	1
	antisense	5′-TAGCCAGCGTACCGGATGAG-3′	2
rat COX-2 (576 bp)	sense	5′-ACCATCTGGCTTCGGGAGCACAA-3′	3
	antisense	5′-GAGGGCTTTCAACTCTGCAGCCA-3′	4
rat TNF-α (379 bp)	sense	5′-CCACGTCGTAGCAAACCACCAAGC-3′	5
	antisense	5′-GTACTTGGGCAGGTTGACCTCAGC-3′	6
rat GAPDH (578 bp)	sense	5′-TGGTGCTGAGTATGTCGTGGAGTC-3′	7
	antisense	5′-AGACAACCTGGTCCTCAGTGTAGC-3′	8

[0073] 6. 웨스턴 블롯(western blot) 분석

[0074] 백서 초대 연골 세포를 3,4-diCQA로 1시간 동안 전처리하고 IL-1β5 ng/mL)로 24시간 동안 자극하였다. 전체 세포 내 단백질을 추출하기 위해 PRO-PREP 단백질 추출 용액 (iNtRON Biotechnology, Republic of Korea)을 이용하여 얼음에서 30분 동안 반응한 뒤 4℃에서 15분 동안 15,000 x g에서 원심 분리한 후 총 세포 내 단백질을 얻었다. 단백질 농도는 BCA (bicinchoninic acid) 단백질 분석법 (Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 정량화하였다. 동량의 단백질(20 μg)을 8%, 10% 또는 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)에 로딩한 후 polyvinylidene difluoride membrane (PVDF membrane)으로 옮겼다. 트랜스 블롯된 막을 5% BSA (bovine serum albumin)가 함유된 TBST (0.1% Tween-20 + TBS)로 30분 동안 Blocking 과정을 수행하였다. 그 후, 막을 특정 1차 항체(1:1000, except α-tubulin; 1:5000)와 함께 4℃에서 밤새 반응한 다음, 상온에서 horseradish peroxidase(HRP)-접합된 2차 항체(1:2500)로 1시간 동안 반응하였다. 단백질 밴드는 enhanced chemiluminescence(ECL) kit(Millipore, Bedford, MA, USA)를 사용하여 MicroChemi 4.2 imager(DNR Bioimaging Systems, Jerusalem, Israel)로 검출 및 시각화하였다.

[0075] 7. 젤라틴 자이모그래피(Gelatin zymography)

[0076] 백서 초대 연골 세포에 3,4-diCQA로 1시간 동안 전처리 한 후 IL-1β(5 ng/mL)로 24시간 동안 배양하였다. 24시간 동안 배양한 후 각 샘플의 상층액 30 ul와 non-reducing buffer를 혼합하여 10 mg/mL의 젤라틴이 함유된 8% SDS-PAGE 젤에 전기영동하였다. 전기영동 후 2.5% (v/v) triton X-100 용액에 담가 교반하면서 30분간 반응한 뒤, zymography renaturing buffer에 담가 37℃에서 48시간 정체 반응하였다. 그 후, 0.1% (w/v) 쿠마시블루 염색을 20분간 수행한 뒤 destain 버퍼로 염색되지 않는 부분을 세척하고 하얗게 기질 분해가 일어난 곳을 사진 촬영하였다.

[0077] 8. 통계 분석

[0078] 모든 데이터는 최소한 세 번의 독립적인 실험으로부터 얻었다. 결과는 평균 ± 표준 편차 (SD)로 표현하였다. ANOVA(a one-way analysis of variance) 및 Dunnett's test를 GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., CA, USA)을 사용한 다중 비교에 사용하였다. p value < 0.05부터 유의성을 나타내는 것으로 간주하였다.

[0080] **결과**

[0081] 1. 백서 초대 연골 세포에서 3,4-dicaffeoylquinic acid(3,4-diCQA)의 세포독성 분석

[0082] 3,4-diCQA의 세포 독성을 평가하기 위해 연골 세포에 다양한 농도의 3,4-diCQA(0, 5, 10, 20, 40 및 80 uM로 처리하고 24시간 후에 MTT 분석을 수행하였다. 도 1에 나타난 바와 같이 대조군과 비교하여 3,4-diCQA 처리는 최대 80 uM 처리까지 세포 독성이 없었다.

