



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0027643

(43) 공개일자 2022년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/4025 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)

A61K 36/67 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/4025 (2013.01)

A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2020-0108763

(22) 출원일자 2020년08월27일

심사청구일자 2020년08월27일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

한국한의약진흥원

경상북도 경산시 화랑로 94 (갑제동, 한약진흥재단)

(72) 발명자

윤형문

경기도 파주시 가람로116번길 130, 710동 2001호 (와동동, 가람마을7단지한라비발디)

박경란

서울특별시 성북구 월곡로14길 26(하월곡동, 월곡래미안루나밸리)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 하나

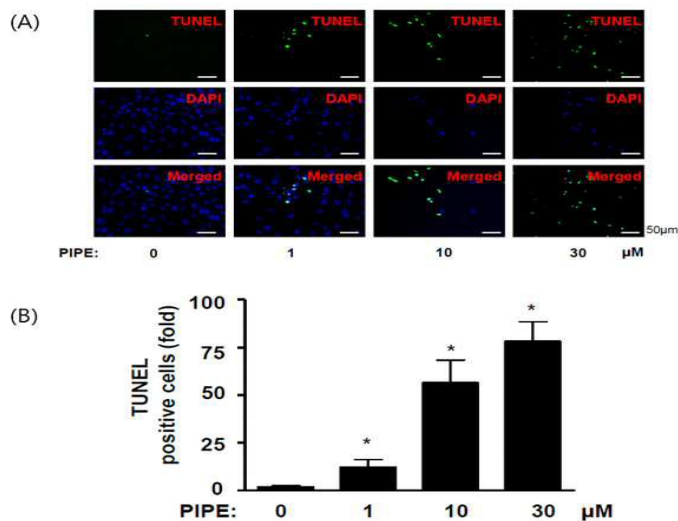
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 피페리린을 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 피페리린을 포함하는 골 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 36/67 (2013.01)

A61P 19/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/306 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

(72) 발명자

조명래

경상북도 경산시 삼성현로 203, 105동 201호(옥곡동, 웰리치성암)

임현희

대구광역시 동구 안심로22길 76, 906동 704호(율하동, 율하 휴먼시아9단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345316256

과제번호 2018R1D1A1B07043282

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 (통합)한국연구재단

연구사업명 [통합] 기본연구(1년~5년)

연구과제명 우울증 유발 5-hydroxytryptamine 시스템을 통한 중앙 발생 네트워크 연구 및 신규

표적 탐색

기 여 율 1/1

과제수행기관명 경희대학교 산학협력단

연구기간 2018.06.01 ~ 2021.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

피페리린(piperlyline)를 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 피페리린은 조골세포의 분화(differentiation)를 조절하는 것인, 골 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 골 질환은 골다공증(osteoporosis), 치주 질환(periodontal disease), 골석화증(Osteopetrosis), 페이젯 병(Paget's disease), 골감소증(osteopenia), 골 위축(bone atrophy), 섬유성골이형성증(fibrous dysplasia), 고칼슘혈증(hypercalcemia), 뼈의 종양성 파괴(neoplastic destruction), 골용해(osteolysis), 골관절염(osteoarthritis) 또는 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis)인 것인, 골 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

피페리린을 포함하는 골 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 골 질환은 골다공증(osteoporosis), 치주 질환(periodontal disease), 골석화증(Osteopetrosis), 페이젯 병(Paget's disease), 골감소증(osteopenia), 골 위축(bone atrophy), 섬유성골이형성증(fibrous dysplasia), 고칼슘혈증(hypercalcemia), 뼈의 종양성 파괴(neoplastic destruction), 골용해(osteolysis), 골관절염(osteoarthritis) 또는 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis)인 것인, 골 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 6

후추(*Piper nigrum*) 추출물로부터 피페리린을 분리하는 단계를 포함하는, 조골세포의 사멸 및 분화 조절용 조성물 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 무수 또는 저급 알코올, 상기 물과 저급 알코올의 혼합 용매, 아세톤, 1,3-부틸렌글리콜, 에틸아세테이트, 클로로포름으로 이루어진 군에서 선택되는 1 종 이상의 용매로 추출하여 수득한 것인, 조골세포의 사멸 및 분화 조절용 조성물 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 피페리린을 포함하는 골 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 뼈는 일생동안 지속적으로 변화하는 활동적인 조직이다. 뼈는 육안으로 외부의 피질골(치밀골)과 내부의 소주골(해면골, 스폰지뼈)로 구분하는데, 피질골은 물리적인 강도가 강하여 신체를 보호하고 지지하는 역할을 하고, 소주골은 충격을 흡수하거나 칼슘의 변화를 일정하게 유지하는 역할을 한다.
- [0003] 뼈의 성장이 중단된 후에도 오래된 뼈는 파괴되어 없어지고(골 흡수), 새로운 뼈가 없어진 곳을 메우는 고정(골 형성)이 일생동안 반복되는, 이러한 현상을 뼈의 재형성(remodeling)이라 한다. 조골세포와 파골세포 사이의 상호작용이 균형을 이루어 골 흡수와 골 형성이 균형을 이루어야 뼈의 항상성이 유지되고 혈액 속의 칼슘 농도가 일정하게 유지되는데, 혈액에 칼슘이 부족하게 되면 이를 보충하기 위하여 골 흡수가 증가되어 뼈의 칼슘을 혈액으로 방출하게 되며, 골 흡수가 지속되면 뼈가 약해져 골다공증과 같은 질환이 발생한다.
- [0004] 특히, 골다공증은 폐경에 따른 급격한 호르몬의 변화에 의한 파골세포(osteoclast)의 활성화에 따른 골흡수 증가로 나타나는 폐경 후 골다공증과, 노화가 되면서 조골세포(osteoblast)의 기능이 감소하여 골형성이 감소하는 노인성 골다공증으로 분류할 수 있다. 이러한 골다공증으로 인한 골절은 심각한 활동 제한에 이르게 되고, 고관절 골절의 경우 약 15-35%의 높은 사망률과 관련되어 있기 때문에, 골다공증성 골절이 발생하기 이전에 골다공증의 진단과 치료가 중요하다.
- [0005] 또한, 파제트병(Paget's diseases)은 골대사이상으로 골흡수가 일어나고 골형성이 증가하는 질환으로 골의 크기는 증가하지만 형성된 골은 불규칙한 모자이크 형상의 충만뼈이며, 골조직은 구조적으로 가볍고 연하고 다공성이어서 병적 골절이 발생하고 합병증으로 침범된 골에서 다양한 종류의 종양과 종양성 병변이 발생한다. 특히 파제트병과 동반되어 발생하는 골육종(osteosarcoma)은 예후가 매우 불량하지만 파제트병을 치료할 수 있는 효과적인 약물은 개발되지 않았다.
- [0006] 따라서 골질환의 근본적인 치료를 위해서는 소실된 골량에 대한 회복뿐만 아니라 골대사의 이상을 조절할 수 있는 저분자(small molecule) 골 조절 약물 개발이 절실하다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2004-0003668호

발명의 내용

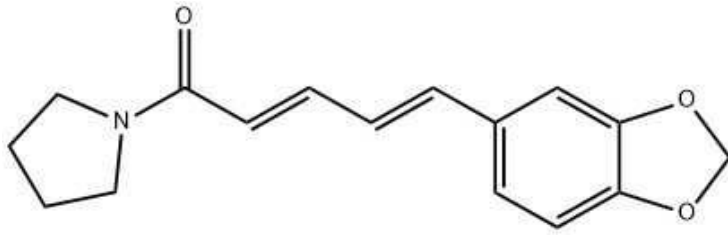
해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 피페리린(piperine)을 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 피페리린을 이용한 골 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 피페리린을 포함하는 골 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 후추(*Piper nigrum*) 추출물로부터 피페리린을 분리하는 단계를 포함하는, 조골세포의 분화 조절용 조성물 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 일 측면은 피페리린(piperine)을 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0013] 상기 피페리린은 하기 화학식 1로 표시될 수 있다.

