(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0038072
(43) 공개일자 2021년04월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/00 (2016.01) *A01G 22/25* (2018.01)
A01H 4/00 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A23L 5/20 (2016.01) *A61K 36/704* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/40 (2016.08)
A01G 22/25 (2018.02)
(21) 출원번호 10-2019-0120751
(22) 출원일자 2019년09월30일
심사청구일자 2019년09월30일

(71) 출원인
한국 한의학 연구원
대전광역시 유성구 유성대로 1672 (전민동)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
강영민
대전광역시 대덕구 대덕대로1520번길 55, 101동 504호(목상동, 두레마을아파트)
심기석
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 305동 603호(전민동, 엑스포아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

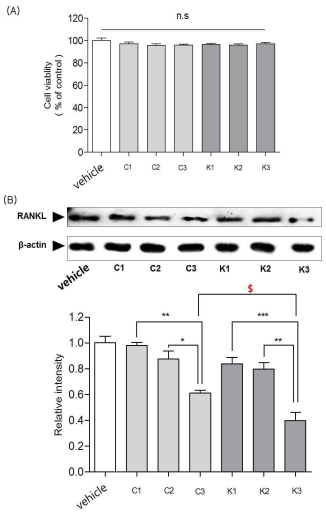
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **KIOM 법하수오 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 KIOM 법하수오 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 KIOM 법하수오는 일반적인 재배법으로 생산된 하수오 또는 이를 이용한 포제 하수오에 비해 파골세포의 분화를 유도하는 RANKL의 발현량을 더 감소시키고, 파골세포 활성을 나타내는 TRAP 활성을 통계적으로 유의미하게 더 억제하는 것이다. 따라서 본 발명의 조성물은 골다공증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물; 또는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학 조성물로 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A01H 4/001 (2021.01)
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 5/23 (2016.08)
A61K 36/704 (2013.01)
A61P 19/10 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/306 (2013.01)
A61K 2236/11 (2013.01)

(72) 발명자
김용구
전라남도 나주시 한빛로 61, 115동 2004호(빛가람동, 빛가람우미린아파트)
최고야
전라남도 나주시 건재로 111, 304호(대호동)
양웅모
경기도 하남시 미사강변북로 65, 1007동 1902호(선동, 미사강변 더샵 리버포레)
김미혜
경기도 수원시 장안구 장안로 211, 202동 1502호(정자동, 동신아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	KSN1911420
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국한의학연구원
연구사업명	한약가치 혁신기술 개발(주요사업)
연구과제명	한약표준자원 활용기술 개발
기 여 율	7/10
과제수행기관명	한국한의학연구원
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	C18050
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	국가과학기술연구회
연구사업명	한의학 국가 핵심 허브 구축
연구과제명	KIOM 학부생연구프로그램(URP)
기 여 율	3/10
과제수행기관명	한국한의학연구원
연구기간	2018.04.01 ~ 2018.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

하수오 기내배양용 배지 조성물을 이용하여 하수오의 영양체로부터 조직배양 묘를 배양하는 단계를 포함하는 하수오의 생산방법으로 생산된 KIOM 하수오를 흑두즙으로 포제하여 제조된 KIOM 법하수오의 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 하수오 기내배양용 배지 조성물은 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, FeNaEDTA, H_3BO_3, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, KH_2PO_4, K_2SO_4, $MgSO_4$, NH_4NO_3, 글리신, 미오이노시톨(myo-Inositol), 니코틴산(Nicotinic acid), 피리독신 하이드로클로라이드(Pyridoxine HCl) 및 티아민 하이드로클로라이드(Thiamine HCl)를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 골다공증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 흑두즙은 (1) 흑두 1 중량부에 대하여, 4~6 부피부의 물을 넣고, 90~110℃에서 2~6시간 동안 가열하여 추출한 제1 흑두즙; 및

