

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0038411

(43) 공개일자 2020년04월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/17 (2006.01) *A23L 33/17* (2016.01)*A61P 19/08* (2006.01) *A61P 19/10* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/1709 (2013.01)*A23L 33/17* (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0116679

(22) 출원일자 2019년09월23일

심사청구일자 2019년09월23일

(30) 우선권주장

1020180117693 2018년10월02일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

차의과학대학교 산학협력단

경기도 포천시 해룡로 120, 차의과학대학교내 (동교동)

(72) 발명자

신민정

서울특별시 강남구 영동대로 230, 3동 101호 (대치동, 우성1차아파트)

김현수

서울특별시 노원구 중계4동 131번지

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영, 장제환

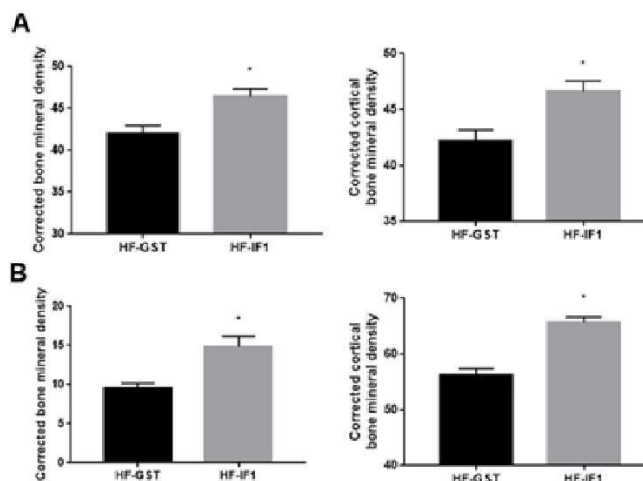
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 뼈의 길이 및 강도 증가에 따른 골성장 및 골강화 효과를 가지는 IF1을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 식품에 관한 것이다. 본 발명에 따른 IF1 (ATPase inhibitory factor 1)은 비만이 유발된 마우스 또는 난소 절제 마우스에서 부작용 없이 골길이 증가, 골구조 변화 및 골강도 증가 효과를 나타내므로, 골다공증 등의 골질환의 예방, 개선 또는 치료제로 매우 유용하다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61P 19/08 (2018.01)

A61P 19/10 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/306 (2013.01)

(72) 발명자

정인혁

경기도 고양시 덕양구 무원로 63, 1002동 1201호
(행신동, 무원마을10단지아파트)

정지형

서울특별시 강남구 영동대로 230, 3동 101호 (대치동, 우성1차아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 골길이 및 골강도를 증가시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 골질환은 골다공증 (osteoporosis), 성장기 발육부진, 골절, 골관절염, 파제트병 (Paget disease), 치주질환, 구루병, 골연화증 및 골형성 부전증으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 골다공증은 원발성 골다공증, 속발성 골다공증 또는 특발성 골다공증인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 개선용 식품.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 조성물은 골길이 및 골강도를 증가시키는 것을 특징으로 하는 식품.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 골질환은 골다공증 (osteoporosis), 성장기 발육부진, 골절, 골관절염, 파제트병 (Paget disease), 치주질환, 구루병, 골연화증 및 골형성 부전증으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 식품.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 골다공증은 원발성 골다공증, 속발성 골다공증 또는 특발성 골다공증인 것을 특징으로 하

는 식품.

청구항 10

제6항에 있어서, 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 뼈의 길이 및 강도 증가에 따른 골성장 및 골강화 효과를 가지는 IF1을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 골대사는 골흡수와 골생성의 반복에 의해 구성되며 골량은 이 두 과정에 의해 결정된다. 그러나, 여성 호르몬의 결핍이 나타나면 이런 골의 재형성 과정에 관여하는 조골세포와 파골세포에 직접, 간접적으로 영향을 미쳐 골손실을 유발한다. 골생성에 비하여 골흡수가 많아지면 골다공증의 원인이 되고, 이는 골절의 위험성을 높인다.