화학식 1



[0014]

[0015]

본 발명에서, 상기 화학식 1로 표시되는 피페리딘은 (2E, 4E)-5-(1,3-벤조디옥솔-5-일)-1-피롤리딘-1-일펜타-2,4-디엔-1-온으로 명명될 수 있다.

[0016]

상기 피페리딘은 후추(*Piper nigrum*)에서 분리된 아미드 알칼로이드(amide alkaloid)로서, 상기 알칼로이드는 파이토케미컬(phytochemical)의 하나로 인간 및 동물의 생리작용에 중요한 영향을 미친다. 예컨대 알칼로이드는 신경조직이나, 심장근육, 호흡기조직 등의 흥분을 야기하며, 약리학적 효과를 가지고 있어 다양한 의약품에 활용되고 있다. 한편, 알칼로이드 성분 중 하나인 피페리딘의 조골세포에 서의 생물학적 작용에 관한 약리적 효과에 대하여는 규명된 바 없다.

[0017]

조골세포의 부착, 이동 및 분화는 골 단백질의 합성 및 분비, 및 뼈 조직의 광물화에 중요하며, 조골세포 계통의 증식, 이동 및 분화 기능에 이상이 생길 경우, 골다공증 및 치주염과 같은 골 질환이 발생하게 된다.

[0018]

이에, 본 발명자는 상기 피페리딘이 조골세포의 사멸, 부착, 이동, 분화 등의 기능 조절에 우수한 효과가 있음을 규명하였으며, 상기 피페리딘을 포함하는 골 질환 치료용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

[0019]

구체적으로, 상기 골 질환은 골다공증(osteoporosis), 치주 질환(periodontal disease), 골석화증(Osteopetrosis), 페이젯병(Paget's disease), 골연화증(osteomalacia), 골감소증(osteopenia), 골 위축(bone atrophy), 섬유성골이형성증(fibrous dysplasia), 페이젯병(Paget's disease), 고칼슘혈증(hypercalcemia), 뼈의 종양성 파괴(neoplastic destruction), 골용해(osteolysis), 골관절염(osteoarthritis) 또는 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis)일 수 있다.

[0020]

상기 피페리딘은 조골세포의 분화(differentiation)를 조절할 수 있으며, 조골세포의 세포사멸(apoptosis), 부착(adhesion) 및/또는 이동(migration)을 조절할 수 있다.

[0021]

본 발명의 일 실시예에서는 피페리딘이 항-세포사멸 인자인 Bcl-2 패밀리 및 서바이빈의 발현은 억제하는 반면, 세포사멸 인자인 Bax-2의 발현을 촉진시키고 PARP 절단을 유도함으로써, 세포사멸을 유도할 수 있음을 확인하였다(도 4 및 도 5).

[0022]

또한, 본 발명의 일 실시예에서 피페리딘이 조골세포의 부착 및 세포 이동을 유의적으로 억제시킴을 확인하였으며(도 7 및 도 8), 구체적으로 세포 부착 및 이동 관련 주요 신호 경로인 Src 및 FAK의 탈인산화를 증가시키고, Src/FAK 신호전달의 하류 표적 단백질의 활성화는 억제시킴으로써 세포 부착 및 이동을 감소시킴을 확인하였다(도 9).

[0023]

또한, 본 발명의 일 실시예에서 피페리딘이 ALP의 발현을 억제하고(도 10), 이는 Smad1/5/8 및 RUNX2 신호전달 경로를 조절함으로써 조절세포의 분화를 조절하는 것임을 확인하였다(도 11).

[0024]

상기와 같은 결과는 피페리딘이 세포 부착, 이동, 증식 및/또는 조골세포 분화 조절과 관련된 생물학적 효과가 우수함을 시사하는 바, 뼈 관련 질환의 예방, 개선 및 치료에 활용할 수 있음을 보여준다.

[0025]

본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위하여, 상기 본 발명의 피페리딘 외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 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 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0026]

또한, 본 발명의 약학적 조성물은 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 경구용 제형으로는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등일 수 있다. 비경구용 제형으로는 주사용, 도포용, 에어로졸 등의 스

플레이 형일 수 있다.

- [0027] 상기 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 피페리딘에 적어도 하나 이상의 부형제, 예컨대, 전분, 칼슘, 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 또는 젤라틴 등을 혼합하여 조제할 수 있다. 상기 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제가 사용될 수도 있다.
- [0028] 상기 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 단순회석제인 물, 리퀴드, 파라핀 외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0029] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 다른 측면은 피페리딘을 포함하는 약학적 조성물을 치료를 필요로 하는 개체에 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 골 질환 치료방법에 관한 것이다. 구체적으로 골 질환은 골다공증(osteoporosis), 치주 질환(periodontal disease), 골석화증(Osteopetrosis), 페이젯병(Paget's disease), 골감소증(osteopenia), 골 위축(bone atrophy), 섬유성골이형성증(fibrous dysplasia), 고칼슘혈증(hypercalcemia), 뼈의 종양성 파괴(neoplastic destruction), 골용해(osteolysis), 골관절염(osteoarthritis) 또는 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis)일 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성별, 연령, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한 본 발명의 약학적 조성물은 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 용어 "개체"는 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 증상이 호전될 수 있는 골 질환을 가진 동물 또는 인간을 포함한다. 본 발명에 따른 치료용 조성물을 개체에게 투여함으로써, 골 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 인간 또는 동물에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명에 따른 치료용 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 치료용 조성물은 유효성분이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 다른 목적은 피페리딘을 포함하는 골 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.
- [0037] 상기 "피페리딘" 및 "골 질환"과 관련된 설명은 전술한 바와 동일하다.
- [0038] 본 발명의 피페리딘을 첨가할 수 있는 식품은 육류, 빵, 소시지, 초콜릿류, 스낵류, 캔디류, 과자류, 라면, 피자, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 보조식품 등이 있다.
- [0039] 상기 식품의 종류는 구체적으로 건강기능식품일 수 있다. 상기 건강기능 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 점증제, pH 조절제, 안정화제, 보존제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 단독으로 또는 조합으로 사용될 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 조성물 전체 중량당 0.001 내지 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0040] 상기 건강기능식품은 식품의 생체 조절 기능을 강조한 식품으로 물리적, 생화학적, 생물공학적인 방법을 이용하여 특정 목적에 작용 및 발현하도록 부가가치를 부여한 식품이다. 이러한 건강기능 식품의 성분은 생체 방어와

신체 리듬의 조절, 질환의 방지 및 회복에 관계하는 신체 조절 기능을 생체에 대하여 충분히 발휘하도록 설계하여 가공하게 되며, 식품으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제, 감미료 또는 기능성 원료를 함유할 수 있다.