(2) 상기 제1 흑두즙을 제거하고 남은 삶은 흑두 1 중량부에 대하여, 3~5 부피부의 물을 넣고 3시간 동안 탕전하여 추출한 제2 흑두즙;의 혼합물인 것을 특징으로 하는 골다공증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 KIOM 법하수오는 KIOM 하수오와 흑두즙을 혼합하여 흑두즙이 KIOM 하수오에 잘 흡수되도록 1~3시간 간격으로 3~5회 섞어 주고, 이후 0.5~2시간 동안 150~160℃에서 가열하고, 흑두즙이 흡수된 KIOM 하수오를 40~50℃에서 6~10시간 동안 건조시켜 제조한 것을 특징으로 하는 골다공증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조직배양 묘를 배양하는 조건은 20~27℃의 온도, 3,000~7,000Lux의 광도 및 16/8 시간의 명/암 주기 조건으로 배양하는 것을 특징으로 하는 골다공증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 KIOM 법하수오 추출물의 용매는 물, C_1~C_4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물인 것을 특징으로 하는 골다공증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 KIOM 법하수오 추출물의 추출방법은 냉침법인 것을 특징으로 하는 골다공증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

하수오 기내배양용 배지 조성물을 이용하여 하수오의 영양체로부터 조직배양 묘를 배양하는 단계를 포함하는 하수오의 생산방법으로 생산된 KIOM 하수오를 흑두즙으로 포제하여 제조된 KIOM 법하수오의 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 하수오 기내배양용 배지 조성물은 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, FeNaEDTA, H_3BO_3, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, KH_2PO_4, K_2SO_4, $MgSO_4$, NH_4NO_3, 글리신, 미오이노시톨(myo-Inositol), 니코틴산(Nicotinic acid), 피리독신 하이드로클로라이드(Pyridoxine HCl) 및 티아민 하이드로클로라이드(Thiamine HCl)를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 KIOM 법하수오 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 골다공증(osteoporosis)은 골 조직의 석회가 감소하여 뼈의 치밀질이 엷어지고, 그로 인해 골수강(骨髓腔)이 넓어지는 상태로, 증세가 진전됨에 따라 뼈가 약해지기 때문에 작은 충격에도 골절되기 쉽다. 골량은 유전적 요인, 영양 섭취, 호르몬의 변화, 운동 및 생활 습관의 차이 등 여러 가지 요인들에 의해 영향을 받으며, 골다공증의 원인으로는 노령, 운동 부족, 저체중, 흡연, 저칼슘 식이, 폐경, 난소 절제 등이 알려져 있다. 한편, 개인차는 있지만 백인보다는 흑인이 골 재흡수 수준(bone resorption level)이 낮아 골량이 더 높다. 여성은 30세 이후부터 골 감소가 지속적으로 진행되며, 폐경기에 이르면 호르몬 변화에 의해 골 감소가 급격히 진행되지만, 남성은 여성과 달리 명백한 폐경기가 없기 때문에 골다공증의 발생이 훨씬 적다. 남성의 경우는 나이가 증가함에 따라 장에서 칼슘의 섭취가 적어지고 뼈 생성도 감소하기 때문에 골다공증이 발생된다.

[0003] 이와 같이 골다공증은 정도에 차이는 있으나 노년층, 특히 폐경기 이후의 여성에게 있어서는 피할 수 없는 증상으로, 선진국에서는 인구가 노령화됨에 따라 골다공증 및 그 치료제에 대한 관심이 점차 증가하고 있다. 또한, 전 세계적으로 골질환 치료와 관련되어 약 1300억 달러의 시장이 형성되어 있는 것으로 알려져 있으며, 앞으로 더 증가할 것으로 예상되기 때문에, 세계적인 각 연구기관과 제약회사에서는 골질환 치료제 개발에 많은 투자를 하고 있다.