[0083] 2. 백서 초대 연골 세포에서 IL-1β에 의한 아질산염(nitrite), iNOS, COX-2 및 TNF-α에 대한 3,4-diCQA의 억제 효과

[0084] 아질산염, iNOS, COX-2 및 TNF-α와 같은 염증 매개체들에 의한 염증은 골관절염 다인자원인(multi-factor etiology)의 주요 요인 중 하나이다. 따라서, 본 발명자들은 백서 초대 연골 세포에서 IL-1β에 의해 유도된 아질산염, iNOS, COX-2, TNF-α와 같은 염증 매개체의 발현에 대한 3,4-diCQA의 효과를 RT-PCR 및 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 평가하였다.

[0085] IL-1β로 자극된 연골 세포는 자극되지 않은 연골 세포에 비해 아질산염, iNOS, COX-2 및 TNF-α의 발현이 크게 증가하였으나 3,4-diCQA로 전처리된 연골 세포는 IL-1β에 의한 아질산염, iNOS, COX-2 및 TNF-α 발현을 용량 의존적으로 억제하였다(도 2 내지 도 4). 이러한 결과는 3,4-diCQA가 백서 초대 연골 세포에서 IL-1β로 유도된 염증 반응에 강력한 항염증 효과가 있음을 시사한다.

[0086] 3. 3,4-diCQA의 백서 초대 연골 세포에서 IL-1β 유도 MMP-1, MMP-3, MMP-13, ADAMTS4 억제 효과

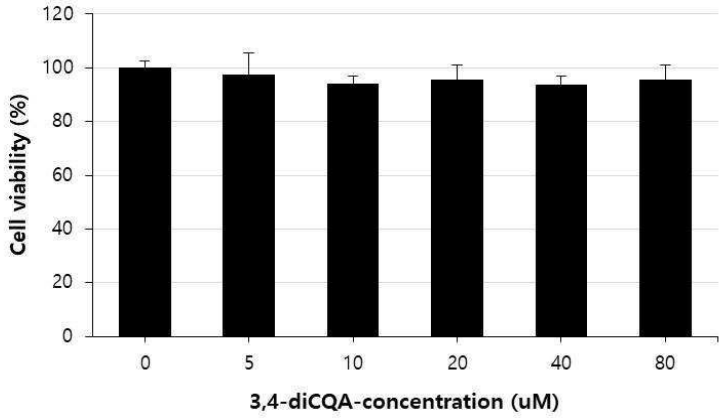
[0087] MMPs 및 아그레카나제(aggrecanase)인 ADAMTS4와 같은 기질 분해 효소의 활성화에 의한 연골 기질 분해는 골관절염의 대표적인 특징이다. 따라서 본 발명자들은 백서 초대 연골 세포에서 IL-1β로 유도된 MMP-1, MMP-3, MMP-13 및 ADAMTS4의 발현에 대한 3,4-diCQA의 효과를 확인하였다.

[0088] 본 발명자들은 대조군에 비해 IL-1β가 자극된 연골 세포에서 MMP-1, MMP-3, MMP-13 및 ADAMTS4의 단백 발현이 증가했지만, 3,4-diCQA로 전처리된 연골 세포에서 그 활성이 유의하게 억제되었음을 관찰하였다(도 5 및 도 6). 그리고 대조군에 비해 IL-1β가 자극된 연골 세포에서 연골 기질인 아그레칸(aggrecan) 단백질 수준이 감소하였지만, 3,4-diCQA로 전처리된 연골 세포에서 그 감소가 차단되었음을 관찰하였다(도 7).

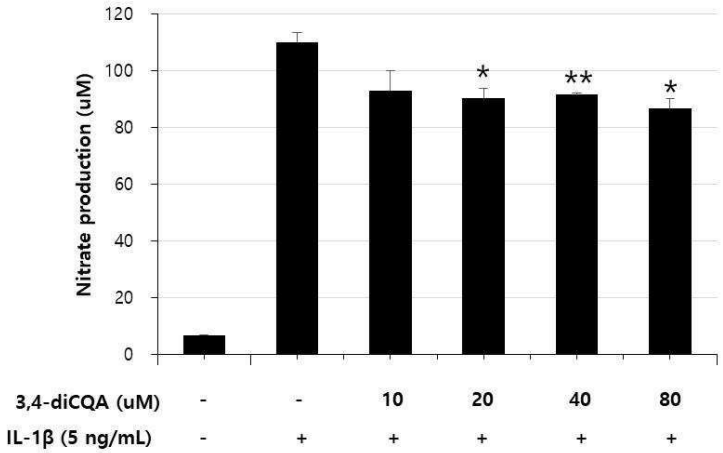
[0089] 또한, MMP-1, MMP-3 및 MMP-13 활성을 분석하기 위해 수행된 젤라틴 자이모그래피를 통해, IL-1β 처리에 의해 이들 효소의 분비 및 이들의 젤라틴 분해 활성이 유의하게 증가되지만, 3,4-diCQA 전처리에 의해 용량 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다(도 8). 이는 3,4-diCQA가 IL-1β로 유도된 기질 분해 효소의 발현을 감소시켰음을 시사한다.