[0004] 골질환 중 고령사회에서 큰 문제로 대두되고 있는 골다공증은 골강도의 약화로 골절의 위험성이 증가하는 골격계 질환이며, 골강도는 골밀도와 골질에 의해 결정된다. 골밀도는 가장 높은 뼈질량 수치와 뼈손실의 양에 의해 결정되고, 골의 구조, 골 교체율, 미세손상 축적, 무기질화 등으로 알 수 있다. 골다공증은 1차성 (원발성) 골다공증과 2차성 (속발성) 골다공증으로 분류되며, 1차성 골다공증은 폐경 후 골다공증과 노인성 골다공증으로 나뉜다. 2차성 골다공증은 특정 질병이나 수술, 약물 치료 등에 의해 골량의 형성장애가 있거나 골소실이 증가되는 경우에 발생한다. 대표적인 원인으로 스테로이드 투여, 성선기능저하증, 켈리악병 등이 있다(NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH: Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy NIH Consensus Statement 17, 1, 2000).

[0005] 현재 골다공증 치료제로 사용되고 있는 물질로는 에스트로겐(estrogen), 남성화 스테로이드 호르몬 (androgenic anabolic steroid), 칼슘 제제, 인산염, 불소 제제, 이프리플라본 (Ipriflavone), 비타민 D₃ 등이 있다. 에스트로겐은 조골세포의 세포고사를 억제하여 세포의 생존기간을 증가시키고 파골세포의 세포고사를 촉진하여 세포의 생존기간을 감소시켜 폐경 증상의 치료와 골밀도 유지에 어느 정도 효과적인 방법이나 유방암, 자궁내막 증식증 등을 유발하는 부작용이 있다. 이러한, 기존 골다공증 치료약제들은 장기간 투여시 많은 부작용을 유발하고 있다. 따라서 장기간 투여에도 지속적인 골밀도 증가 효과를 나타내고 부작용이 적은 안전한 예방 및 치료제 개발이 요구되고 있다.

[0006] 한편, ATPase inhibitory factor 1 (IF1)은 미토콘드리아 내에서 ATP synthesis 합성 및 분해에 관여하는 미토콘리아막 효소인 F₁F₀ ATP synthase (multi-subunit, membrane-bound assembly)에 결합하여 ATP 분해를 저해함으로써 ATP 소모 (depletion)를 막음에 따라 세포사멸 (cell death)을 억제하는 것으로 알려져 있다 (G. Kroemer, *et al.*, *Immunol. Today*, 18(1), 44-51, 1997). 여러 종류의 세포의 세포막에는 β -F₁-ATPase (F₁ catalytic subunit of this enzyme) 존재하며, 골 세포막에도 ATPase가 존재한다고 보고되어 있다 (Yonally, S. K., & Capaldi, R. A., *Mitochondrion*, 6(6), 305-314, 2006). IF1은 세포막에서 β -F₁-ATPase에 결합함으로써 세포내 신호체계를 유발하고 이를 통해 생체반응을 유발한다. 즉, IF1은 세포막 (plasma membrane)의 F₁-ATPase subunit과의 결합을 통해 ATP 가수분해를 저해함으로써 결과적으로 세포외액의 ATP (extracellular ATP, exATP) 양을 증가시키고, 이렇게 증가된 exATP는 세포막의 퓨린성 수용체와 반응하여 퓨린성 신호전달을 통해 여러가지 유용한 세포내 반응을 유도하게 된다. 골전환 (bone turnover)에서도 퓨린성 신호전달이 중요한 것으로 알려져 있다 (Wang, Ning, *et al.*, *Molecular endocrinology* 26.1, 142-152, 2012).

[0007] 이에, 본 발명자들은 부작용이 없고 효과가 우수하여 기존 치료제의 한계점을 보완할 수 있는 골질환 치료제를 개발하고자 예의 노력한 결과, IF1 재조합 단백질 투여에 의해 마우스의 골길이 및 골강도가 증가하고 골구조가

변하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 뼈의 길이 및 강도 증가에 따른 골성장 및 골강화 효과를 나타내는 IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 식품을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 개선용 식품을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 IF1 (ATPase inhibitory factor 1)은 비만이 유발된 마우스 또는 난소 절제 마우스에서 부작용 없이 골길이 증가, 골구조 변화 및 골강도 증가 효과를 나타내므로, 골다공증 등의 골질환의 예방, 개선 또는 치료제로 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 IF1 처리에 의한 조골세포에서 세포독성을 측정한 것으로, 48시간까지 상대적 세포 생존율을 측정한 것이다. * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and *** $p < 0.0001$ compared with each control group.