- [0041] 상기 건강기능식품은 정제, 과립, 분말, 캡슐, 액상의 용액 및 환으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 상기 정제 형태의 건강기능식품은 피페리린, 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제 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 고미제 등을 함유할 수 있으며, 필요에 따라 적당한 제피제로 제피할 수도 있다.
- [0042] 상기 캡슐 형태의 건강기능식품 중 경질캡슐제는 통상의 경질캡슐에 피페리린 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물 또는 그의 입상물 또는 제피한 입상물을 충전하여 제조할 수 있다. 연질캡슐제는 피페리린 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 젤라틴 등 캡슐기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질캡슐제는 필요에 따라 글리세린 또는 솔비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0043] 상기 환 형태의 건강기능식품은 피페리린, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 전분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의 입을 입힐 수도 있다.
- [0044] 상기 과립 형태의 건강기능식품은 피페리린, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 고미제 등을 함유할 수 있다.
- [0045] 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 고미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 것으로 그 기능 등의 동일 내지 유사한 것들을 포함할 수 있다.
- [0046] 또한, 상기 식품의 종류는 식품 첨가제일 수 있으며, 상기 식품 첨가제는 식품의 제조, 가공, 또는 보존을 위해 식품에 첨가, 혼합, 침윤 기타의 방법에 의해 사용되는 물질을 의미한다. 상기 식품 첨가제는 천연물과 합성품이 있으며, 기능과 용도에 따라 분류할 수 있다. 현재 한국에 식품첨가물로 허가되어 있는 품목은 화학적 합성품 370여종, 천연첨가물 50여종이며, 주로 용도에 따라 보존료, 살균제, 산화방지제, 착색료, 발색제, 표백제, 조미료, 감미료, 착향료, 팽창제, 강화제, 개량제, 유화제, 증점제(호료) 및 안정제, 피막제, 겔 기초제, 소포제, 용제, 이형제, 방충제, 품질개량제와 기타 식품제조용 첨가제 등으로 분류되어 쓰이고 있다.
- [0047] 상기 식품첨가제의 형태는 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 액상 형태를 포함할 수 있으며 구체적으로는 캡슐의 형태일 수 있으나, 상기 형태에 제한되는 것은 아니다.
- [0048] 본 발명의 피페리린을 식품용 조성물로 사용할 경우, 상기 피페리린을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용하고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 상기 피페리린의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 개선, 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 또 다른 목적은 후추 추출물로부터 피페리린을 분리하는 단계를 포함하는, 조골세포의 분화 조절용 조성물 제조방법에 관한 것이다.
- [0050] 본 발명에서 “후추(*Piper nigrum*)”는 매운맛을 내는 대표적인 향신료로, 인도 남부지역이 원산지이다. 한방에서 후추는 소화불량, 구토, 이질 등을 치료할 때 사용되며 음식의 독을 풀어주고 혈액순환을 촉진시켜 뭉친 피를 돌게하는 효과가 있다고 알려져 있다. 후추는 다양한 알칼로이드성 방향족 화합물을 포함하고 있으며, 다양한 종류의 후추에 공통으로 들어있는 활성 성분인 피페린은 항산화효과, 위액분비, 촉진, 장속의 가스제거에 효과가 있으며, 항암 효과도 우수한 것으로 알려져 있다.
- [0051] 상기 피페리린은 후추 추출물의 단독 또는 혼합 용매로 추출하여 수득된 것일 수 있고, 당해 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다.
- [0052] 구체적으로, 상기 후추 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 무수 또는 저급 알코올, 상기 물과 저급 알코올의 혼합 용매, 아세톤, 1,3-부틸렌글리콜, 에틸아세테이트, 클로로포름으로 이루어진 군에서 선택되는 1 종 이상의 단독 또는 혼합 용매로 추출하여 수득한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0053] 또한, 상기 '추출물'은 상기 후추 추출물뿐 아니라 상기 추출액의 회석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다.
- [0054] 상기 후추 추출물은 상기 후추의 천연, 잡종 또는 변종 식물로부터 추출될 수 있고, 식물 조직의 배양물로부터

도 추출이 가능하다.

[0055] 본 발명의 추출물을 추출하는 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 상기 추출 방법의 비제한적인 예로는, 열수 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2 종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다.

[0056] 본 발명에서 열수 추출 또는 냉침 추출한 추출물은 부유하는 고체 입자를 제거하기 위해 여과, 예를 들어 나일론 등을 이용해 입자를 걸러내거나 냉동여과법 등을 이용해 여과한 후, 그대로 사용하거나 이를 동결건조, 열풍 건조, 분무건조 등을 이용해 건조시켜 사용할 수 있다.

[0057] 본 발명의 일 실시예에서 후추의 추출물로부터 피페리린을 수득하여, 조골세포의 세포사멸, 부착, 이동 및 분화 관련된 기전을 살펴본 결과, 세포사멸을 촉진시키고, 부착, 이동 및 분화를 조절할 수 있음을 확인하였다. 이는 상기 후추로부터 피페리린을 분리하여 조골세포 기능 조절, 예컨대 분화 조절 용도로 다양하게 활용할 수 있음을 시사한다.

발명의 효과

[0058] 본 발명의 피페리린을 포함하는 조성물은 우수한 조골세포의 세포사멸, 이동 및/또는 분화 조절 효과를 구현할 수 있으므로, 이와 관련된 골 질환 치료 또는 예방 용도로 활용할 수 있다. 또한 상기 피페리린은 식품 산업에서 사용되는 안전한 향료로서, 부작용을 최소화하면서도 골 질환 개선 효과를 향상시킬 수 있다.

[0059] 본 발명의 효과는 상기 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1은 피페리린(piperine)의 구조 및 분리 모식도를 나타낸 것이다(A: 피페리린 구조, B: 피페리린 분리 모식도).

도 2는 피페리린 구조 확인을 위한 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 피페리린 1, 10, 30 및 100 μ M 처리 후 조골 전구세포(pre-osteoblasts)에서의 세포 생존력 분석 결과를 나타낸 것이다(A: 24 시간 처리 후, B: 48시간 처리 후, C: 위상차 현미경 관찰).

도 4는 피페리린의 조골 전구세포에서의 세포사멸(apoptosis) 유도 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 피페리린의 TUNEL 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 피페리린의 자가포식(autophagy) 경로 관련 효과를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 피페리린의 조골 전구세포의 부착 억제 효과를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 피페리린의 조골 전구세포의 세포 이동 여부를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 피페리린의 조골 전구세포에서 Src/FAK 및 MAPK 신호전달에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 피페리린의 조골 전구세포에서의 분화 억제 효과를 분석한 결과를 나타낸 것이다(A: ALP 염색 수준 측정, B: 광학 현미경 관찰, C: ALP 활성 측정, D: Smad1/5/8 단백질의 인산화 여부 확인).