[0004] 한편, 하수오(何首烏, Polygoni Multiflori Radix)는 마디풀과에 속하는 식물 하수오의 덩이뿌리를 말한다. 하수오는 다년생 초본으로 덩굴성 식물이고, 뿌리는 방추형 또는 덩이뿌리이며, 길이는 5~15cm, 지름은 3~12cm이다. 줄기는 덩굴성이며 마디가 있고 줄기의 아랫부분은 목질로 속이 비어있으며 잎은 어긋나고 단엽이며 엽병이 길고 난형 또는 심장형이다. 잎의 가장자리는 밋밋하고 양면에 털은 없다. 꽃은 줄기 끝이나 엽액에 큰 원추형 화서가 달리며 10월에 녹백색으로 피고 꽃잎은 5개로 갈라져 있다. 하수오의 절단 전 덩이뿌리의 길이는 6~12cm, 지름은 3~12cm이고, 외면은 적갈색에서 암갈색으로 울퉁불퉁하고 불규칙한 세로 홈이 있으며 뿌리의 흔적이 있다. 절단 약재의 단면은 연한 적갈색 또는 연한 황갈색을 띠고 몇 개의 원형에 가까운 이형 섬유관이 운금 모양의 무늬를 형성한다. 이 운금 모양의 무늬는 건조 전인 괴경이나 건조 후의 약재에서도 잘 나타나는 특징의 하나로 하수오를 형태적으로 구별할 수 있는 감별 포인트로 잘 알려져 있다. 약재로서 하수오는 간기능 강화, 동맥경화 예방, 혈액순환 장애 개선, 원기 회복에도 도움이 되는 것으로 알려져 있으며, 피부에도 좋고, 뼈와 근육을 튼튼하게 하고, 신경쇠약이나 불면증에도 도움이 되는 등 다양한 약리 작용 및 효능 연구는 다수 진행되어 보고된 바 있다.

[0005] 대한 본초학회지 제20권 제2호에 생하수오와 제하수오가 난소적출로 유발된 흰쥐의 골다공증 예방 효과에 미치는 영향이 개시된 바 있으며, 한국등록특허 제0586813호에 혼합 생약재 추출물 및 이를 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 건강식품이 개시되어 있으나, 본 발명의 KIOM 법하수오 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대해 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, KIOM 법하수오 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하고, 본 발명의 KIOM 법하수오가 일반적인 재배법으로 생산된 하수오 또는 이를 포제한 하수오에 비해 파골세포의 분화를 유도하는 RANKL의 발현량을 더 감소시키고, 파골세포 활성을 나타내는 TRAP 활성을 통계적으로 유의미하게 더 억제하는 효과가 있다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하수오 기내배양용 배지 조성물을 이용하여 하수오의 영양체로부터 조직배양 묘를 배양하는 단계를 포함하는 하수오의 생산방법으로 생산된 KIOM 하수오를 흑두즙으로 포제하여 제조된 KIOM 법하수오의 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 하수오 기내배양용 배지 조성물을 이용하여 하수오의 영양체로부터 조직배양 묘를 배양하는 단계를 포함하는 하수오의 생산방법으로 생산된 KIOM 하수오를 흑두즙으로 포제하여 제조된 KIOM 법하수오의 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명은 KIOM 법하수오 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 KIOM 법하수오는 일반적인 재배법으로 생산된 하수오 또는 이를 이용한 포제 하수오에 비해 파골세포의 분화를 유도하는 RANKL의 발현량을 더 감소시키고, 파골세포 활성을 나타내는 TRAP 활성을 통계적으로 유의미하게 더 억제하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 하수오 또는 포제 하수오의 건조품 사진이다. A(C1)는 유통품 하수오(실생묘방식으로 재배된 하수오); B(C2)는 유통품 하수오를 포제한 초하수오; C(C3)는 유통품 하수오를 포제한 법하수오;, D(K1)는 영양체 기반 약용부위 비대기술(한국등록특허 제1777833호)에 따른 KIOM 하수오; E(K2)는 KIOM 하수오를 포제한 초하수오; F(K3)는 KIOM 하수오를 포제한 법하수오이다.

도 2는 100㎍/㎖의 하수오 및 포제 하수오 추출물(K1~K3, C1~C3)을 SaOS-2 골육종 세포에 처리한 후, 세포 독성(A) 및 RANKL 단백질의 발현량(B)을 확인한 결과이다. *, **, ***은 C1 또는 C2에 대비한 C3의 발현량, K1 또는 K2에 대비한 K3의 발현량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, *는 $p<0.05$이고, **는 $p<0.01$이며, ***는 $p<0.001$이다. $는 C3 대비 K3가 통계적으로 유의미하게 RANKL 발현량이 더 감소했다는 것을 의미하는 것으로, $p<0.05$이다.