도 2는 IF1 처리에 의한 시간별 세포외액 ATP 방출도를 나타낸 것이다. * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with each control group.

도 3은 IF1 처리에 의한 조골세포의 증식 및 분화촉진과 파골세포에의 효과를 나타낸 것으로, (A) 세포형태의 변화, (B) 세포수의 변화, (C) 석회화 정도(Alizarind red S 염색결과)를 나타낸다. * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ compared with each control group normalized by body weight.

도 4는 IF1 처리에 의한 마우스의 골길이 증가를 Micro-CT 촬영으로 측정한 것으로, (A) 우측 대퇴골 길이 (mm), (B) 대퇴골 AP (Anterior-posterior) 직경 (cm), (C) 대퇴골 ML (Medial-lateral) 직경 (cm), (D) 우측 경골 길이 (cm), (E) 경골 AP 직경 (cm), (F) 경골 ML 직경 (cm)을 나타낸다. 각각의 값은 두 그룹 (n=15)의 평균 SE값을 나타냄. * $P < 0.05$ compared with each control group normalized by body weight.

도 5는 IF1 처리 마우스의 골강도 및 골구조의 변화를 BMA (Bone microarchitecture analysis)를 통해 분석한 것으로, (A) 총 부피량 (mm^3), (B) 골 표면적 (mm^2), (C) 내피 피질 경계면 (Endocortical perimeter) (mm), (D) 총 단면적 (Total cross-sectional area) (mm^2)을 나타낸다. 각각의 값은 두 그룹(n=15)의 평균 SE값을 나타냄. * $P < 0.05$ compared with each control group.

도 6은 Micro-CT를 이용하여 IF1 처리에 의한 마우스에서 골구조 및 질량 변화를 관찰한 것으로, (A) 고지방식이 대조군 및 (B) 고지방식이 + IF1 투여 실험군의 뼈 직경 및 단면적을 확인한 것이다.

도 7은 IF1 처리에 의한 난소 절제 모델 마우스의 골강도 및 골구조의 변화를 BMA (Bone microarchitecture analysis)를 통해 분석한 것으로, (A) 총 부피량 (mm^3), (B) 총 단면적 (Total cross-sectional area) (mm^2), (C) 내피 피질 경계면 (Endocortical perimeter) (mm), (D) 섬유주 두께 (mm)를 나타낸다. 각각의 값은 두 그

룹(n=8)의 평균 SE값을 나타냄. * $P < 0.05$ compared with each control group.

도 8은 IF1 처리에 의한 마우스의 골밀도 변화를 BMA (Bone microarchitecture analysis)를 통해 분석한 것으로, (A) 비만 모델, (B) 난소절제 모델 마우스의 BMD와 cortical BMD값을 체중으로 보정한 값을 나타낸다. 각각의 값은 두 그룹 (비만 모델) (n=15), (난소절제 모델) (n=8)의 평균 SE값을 나타냄. * $P < 0.05$ compared with each control group.