도 11은 피페리린의 조골 전구세포에서의 ALP, OPN 및 OCN을 암호화하는 유전자의 발현량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] 이하, 첨부된 도면을 참고하여 본 발명의 실시예에 관하여 상세히 서술하나, 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0062] 제조예 1. 피페리린(piperine)의 분리

[0063] 후추 10 kg을 취하여 분쇄한 후 100 L 용량의 스테인리스 통에 넣고 MeOH만을 가하여 2일 동안 3회에 걸쳐 상온 교반 추출하였다. 추출액을 No. 2 여과지를 이용하여 여과한 후, 얻어진 여액을 감압 농축하여 MeOH 추출물

417.35 g을 얻었다. MeOH 추출물 417.3 g에 D.W. 1.2 L를 가하여 현탁한 후 CHCl_3 , EtOAc 및 *n*-BuOH을 각각 12 L, 10 L 및 2 L씩 첨가하여 순차적으로 분획하였으며, CHCl_3 분획물 274.58 g을 얻었다. 전체 CHCl_3 분획물 274.58 g 중 169 g을 취한 후 1차 증류수 1 L를 넣어 현탁시켰다. 다음 Diaion 정제하기 위하여 컬럼 내의 Diaion HP-20을 H_2O 로 완전히 평형화 시킨 후 시료를 충전하였으며 d- H_2O (제거), 50%(10 L), 70%(15 L), 80%(20 L) 및 100% EtOH(20 L)의 용매를 순차적으로 용출하여 각 분획물을 얻었다. Diaion C.C.(column chromatography)를 거친 후 얻어진 70% EtOH 분획물을 추가정제를 위하여 SiO_2 C.C.를 실시하였으며 70-230 메쉬(mesh)를 사용하여 Hx : Acetone : MeOH = 10 : 1 : 0.02에서 100% 아세톤까지 순차적으로 용출하여 26 개의 분획을 얻었다. 상기 26 개의 분획물 중 19번 분획을 Hx 및 Acetone 혼합용액을 이용하여 침전시킨 후 상층을 제거하였으며, 최종적으로 피페리린 21.0 mg을 확보하였다(도 1 및 도 2).

[0064] 백색 분말; 전자 이온화 질량 분석기 (EI-MS) m/z 271 $[\text{M}]^+$, 분자식 $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_3$; ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.41 (1H, dd, $J=14.9, 10.0$ Hz, H-3), 6.96 (1H, brs, H-6'), 6.87 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-2'), 6.76 (1H, m, H-3'), 6.74 (1H, m, H-4), 6.73 (1H, m, H-5), 6.23 (1H, d, $J=14.6$ Hz, H-2), 5.95 (2H, s, H-7'), 3.54 (2H, m, H-1'), 3.54 (2H, m, H-4'), 1.96 (2H, m, H-3'), 1.85 (2H, m, H-2'); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 165.1 (C-1), 148.3 (C-5'), 148.3 (C-4'), 142.0 (C-3), 138.9 (C-5), 131.1 (C-1'), 125.3 (C-4), 122.8 (C-2'), 121.5 (C-2), 108.7 (C-3'), 105.8 (C-6'), 101.4 (C-7'), 46.7 (C-1'), 46.1 (C-4'), 26.3 (C-3'), 24.5 (C-2').

[0065] 제조예 2. 조골 전구세포 MC3T3-E1 세포 배양 및 조골세포 분화

[0066] American Type Culture Collection (ATCC) (VA, Manassas, VA)에서 구매한 조골 전구세포 MC3T3E-1 세포(#CRL-2593)는 바이오평가센터 (한국생명공학연구원)에서 제공하였다.

[0067] 상기 세포를 10% 소 태아 혈청(FBS), 페니실린(100 단위/mL) 및 스트렙토 마이신(10 g/mL)이 보충 된 L- 아스코르브산 (WELGEME, Inc., 대한민국)없이 α -최소필수배지(α -minimum essential medium)에서 37 °C, 5 % CO_2 및 95 % 공기의 습한 대기에서 배양하였다.

[0068] 조골 세포의 분화는 50 g/mL L-아스코르브산 및 10 mM β -글리세로포스페이트 (Sigma-Aldrich, MO, St. Louis, MO)를 함유하는 골형성보충배지(osteogenic supplement medum, OS)를 변화시킴으로써 유도되었다. 배양 기간 동안 배지를 2 일마다 교체하였다. 상기 피페리린을 100% DMSO에 용해시켰다. 180% 비히클 대조군으로서 0.1% DMSO의 최종 농도로 사용하였다.

[0069] 실험예 1. 피페리린의 세포 독성 및 형태학적 변화(morphological changes) 확인

[0070] 세포 생존율은 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) 분석법을 사용하여 NADH-의존적 탈수소효소(NADH-dependent dehydrogenase aactivity) 활성을 검출하였다.

[0071] 인산염 완충 식염수(PBS) 중의 MTT 용액을 세포에 첨가한 다음, 3 시간 동안 배양하여 MTT가 포르마잔(formazan)으로 대사되도록 하였다. 100% DMSO(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 를 사용하여 가용화 후, Thermo Scientific Multiskan GO 마이크로플레이트 리더기(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 540 nm 의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0072] 또한, 48시간 동안 피페리린으로 처리한 후 위상차 현미경(phase contrast microscopy)으로 관찰하였다.

[0073] 그 결과, 피페리린이 MC3T3E-1 세포주 증식에 유의한 영향을 주지 않음을 확인하였다 (도 3).

[0074] 실험예 2. 피페리린의 조골 전구세포에서 세포사멸(apoptosis) 유도 효과 확인

[0075] 조골세포의 전구세포에서 피페리린의 세포사멸 및 항-세포사멸 단백질의 발현 조절 효과를 확인하는 실험을 수행하였다.

[0076] 먼저, 세포를 빙냉(ice-cold) PBS로 2 회 세척하고, 프로테아제 억제제 혼합물 (0.1 mM PMSF, 5 mg/mL 아프로티닌, 5 mg/mL 펩스타틴 A, 및 1 mg/ml 키에스타틴)을 함유하는 20 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.4)에서 용해시켰다. 단백질 농도는 Bradford 시약 (Bio-Rad, Hercules, CA)을 사용하여 측정하였다. 동량의 용해물 20 μg 을 소듐도데실-폴리아크릴아미드겔 전기영동(SDS-PAGE)으로 분해하고, 이어서 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF) 막

(Millipore, Bedford, MA)으로 옮겼다. 그 후, 막을 실온에서 1 시간 동안 0.05 % 트윈 20 (TBST) 및 5 % 탈지유를 함유하는 $1 \times$ TBS로 차단하였다. 차단 후, 막을 각각의 1 차 항체와 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션하고, $1 \times$ TBST로 세척 한 다음, 희석된 HRP(horseradish peroxidase)-접합된 2차 항체 (1 : 10,000, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)를 실온에서 2시간 동안 세척한 후, 강화된 화학 발광(enhanced chemiluminescence, ECL) 키트(Millipore, Bedford, MA)를 사용하여 결합된 항체를 검출하였다.

[0077] 그 결과, 피페리린 처리시 항-세포사멸 단백질인 서바이빈(survivin) 및 Bcl-2의 발현 수준은 감소된 반면(도 4A), 세포사멸 단백질인 Bax-2의 발현은 상향 조절되고, procaspase-3 및 폴리(ADP-리보스) 폴리머레이즈(PARP)의 절단이 유도됨을 확인하였다(도 4B).

[0078] 또한, DNA 가닥 절단 및 단편화를 감지하기 위하여, TUNEL(transferase-mediated FITC-Dudp nick-end labeling) 분석을 수행하였다. TUNEL 분석은 제조사의 지시에 따라 in situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)를 사용하여 수행하였다. 4'6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI) (Sigma-Aldrich) 염색의 경우, 세포를 암실에서 15분 동안 실온에서 인큐베이션 하였다. 공초점 현미경(K1-Fluo 공초점 레이저 주사 현미경, 대한민국)을 사용하여, TUNEL-양성 및 DAPI-염색 세포를 관찰하였다.

[0079] 그 결과, 피페리린 처리시 TUNEL-양성 및 DAPI-염색된 세포, 즉 아폽토틱 세포(apoptotic cell)는 현저히 증가하였으며(도 5), 이와 같은 결과는 피페리린이 조골 전구세포에서 세포사멸 관련 단백질 조절을 통해 프로그래밍된 세포 죽음 조절에 중요한 역할을 함을 시사한다.