도 3은 50㎍/㎖의 하수오 및 포제 하수오 추출물(C1, C3, K1, K3)을 마우스 골수세포 유래의 대식세포(BMM)에 처리한 후, 세포 독성(A) 및 파골세포 활성을 나타내는 TRAP 활성 억제(B)를 확인한 것이다. †, ††는 아무것도 처리하지 않은 대조군(vehicle) 대비 하수오 및 포제 하수오 추출물(C1, C3, K1, K3) 처리군의 파골세포 활성을 나타내는 TRAP 활성이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, †는 $p<0.05$이고, ††는 $p<0.01$이다. ##는 C1 대비 K1 처리군이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, $p<0.01$이고, #는 C3 대비 K3 처리군이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, $p<0.05$이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명은 하수오 기내배양용 배지 조성물을 이용하여 하수오의 영양체로부터 조직배양 묘를 배양하는 단계를 포함하는 하수오의 생산방법으로 생산된 KIOM 하수오를 흑두즙으로 포제하여 제조된 KIOM 법하수오의 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[0012] 상기 하수오 기내배양용 배지 조성물은 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, FeNaEDTA, H_3BO_3, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, KH_2PO_4, K_2SO_4, $MgSO_4$, NH_4NO_3, 글리신, 미오이노시톨(myo-Inositol), 니코틴산(Nicotinic acid), 피리독신 하이드로클로라이드(Pyridoxine HCl) 및 티아민 하이드로클로라이드(Thiamine HCl)를 유효성분으로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0013] 본 발명에 따른 'KIOM 하수오'는 한국등록특허 제1777833호에서 개시한 하수오 기내배양용 배지 조성물 및 이를

이용하는 종묘 대량 생산 방법에 따라 생산된 하수오를 의미하며, 일반적인 재배 방법으로 생산한 하수오와 구별되는 것이다.

[0014] 한편, 본 발명에서 사용한 '법하수오'는 하수오를 한의학적 이론에 근거하여 흑두즙을 이용하여 포제한 하수오를 의미하는 것이다.

[0015] 상기 흑두즙은 (1) 흑두 1 중량부에 대하여, 4~6 부피부의 물을 넣고, 90~110℃에서 2~6시간 동안 가열하여 추출한 제1 흑두즙; 및

[0016] (2) 상기 제1 흑두즙을 제거하고 남은 삶은 흑두 1 중량부에 대하여, 3~5 부피부의 물을 넣고 3시간 동안 탕전하여 추출한 제2 흑두즙;의 혼합물인 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다.

[0017] 상기 KIOM 법하수오는 KIOM 하수오와 흑두즙을 혼합하여 흑두즙이 KIOM 하수오에 잘 흡수되도록 1~3시간 간격으로 3~5회 섞어 주고, 이후 0.5~2시간 동안 150~160℃에서 가열하고, 흑두즙이 흡수된 KIOM 하수오를 40~50℃에서 6~10시간 동안 건조시켜 제조한 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다.

[0018] 상기 조직배양 묘를 배양하는 조건은 20~27℃의 온도, 3,000~7,000Lux의 광도 및 16/8 시간의 명/암 주기 조건으로 배양하는 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다.

[0019] 상기 KIOM 법하수오 추출물의 용매는 물, C_1~C_4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 물이지만 이에 한정하는 것은 아니다.

[0020] 상기 KIOM 법하수오 추출물은 냉침법으로 추출하는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 KIOM 법하수오 10 중량부에 대하여, 80~120 부피부의 물을 넣고, 15~25℃에서 1~3시간 동안 100~300rpm의 조건으로 냉침추출하는 것이지만 이에 한정하지 않는다.

[0021] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 또는 음료의 제형으로 제조되는 것이 바람직하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 본 발명의 건강기능식품 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 유효성분을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취인 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0023] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합체 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0024] 본 발명의 조성물을 건강 음료로 사용할 경우, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 텍스트린, 사이클로텐스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐산과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100g당 일반적으로 약 0.01~0.04g, 바람직하게는 약 0.02~0.03g이다. 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 중점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일 주스, 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물은 100 중량부 당 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0025] 또한, 본 발명은 하수오 기내배양용 배지 조성물을 이용하여 하수오의 영양체로부터 조직배양 묘를 배양하는 단계를 포함하는 하수오의 생산방법으로 생산된 KIOM 하수오를 흑두즙으로 포제하여 제조된 KIOM 법하수오의 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0026] 상기 하수오 기내배양용 배지 조성물은 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, FeNaEDTA, H_3BO_3, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, KH_2PO_4, K_2SO_4, $MgSO_4$, NH_4NO_3, 글리신, 미오이노시톨(myo-Inositol), 니코틴산(Nicotinic acid), 피리독신 하이드로클로라이드(Pyridoxine HCl) 및 티아민 하이드로클로라이드(Thiamine HCl)를 유효성분으로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 환제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 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, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제 및 현탁 용제로는 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, 글리세로 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 비경구 투여 시 피부 외용 또는 복강 내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사 방식을 선택하는 것이 바람직하다.