도 9는 IF1 처리에 의한 골관절염 예방효과를 Safranin O & Fast green 염색을 통해 분석한 것으로, 각 그룹별 (Sham, GST 대조군, IF1 실험군) 대표 이미지를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0019] ATPase inhibitory factor 1 (이하 IF1)은 84개 아미노산으로 이루어진 9.6-kDa basic 단백질이고, *ATP5IF1* 유전자에 의해 암호화된다. ATPase는 F0, F1 domain과 central, peripheral stalk로 구성되며 여러 subunit으로 세분화된다. IF1은 ATPase의 기능을 방해하는 주요한 단백질로서 인체 내에서 자연적으로 생성되어 미토콘드리아에 의한 ATP 생성 및 분해를 조절하는 타겟으로서 많은 연구가 이루어져 있다 (Campanella *et al.*, *Cell Metab.*, 8:13-25, 2008). IF1의 inhibition 작용은 ATPase의 α subunit, β subunit 부위에 결합함으로써 회전 운동을 방해하여 시작된다. IF1이 세포막 (plasma membrane)에 위치하는 F1-ATPase subunit과 결합하고, 이때 F1-ATPase 활성 조절로 ATP 가수분해가 억제됨으로 인해 세포외액의 ATP (extracellular ATP, exATP) 증가를 유발하며, exATP는 세포막의 퓨린성 수용체와 반응한 후 퓨린성 신호전달을 통해 여러 가지 유용한 세포내 반응을 유발하게 된다.
- [0020] 하지만, IF1의 골길이 및 골강도 증가 또는 골구조 변화와 관련된 기작은 전혀 알려진 바가 없다.
- [0021] 이에, 본 발명에서는 마우스 IF1 전체 mRNA 서열 (NCBI No. NM_007512.3)을 바탕으로 GST-tag를 포함한 IF1의 DNA data를 클로닝을 통하여 재조합 단백질 (서열번호 1)을 생산하고, 재조합 IF1을 비만 마우스 및 난소 절제 마우스 모델에 투여하여 IF1에 의한 골길이 및 골강도 증가 또는 골구조 변화 등의 골대사 지표들의 개선 효과를 확인하였다. 즉, ATPase inhibitory factor 1 (IF1)의 골질환 예방 및 치료 효과 및 골대사에 미치는 효과를 입증하였다.
- [0023] 따라서, 본 발명은 일관점에서 IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 골길이 및 골강도를 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 용어 "골질환"은 골밀도가 감소되어 일어나는 모든 질환을 의미한다. 예를 들어, 조골세포 및 파골세포의 불균형으로 인해 유발되어 골조직의 장애를 초래하거나 또는 골조직을 파괴하는 골대사 질환을 의미한다.
- [0026] 상기 골질환은 특별히 이에 제한되지 않으나, 골다공증(osteoporosis), 성장기 발육부진, 골절, 골관절염, 파제트병 (Paget disease), 치주질환, 구루병, 골연화증, 골형성 부전증, 구루병 (rickets), 골연화증 (osteomalacia), 척추측만증 (scoliosis), 골반변형 (pelvic deformity), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 부갑상선기능항진증 (hyperparathyroidism), 신부전 환자의 신성골이영양증, 염증성 치조골 흡수질환 및 염증성 뼈 흡수질환으로 구성된 군에서 선택된 질환일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 용어 "골다공증"이란, 뼈의 양이 감소하고 질적인 변화로 인해 뼈의 강도가 약해져서 골절이 일어날 가능성이 높은 상태를 의미하는데, 골조소증 또는 골소공증이라고도 한다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 골다공증은 원발성(原發性) 골다공증인 일차성 골다공증, 속발성(續發性) 골다공증인 이차성 골다공증 및 특발성 골다공증을 모두 포함하는 의미이다.
- [0029] 골다공증은 크게 일차성과 이차성 골다공증으로 나누며 일차성 골다공증은 제1형 골다공증(postmenopausal)과 제2형 골다공증(senile osteoporosis)으로 구분된다. 제1형 골다공증은 폐경 후 에스트로겐의 결핍이 주된 원인