[0080] 실험예 3. 피페리린의 자가포식(autophagy) 효과 확인

[0081] 피페리린이 세포 사멸의 다른 모드에 영향을 미치는지 여부를 조사하기 위해 Becilin 1(초기 단계), Atg 시스템(접합 단계) 및 미세 소관 관련 단백질 경쇄 3(LC3) 전환을 탐지하여 자가포식 경로를 조사하였다.

[0082] 상기 자가포식 경로 관련 단백질 발현 측정 방법은 실험예 2의 웨스턴 블롯 방법과 동일하다.

[0083] 그 결과, 피페리린은 Becilin 1 발현 또는 Atg5, Atg12, Atg16L1, Atg7 및 Atg3을 포함하는 Atg 시스템에 유의한 영향을 미치지 않으며(도 6A), LC3I 에서 LC3II로의 전환에 인식 가능한 영향을 나타내지 않았는 바(도 6B), 이와 같은 결과는 피페리린이 자가포식 유동(flux)과는 관련이 없음을 시사한다.

[0084] 실험예 4. 피페리린의 세포 부착(cell adhesion) 및 이동(migration) 감소 효과 확인

[0085] 피페리린의 세포 부착 및 세포 이동에 대한 미치는 효과를 확인하기 위해, cell adhesion assay 및 cell migration assay로 분석을 수행하였다.

[0086] 먼저, 세포 부착에 영향을 미치는지 확인하기 위해 매트릭젤(Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA) 50 μ L를 96 웰 배양 플레이트에 붓고 37 °C에서 1 시간 동안 고화시켰다. 세포를 피페리린의 부재 및 존재하에 1 일 동안 배양 한 후, 세포를 96 웰 플레이트에 분주하고, 37℃, 5 % CO₂ 및 95 % 공기의 습한 대기에서 부착되게 하였다. 접착성 세포를 1% SDS와 함께 웰에서 밤새 배양함으로써 용해시켰다. Multiskan GO 마이크로플레이트 분광 광도계(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0087] 또한, 세포사멸이 조골 전구세포의 이동에 영향을 미치는지 확인하기 위해 wound-healing assay를 사용하여 세포 이동을 평가하였다. 세포를 5 웰 배양 플레이트에 분주한 뒤, 37℃, 5% CO₂ 및 95% 공기의 습한 대기에서 24 시간 동안 90% 컨플루언스(confluence) 되도록 성장시켰다. 세포를 200 μ L 피펫 팁으로 감고, $1 \times$ PBS로 세척하여 세포 잔해물을 제거한 다음 피페리린의 부재 및 존재하에 24시간 동안 배양하였다. 광학 현미경을 이용하여 세포 이동 속도를 정량화하기 위해 세포 이미지를 비교하였다.

[0088] 그 결과, 피페리린 처리시 부착성 세포의 수가 현저히 억제되고(도 7), 조골 전구세포의 이동이 유의적으로 억제됨을 확인하였다(도 8). 상기 결과는 피페리린이 조골 전구세포의 세포 부착 및 이동 억제에 효과적인 물질임을 보여준다.

[0089] 실험예 5. 피페리린의 조골 전구세포에서 Src/FAK 및 MAPK 신호전달 효과 확인

[0090] 비수용 티로신 키나아제(non-receptor tyrosine kinase, Src)/초점 접착 키나아제(focal adhesion kinase, FAK)는 세포 부착, 이동 및 세포사멸에서 중요한 역할을 하는 점을 고려하여, 상기 신호전달 경로를 분석하였다. 상기 Src/FAK 신호전달 경로 관련 단백질 발현 측정 방법은 실험예 2의 웨스턴 블롯 방법과 동일하다.

[0091] 또한, 조골 전구세포를 1시간 동안 PBS 중에 희석된 3% BSA로 차단하고 4℃에서 밤새 특정 일차 항체와 함께 배

양하였다. 이어서 세포를 실온에서 2시간 동안 Alexa-Fluor 488(1 : 500 희석, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 표지된 항-토끼 이차 항체와 함께 배양하였다. 그 후, 세포를 DAPI(Sigma-Aldrich)로 염색하고 3회 세척하고 유리 슬라이드에 장착한 후 공초점 현미경(K1-Fluo Confocal Laser Scanning Microscope, 대한민국)으로 시각화하였다.

[0092] 그 결과, 피페리린의 처리는 Src 및 FAK의 탈인산화를 증가시키고, 매트릭스 메탈로프로테이나제2(matrix metalloproteinase, MMP2)의 발현을 하향조절 시켰으며, 또한 Src/FAK 신호전달의 하류 표적 단백질인 ERK1/2 및 p38을 포함하는 MAK 키나아제에 대해 우수한 억제 활성을 보여주었다(도 9). 이는 상기 피페리린이 조골 전구세포에서 Src/FAK 신호전달 경로를 통해 세포 증식, 부착 및 이동을 억제할 수 있음을 보여준다.

[0093] **실험예 6. 피페리린의 조골세포 분화(differentiation) 억제 효과 확인**

[0094] 조골 전구세포의 분화에 대한 피페리린의 영향을 조사하기 위해 상기 제조예 2에서와 같이 조골세포 분화를 유도하였다.

[0095] 조골세포 분화는 알칼리성 포스파타제(Alkaline phosphatase, ALP) 염색세포분석, 디지털 카메라 및 비색 검출기를 사용하여 관찰하였다. 우선 조골 전구세포를 1 X PBS로 세척한 다음, 실온에서 15분 동안 10% 포르말린(formalin)에 고정시켰다. 증류수로 세척한 후 제조업자의 프로토콜(Takara Bio Inc., Japan)에 따라 세포를 37℃에서 45분 동안 ALP의 반응을 위해 기질 용액과 함께 배양하였다. ALP 염색은 디지털 카메라 및 비색 검출기(colorimetric detector) (ProteinSimple Inc., Santa Clara, CA)로 측정하였다.

[0096] 알칼리성포스파타제 활성 비색 분석 키트(Biovision, Milpitas, CA)를 사용하여 세포 용해물을 수득하였다. Multiskan GO 마이크로플레이트 분광 광도계(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0097] 그 결과, 피페리린 처리시 조골세포 분화 관련 마커인 ALP 효소 활성이 현저히 감소하였으며(도 10), 이는 피페리린이 조골세포 분화 억제와 관련하여 우수한 효과가 있음을 보여준다.

[0098] 또한, 조골세포 분화 관련된 주요 신호전달 분자인 Smad1/5/8 단백질의 인산화 및 조골세포 분화의 주요 전사인자인 RUNX2의 발현량을 확인하였으며, 추가로 조골세포 분화 관련 마커인 ALP, 오스테오폰틴(osteopontin, OPN) 및 오스테오칼신(osteocalcin, OCN)을 암호화하는 유전자의 발현량을 확인하였다.

[0099] 그 결과, 피페리린의 처리는 Smad1/5/8 단백질의 인산화를 감소시키고, RUNX2의 발현을 하향조절시켰다(도 10D). 아울러, ALP, OPN 및 OCN을 암호화하는 유전자의 발현 또한 효과적으로 억제하였는 바(도 11), 이는 피페리린이 조골 전구세포에서 Smad1/5/8 및 RUNX2 신호전달 경로를 조절함으로써 조골세포의 분화를 억제할 수 있음을 보여준다.