[0028] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효량의 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 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.

[0029] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0030] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0031] **실시예 1. KIOM 법하수오의 제조**

[0032] **(1) 흑두즙의 제조**

[0033] 국내산 흑두 1kg에 물 5ℓ를 압력식 탕전기에 넣고, 100℃에서 4시간 동안 탕전하여 제1 흑두즙을 제조하였다. 이후, 제1 흑두즙을 제거하고 남은 삶아진 흑두에 물 4ℓ를 넣고, 100℃에서 3시간 동안 탕전하여 제2 흑두즙을 제조하였다. 이후, 상기 획득한 제1 및 제2 흑두즙을 혼합하였다.

[0034] **(2) 법하수오의 제조**

[0035] KIOM 특허등록(제10-1777833)된 기내배양용 배지 조성물을 이용해 생산한 생하수오 250g과 상기 제조한 흑두즙을 용기에 넣고, 흑두즙이 KIOM 하수오에 잘 흡수되도록 2시간 간격으로 4회 섞어주었다. 이후 흑두즙이 잘 흡수되도록 소형 약탕기에 넣고, 60℃에서 1시간 동안 가열하였다. 완전하게 흑두즙이 흡수되었을 때, 약재 건조기에 넣고, 45℃에서 8시간 동안 건조함으로써, KIOM 법하수오를 제조하였다.

[0036] **(3) 초하수오의 제조**

[0037] 한편, 본 발명의 법하수오와 비교하기 위한 포제방법으로, 초하수오를 제조하였다. 1kg의 하수오를 160℃에서 40분 동안 볶아 하수오의 바깥면이 갈색이 되도록 한 후에 약재 건조기에서 45℃에서 4시간 동안 건조시킴으로써, KIOM 초하수오를 제조하였다.

[0038] 본 발명의 비교예로서 유통품인 생하수오를 참들애 농업법인회사로부터 구매하여, 상기 제조한 법하수오 및 초하수오와 동일한 방법으로 포제하여, 비교예로 사용하였고, 포제하지 않은 KIOM 하수오 및 유통품 하수오를 동일 방법으로 추출하여 비교예로 사용하였다.

[0039] 본 발명의 실시예 및 도면에서, C1~C3는 유통품 하수오로서, C1은 포제하지 않은 생하수오 추출물이고, C2는 초하수오 추출물이며, C3는 법하수오 추출물이다. K1~K3는 KIOM 하수오로서, K1은 포제하지 않은 KIOM 생하수오 추출물이고, K2는 KIOM 초하수오 추출물이며, K3는 KIOM 법하수오 추출물이다(도 1).

[0040] **실시예 2. 하수오 및 포제 하수오 추출물의 제조**

[0041] 상기 실시예 1에서 준비한 6종의 시료(K1~K3, C1~C3) 10g에 대하여, 100㎖의 물을 넣고, 20℃에서 2시간 동안 200rpm의 조건으로 냉침추출하였다. 이후 여과하고 감압농축하여 -80℃에서 72시간 동안 동결 건조하였다. 각각의 시료는 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다.