으로 골흡수가 증가하면서 혈중 칼슘이 높아지고 이에 따라 부갑상선 호르몬의 분비가 감소되고, 따라서 장내의 칼슘 흡수가 낮아지는 결과로 발생하는 골다공증으로 50~65세의 여성에게 주로 발생하며, 소골에서 뼈의 손실이 발생하므로 척추와 손목에서 골절이 빈발한다. 제2형 골다공증은 65세 이후 남녀 노인에게 발생하는 골다공증으로, 발생기전은 장관내 칼슘 흡수가 줄고, 부갑상선 호르몬 분비가 많아져서 피질골의 손실이 증가되고 골아세포의 골형성이 감소되어 골다공증이 발생하는 것이다 (Roodman GD *et al*, *Advances in bone biology: the osteoclast*, *Endocrinol Rev* 17, 308-332, 1996) 제1형, 제2형에 의한 정상적인 생리적 골 손실 외에도 유전적인 소인, 그릇된 생활습관 등 환경적인 요인과 호르몬의 부족화 등이 복합적으로 작용하여 초래되는 질환으로 골다공증 환자의 대부분이 여기에 속한다. 반면, 이차성 골다공증은 다른 질환 또는 약물에 의해 오는 골다공증을 의미하며, 병적인 원인으로는 각종 내분비 질환에 의해 생기는 골다공증을 말한다 (Avioli LV *et al*, *The osteoporotic syndrome; Detection, prevention & treatment* 3rd ed Wielis, 1993).

- [0030] 골다공증에 의한 골절은 65세 이후의 노인에서 흔히 발생하며 넘어지는 정도의 가벼운 외상으로 발생하고 골절의 부위는 대퇴골의 경부나 전자부에 주로 발생하며 연령이 많을수록 전자부 골절이 많이 발생하며 다른 부위의 골절과는 달리 이환율과 사망률이 높고 치료가 어려운 골절이다.
- [0031] 본 발명에서 "골성장"이란 골(뼈)의 조직의 크기, 굵기, 밀도, 길이 또는 기능 증대의 일부 또는 전부를 포함하는 의미이다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 성장기 발육부진은 정상 변이 저신장증 또는 질병에 의해 2차적으로 오는 저신장증일 수 있다. 상기 정상 변이 저신장증은 가족성 저신장, 체질적 성장 지연, 협의의 특발성 저신장일 수 있다. 또한, 질병에 의해 2차적으로 오는 저신장증은 1차성 성장 장애 (내인성 장애) 또는 2차성 성장 장애 (외인성 성장 장애)일 수 있으며, 상기 1차성 성장 장애로는 골연골 이형성증, 염색체 이상 (다운 증후군 또는 터너 증후군)에 의한 저신장, 부당 경량아 (자궁 내 성장 지연), 프레더-윌리 증후군에 의한 저신장, 러셀-실버 증후군에 의한 저신장, 누난 증후군에 의한 저신장이 있으며, 상기 2차성 성장 장애로는 만성 전신성 질환에 의한 저신장, 성장호르몬 결핍증에 의한 저신장, 갑상샘 저하증에 의한 저신장, 쿠싱증후군에 의한 저신장, 정신사회적 왜소증이 있다.
- [0033] 본 발명의 "골관절염"은 연골조직의 손상에 의한 관절 질병, 특히 연골 기능의 손실이 수반되는 질병을 의미하며, 여러 가지 다른 명칭, 예를 들면 퇴행성 관절 질환, 골관절증, 비후성 관절염 또는 퇴행성 관절염 등으로 알려져 있다. 상기 골관절염은 손가락, 팔꿈치, 무릎 또는 발목과 같은 주요 관절에서의 연골 조직의 만성 진행성 파괴로 특징 지을 수 있다.
- [0034] 본 발명의 용어 "치주질환"이란 입안에 항상 존재하는 많은 세균에 의해 형성된 치태 (치면세균막, 플라그)와 치석이 염증을 일으켜 치주조직을 파괴하는 모든 질환을 의미한다. 상기 치주질환은 흔히 풍치라고도 하는데, 치은염 (gingivitis)과 치주염 (periodontitis)을 모두 포함하는 의미이다.
- [0035] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 본 발명의 IF1을 마우스에 투여한 경우, 골길이 증가 및 골강도가 증가하는 것을 확인하였으며, 골구조 및 구성 변화에도 영향을 미치는 것을 확인하였다. 이로써, IF1가 뼈의 길이 및 강도를 증가시킴에 따라 효과적으로 골성장 및 골강화 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.
- [0036] IF1의 치료 효과는 다양한 원인에 의하여 발생되는 골 관련 질환 뿐만 아니라 골대사 질환에도 동등하게 적용될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 용어 "예방"이란, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여로 골 관련 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0038] 본 발명의 용어 "치료"란, 본 발명의 약학 조성물을 투여함으로써, 골 관련 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0039] 상기 골질환 치료는 골 관련 질환이 발생할 수 있는 임의의 포유 동물에 적용이 가능하며, 그 예로 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등 가축을 제한없이 포함하나, 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물들의 투여 경로는 약물이 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비강내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 등이 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0041] 상기 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 본 발명의 용어 "약제학적으로 유효한 양"이란 의학적인 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명의 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.
- [0043] 본 발명의 약학조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중독도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물을 사람을 포함하는 포유동물에 하루 동안 10 내지 100 mg/kg, 보다 바람직하게는 10 내지 30 mg/kg으로 투여할 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 내지 3회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 약학적 조성물은, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 골질환 치료 또는 예방용 약학 조성물의 형태로 제조될 수 있는데, 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occurring carrier)를 포함할 수 있다.
- [0045] 구체적으로, 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0046] 본 발명에서, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 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 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0047] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.
- [0048] 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순희석제인 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.
- [0049] 의약 조성물은 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액으로서 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예, 트윈 80) 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형될 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매중의 멸균 주사용액 또는 현탁액(예, 1,3-부탄디올중의 용액)일 수 있다. 허용적으로 사용될 수 있는 비히클 및 용매로는 만니톨, 물, 링겔 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 불휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해, 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 어떠한 불휘발성 오일도 사용할 수 있다. 올레산 및 이의 글리세라이드 유도체와 같은 지방산이 약제학적으로 허용되는 천연오일(예, 올리브유 또는 피마자유), 특히 이들의 폴리옥시에틸화된 것과 마찬가지로 주사 제제에 유용하다.
- [0050] 본 발명의 의약 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다. 이들 조성물은 본 발명의 화합물을 실온에서 고형이지만 직장 온도에서는 액상인 적합한 비자극성 부형제와 혼합하여 제조할 수 있다. 이러한 물질로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 코코아 버터, 밀랍 및 폴리에틸렌 글리콜이 포함된다.
- [0051] 본 발명에 따른 의약 조성물의 비경구 투여는 목적하는 치료가 국소 적용으로 접근이 용이한 부위 또는 기관과