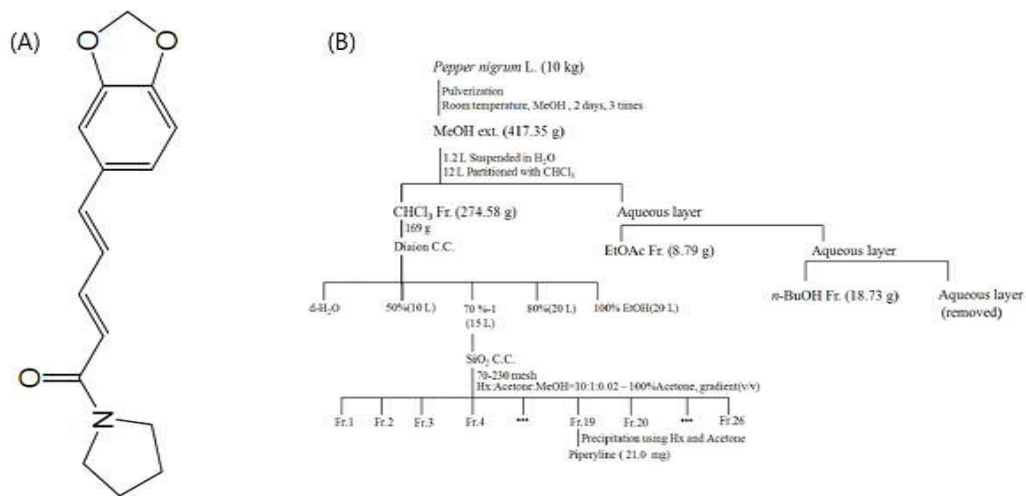
[0100] 상기 결과를 통해, 피페리린이 조골 전구세포에서 Src/FAK 및 MAPK 신호경로 조절으로써 조골세포의 세포사멸, 부착 및 이동을 조절할 수 있고, Smad1/5/8 및 RUNX2 관련 신호 경로를 통해 조골세포 분화를 감소시킬 수 있음을 확인하였다. 이는 피페리린이 조골 전구세포의 생존, 부착, 이동 및/또는 조골세포 분화에서 약리학적, 생물학적 역할을 한다는 것을 입증한 것으로, 피페리린을 골 질환, 예컨대 조골 세포 기능 이상으로 인한 골 질환 치료에 활용할 수 있음을 시사한다.

[0101] 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.

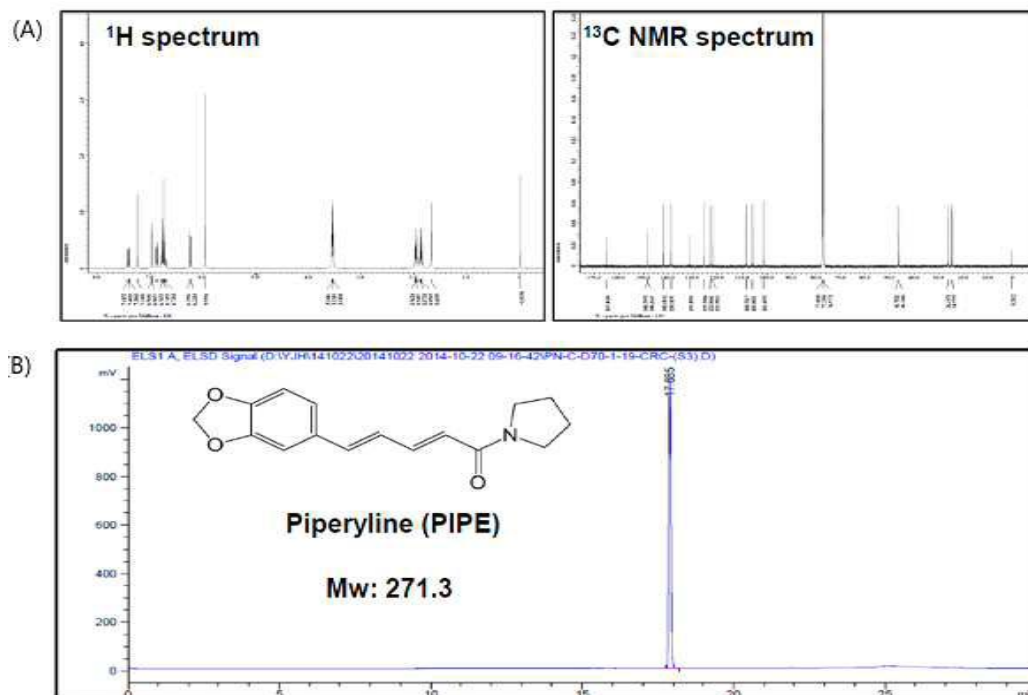
[0102] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