[0042] **실시예 3. SaOS-2 골육종 세포에서의 세포 독성 및 파골세포의 분화를 유도하는 RANKL의 발현량 확인**

[0043] **(1) 세포 독성 확인**

[0044] SaOS-2 골육종 세포에서, 100㎍/㎖의 하수오 및 포제 하수오 추출물(C1~C3, K1~K3)의 세포독성을 확인하였다. SaOS-2 골육종 세포는 서울대학교 세포주 은행으로부터 분양받아, 10% 소 태아혈청(fetal bovine serum)을 포함하는 DMEM에서 온도가 37℃이고, 습도가 95%이며, 5% CO_2인 조건에서 배양하였다. 이후, 웰당 1×10^6 세포를 24웰에 분주하고, 24시간 동안 배양한 후, 새로운 배지로 교환하고 3㎖의 시료를 첨가하여, 최종 100㎍/㎖ 농도가 되도록 하였다. 세포 생존율은 MTT(3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) 어세이를 통해 확인하였는데, 96웰 플레이트에 1×10^5 세포를 분주하고, 100㎍/㎖의 생하수오 및 포제 하수오 추출물(C1~C3, K1~K3)을 처리하고, 24시간 동안 배양한 후, 2mg/㎖의 MTT를 웰당 50㎕ 첨가하고 2시간 동안 인큐베이션하였다. 이후, Gene5를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0045] 그 결과, 도 2(A)에 개시한 바와 같이, 본 발명의 실시예 1 및 2에 따른 100㎍/㎖의 생하수오 및 포제 하수오 추출물(C1~C3, K1~K3)은 SaOS-2 골육종 세포에서 세포독성이 거의 나타나지 않았다.

[0046] **(2) 파골세포 분화 인자인 RANKL 단백질의 발현량 확인**

[0047] 본 발명의 실시예 1에서 제조한 100㎍/㎖의 하수오 및 포제 하수오 추출물(K1~K3, C1~C3)을 SaOS-2 골육종 세포에 처리한 후, 파골세포 분화 인자인 RANKL 단백질의 발현량의 변화를 웨스턴 블랏으로 확인하였다.

[0048] 그 결과, 도 2(B)에 개시한 바와 같이, 아무것도 처리하지 않은 대조군(Vehicle) 대비 100㎍/㎖의 하수오 및 포제 하수오 추출물(K1~K3, C1~C3)을 처리한 군에서의 발현량이 감소하였으며, 생하수오 추출물(C1 및 K1), 초하수오(C2, K2) 추출물, 및 법하수오(C3, K3) 추출물 처리군의 순으로 RANKL 단백질의 발현량이 감소하였고, 통계적으로도 유의한 차이를 보였다. 특히, KIOM 법하수오 추출물(K3)은 RANKL 단백질의 발현량을 가장 많이 감소시키는 것으로 나타나, 하수오 및 포제 하수오 추출물(K1~K3, C1~C3) 중에서 파골세포의 분화를 가장 많이 억제할 것으로 예상되었다.

[0049] **실시예 4. 마우스 골수세포 유래 대식세포(BMM)에서의 세포 독성 및 파골세포의 분화 억제능 확인**

[0050] **(1) 세포 독성 확인**

[0051] 마우스의 골수세포 유래의 대식세포(BMM)에서, 50㎍/㎖의 하수오 및 포제 하수오 추출물(K1, K3, C1, C3) 각각의 세포 독성을 확인하였다. 상세하게는 마우스의 골수세포를 60ng/㎖의 M-CSF(macrophage colony stimulating factor)와 10%(v/v) FBS를 함유한 α-MEM 배지에 6일 동안 배양하여 골수세포 유래 대식세포(bone marrow-derived macrophages, BMM)를 수득하였다. 상기 수득한 마우스 골수 유래 대식세포(BMM)를 M-CSF(60ng/㎖)를 함유하는 배지에서 1일 동안 50㎍/㎖의 하수오 및 포제 하수오 추출물(K1, K3, C1, C3)을 첨가하여 배양한 후 세포 독성 유무를 확인하였다. 세포 생존율(cell viability)은 세포 계수 키트-8(Cell counting Kit-8; CCK-8. Dojindo Inc.)을 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정함으로써 확인하였다.

[0052] 그 결과, 도 3(A)에 개시한 바와 같이, 본 발명의 실시예 1 및 2에 따른 50㎍/㎖의 생하수오 및 포제 하수오 추출물(K1, K3, C1, C3)은 대식세포에서 세포 독성이 거의 나타나지 않았다.