도면

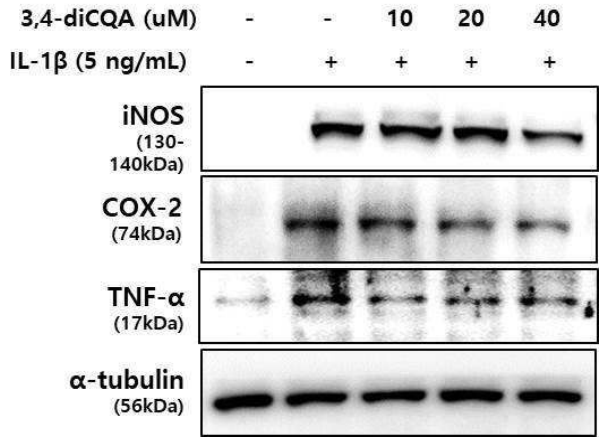
도면1



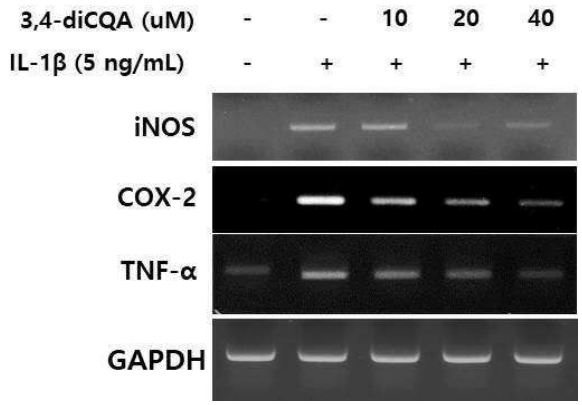
도면2



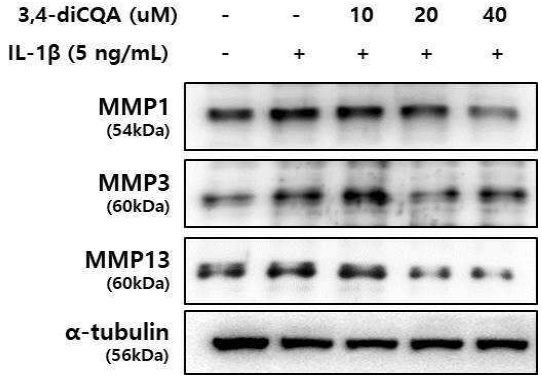
도면3



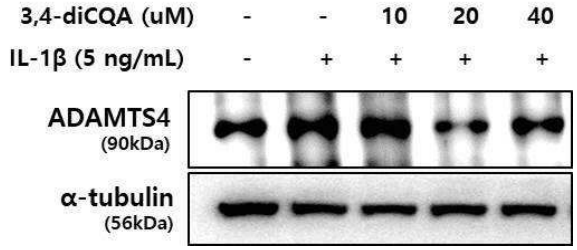
도면4



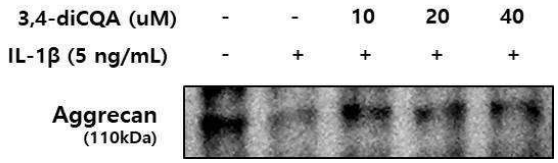
도면5



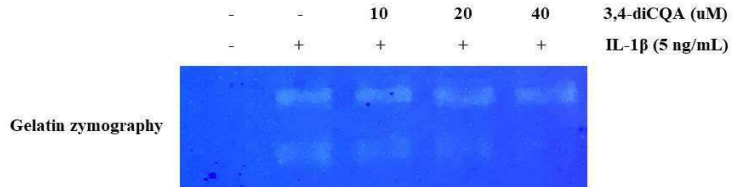
도면6



도면7



도면8



서 열 목 록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University

<120> Pharmaceutical composition for preventing or treating osteoarthritis comprising 3,4-dicaffeoylquinic acid

<130> 21P02028

<160> 8

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

gcatcggcag gattcagtgg 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

tagccagcgt accggatgag 20

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

accatctggc ttcgggagca caa 23

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

gagggctttc aactctgcag cca 23

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

ccacgtcgta gcaaaccacc aagc 24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

gtacttgggc aggttgacct cagc 24

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

tggtgctgag tatgtcgtgg agtc 24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

agacaacctg gtcctcagtg tagc 24