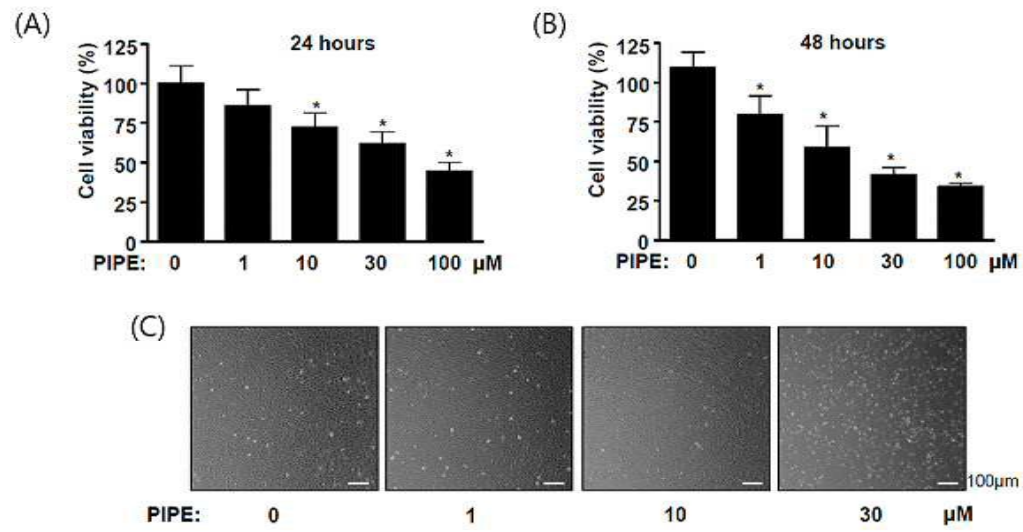
도면1



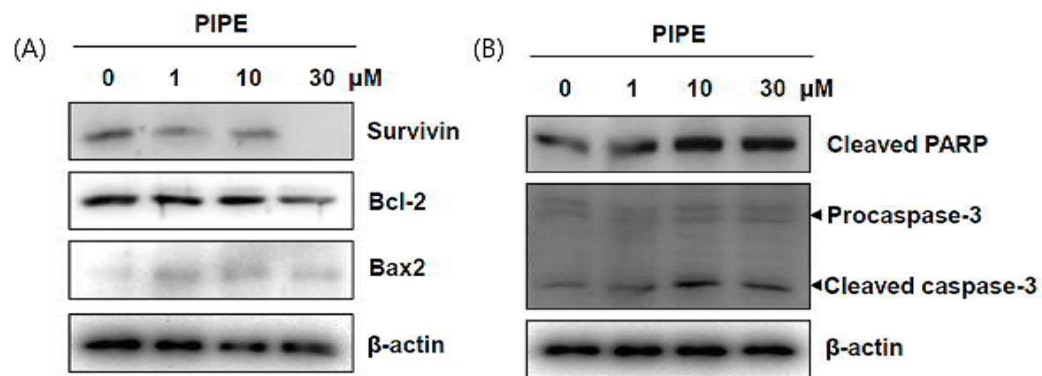
도면2



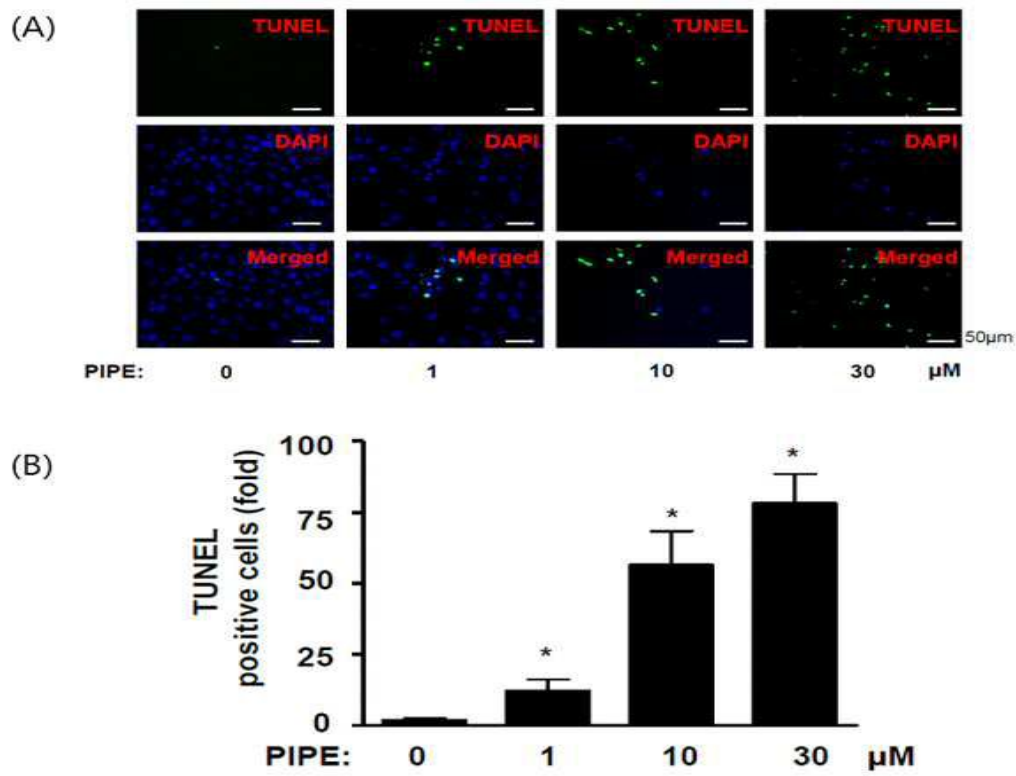
도면3



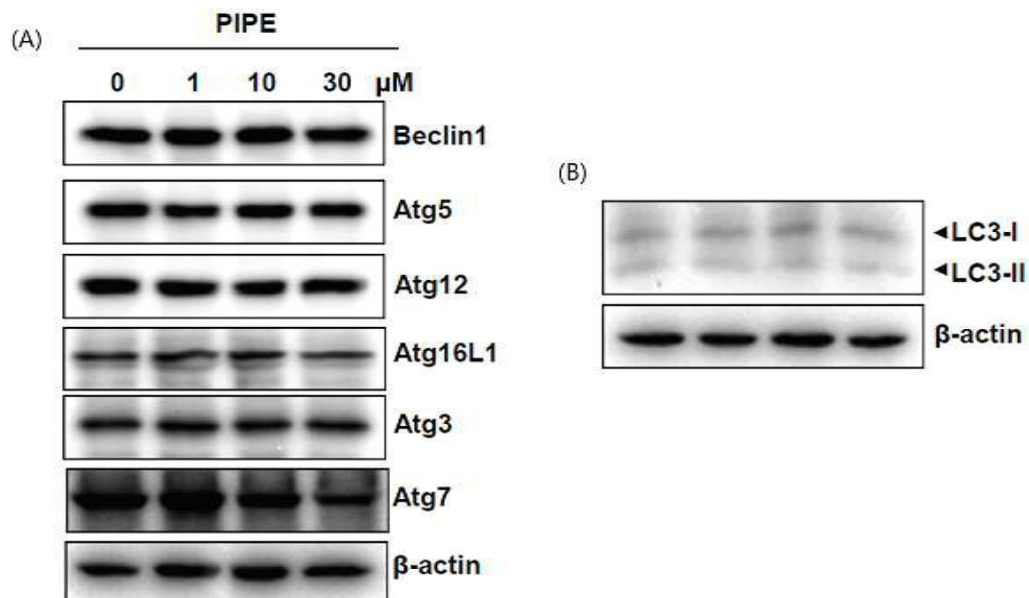
도면4