[0053] **(2) 파골세포의 분화 억제능 확인**

[0054] 마우스 골수세포 유래 대식세포(BMM)를 M-CSF(60ng/㎖) 및 RANKL(100ng/㎖)을 포함하는 배지에 4일 동안 배양하였고, 같은 배양조건에서 대식세포(BMM)에 실시예 1 및 2에 따른 50㎍/㎖의 하수오 및 포제 하수오 추출물(K1, K3, C1, C3)을 처리하여 파골세포 활성화의 억제 능을 확인하였다. 배양 4일 후, 세포를 10%(v/v) 포르말린으로 고정하고, 나프톨 AS-MS 포스페이트 및 패스트 레드 바이올렛 LB 염(fast red violet LB salt)을 이용하여 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase) 염색을 실시하여 TRAP 활성과 연관되어 있는 TRAP 양성 세포(파골세포, osteoclast)를 확인하였다.

[0055] 그 결과, 도 3(B)에 나타난 바와 같이 50㎍/㎖의 하수오 및 포제 하수오 추출물(K1, K3, C1, C3)은 파골세포 활성을 나타내는 TRAP 활성의 억제를 확인하였으며, 특히 포제 하수오 추출물이 생하수오 추출물보다 효과가 우수하고, 유통품 법하수오(C3)보다 KIOM 법하수오(K3)의 효과가 더 우수하다는 것을 확인하였다.

[0056] [통계적 분석]

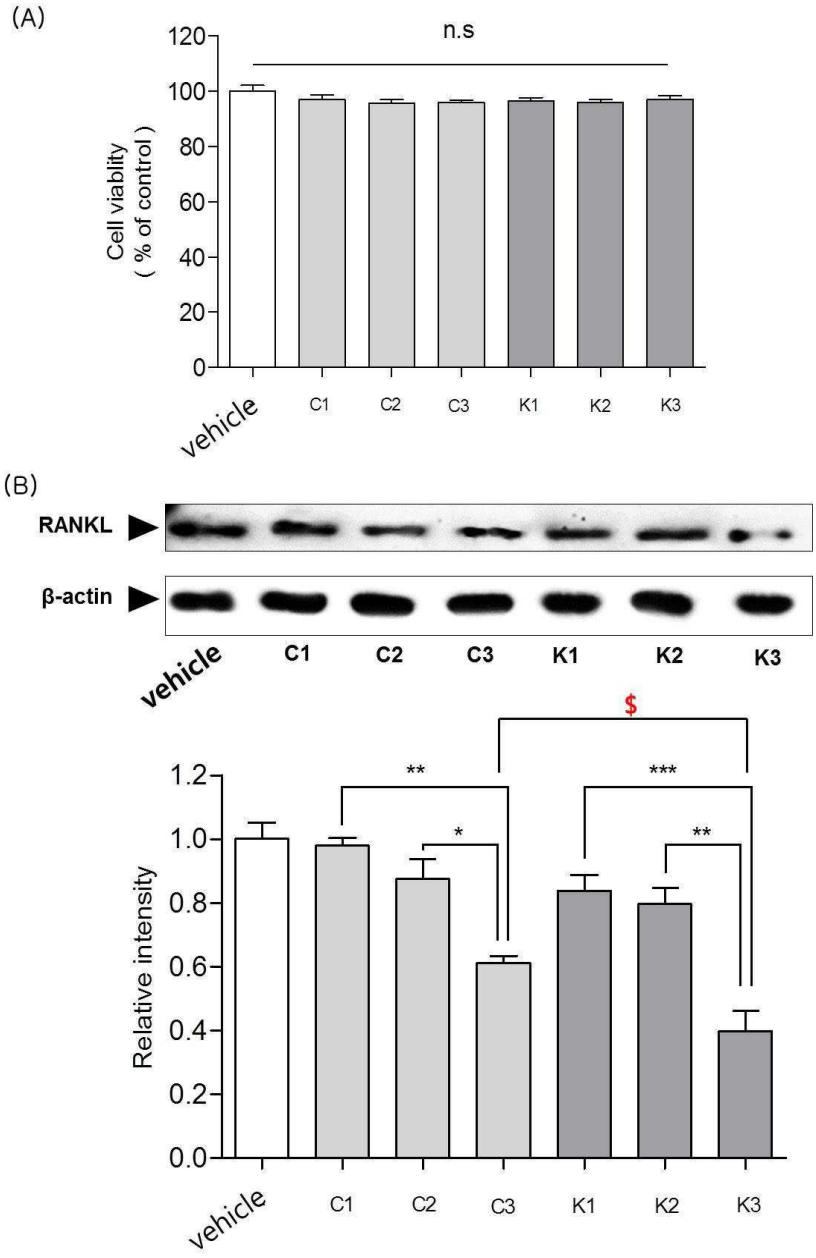
[0057] 본 발명의 실시예에서의 모든 결과는 평균±표준오차로 표시하였고, One-way ANOVA Tukey 프로그램을 사용하여 $p<0.05$일 경우, 통계적으로 유의미하다고 판단하였다.