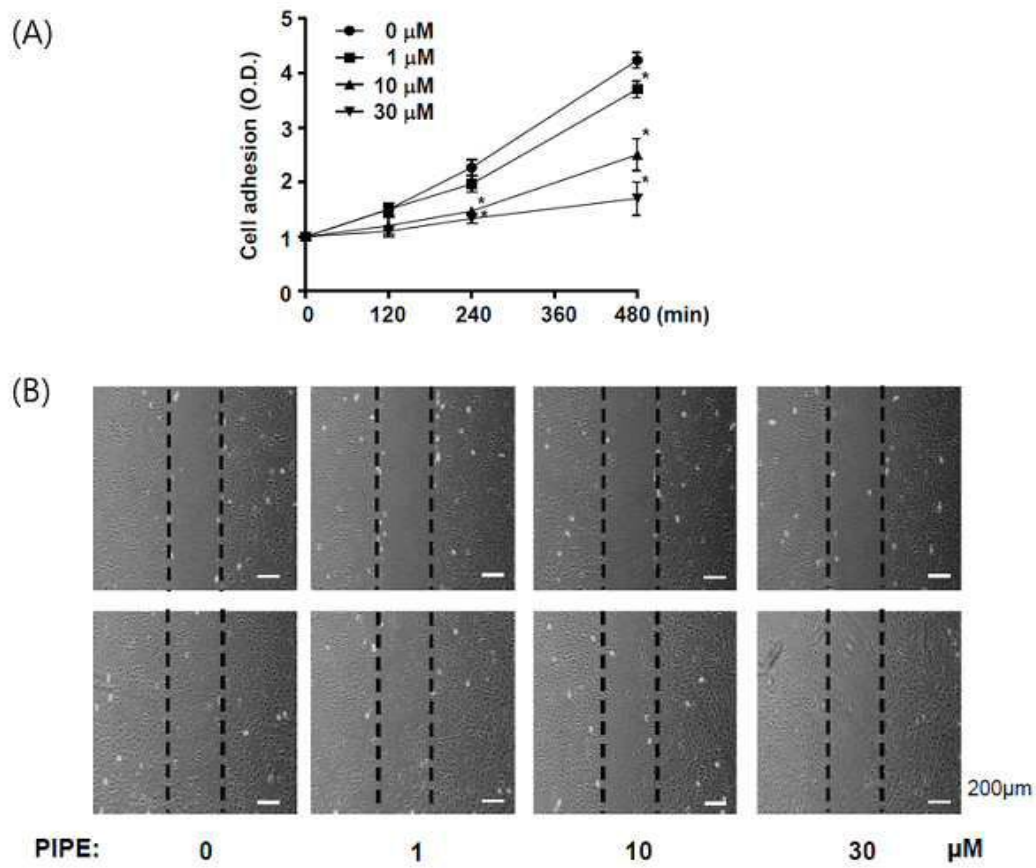
도면5



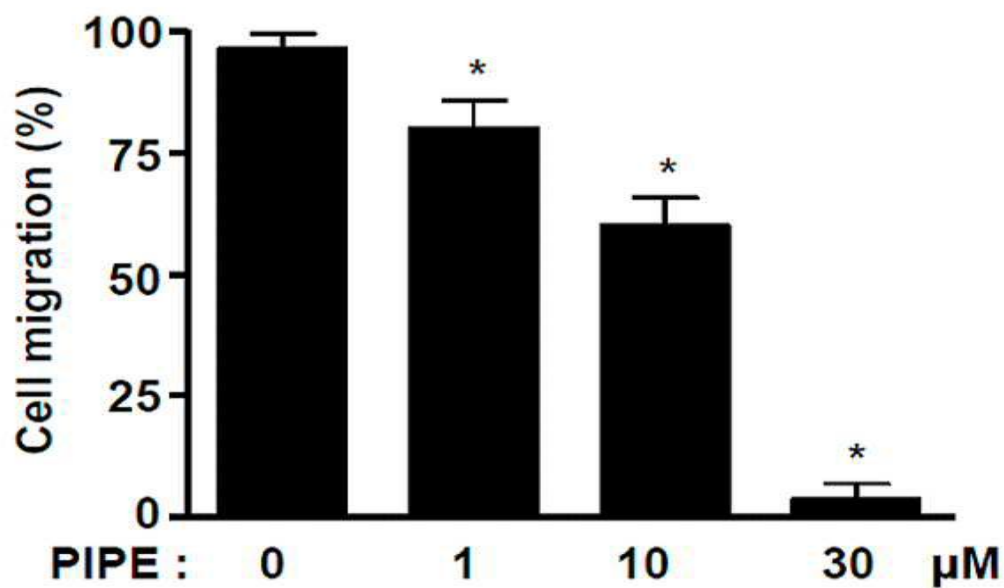
도면6



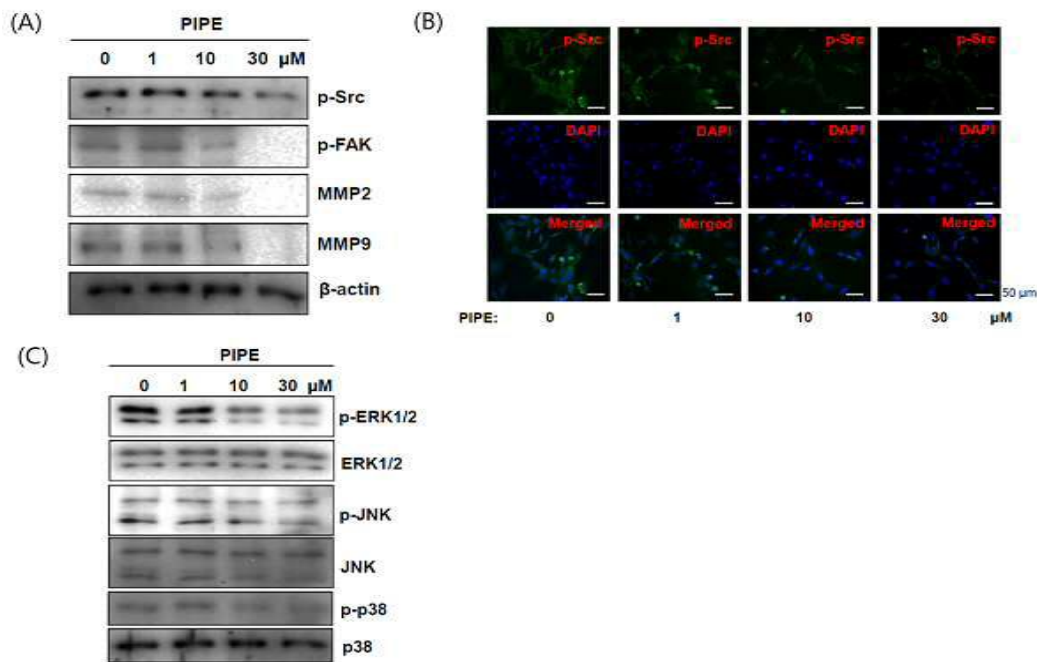
도면7



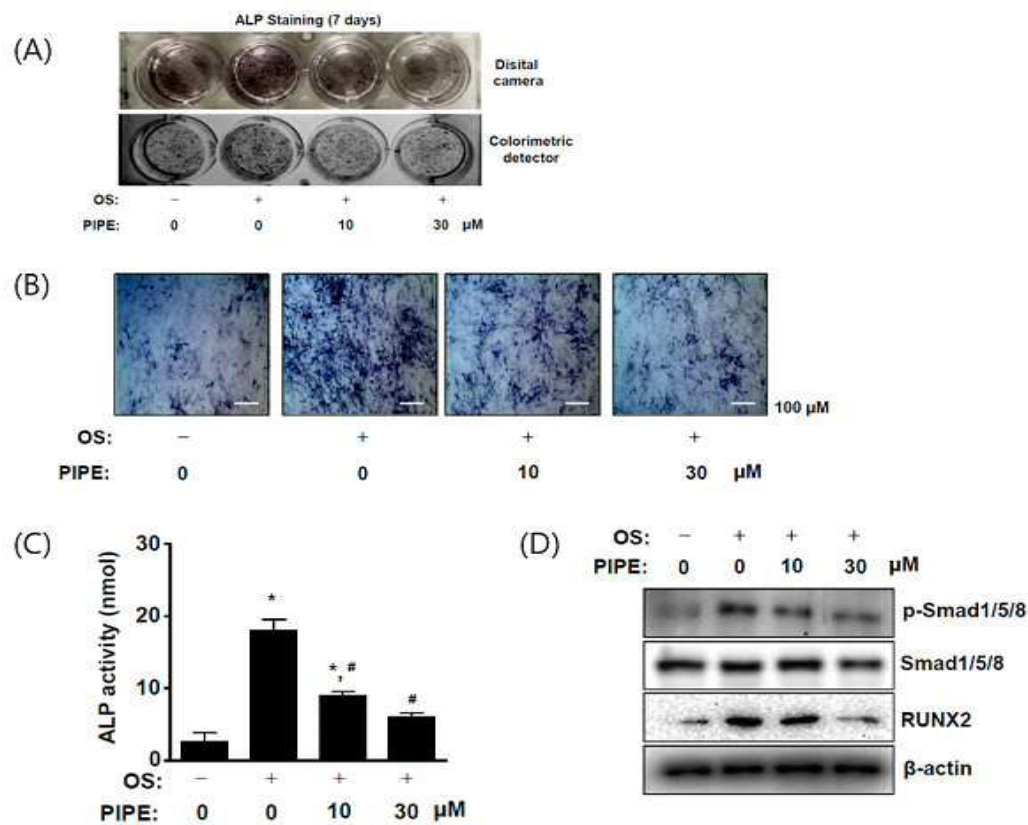
도면8



도면9



도면10



도면11