도면

도면1

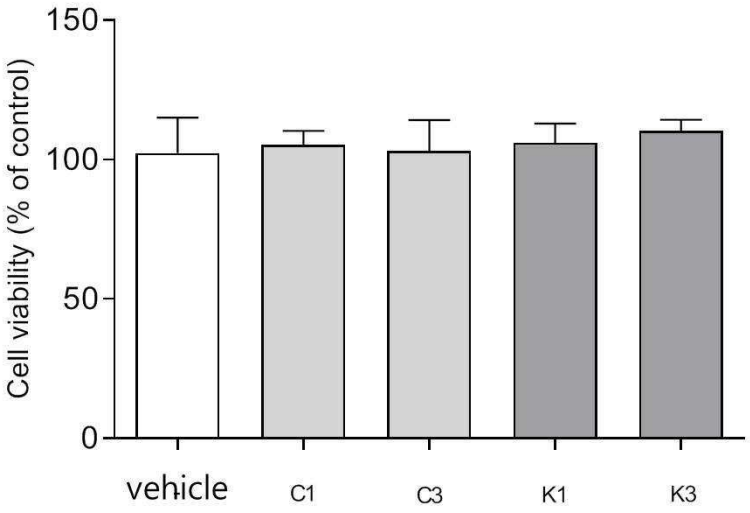


도면2

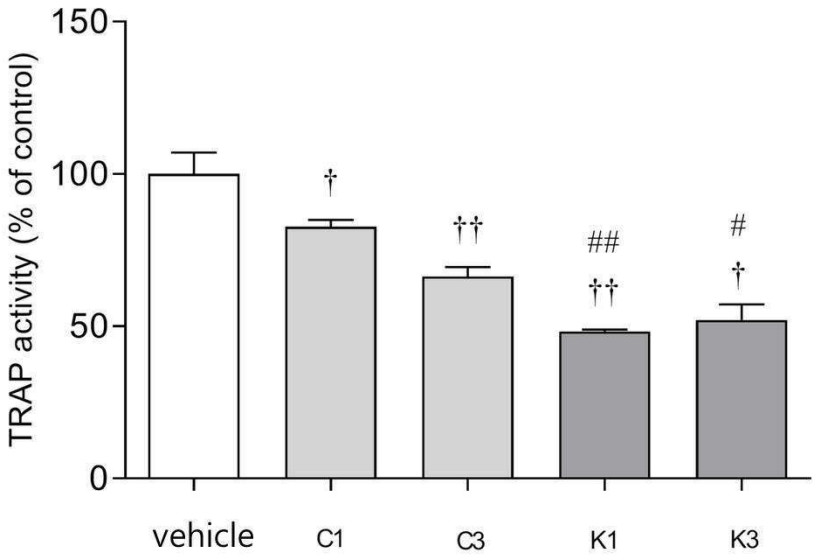

(A)
n.s
Cell viablity
(% of control)
120
100
80
60
40
20
0
vehicle
C1
C2
C3
K1
K2
K3
(B)
RANKL
β-actin
vehicle
C1
C2
C3
K1
K2
K3
$
**
***
*
**
Relative intensity
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
vehicle
C1
C2
C3
K1
K2
K3

도면3

(A)


150
100
50
0
Cell viability (% of control)
vehicle
C1
C3
K1
K3

(B)


150
100
50
0
TRAP activity (% of control)
†
††
##
††
#
†
vehicle
C1
C3
K1
K3