관련이 있을 때 특히 유용하다. 피부에 국소적으로 적용하는 경우, 의약 조성물은 담체에 현탁 또는 용해된 활성성분을 함유한 적합한 연고로 제형되어야 한다. 본 발명의 화합물을 국소 투여하기 위한 담체로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 광유, 유동 파라핀, 백색 와셀린, 프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌, 폴리옥시프로필렌 화합물, 유화 왁스 및 물이 포함된다. 다른 방도로서, 의약 조성물은 담체에 현탁 또는 용해된 활성 화합물을 함유한 적합한 로션 또는 크림으로 제형될 수 있다. 적합한 담체로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 광유, 솔비탄 모노스테아레이트, 폴리솔베이트 60, 세틸 에스테르 왁스, 세테아릴 알코올, 2-옥틸도데카놀, 벤질 알코올 및 물이 포함된다. 본 발명의 의약 조성물은 또한 직장 좌제에 의해 또한 적합한 관장제로 하부 장관으로 국소 적용할 수 있다. 국소 적용된 경피 패치가 또한 본 발명에 포함된다.

[0052] 본 발명의 의약 조성물은 비내 에어로졸 또는 흡입에 의해 투여할 수 있다. 이러한 조성물은 약제의 분야에 잘 알려진 기술에 따라 제조하며 벤질 알코올 또는 다른 적합한 보존제, 생체이용율을 증강시키기 위한 흡수 촉진제, 플루오로카본 및/또는 기타 본 분야에 알려진 가용화제 또는 분산제를 사용하여 염수중의 용액으로서 제조할 수 있다.

[0053] 본 발명의 약학 조성물에 포함된 상기 제제의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 최종 조성물 총중량을 기준으로 0.0001 내지 50 중량%, 보다 바람직하게는 0.01 내지 10 중량%의 함량으로 포함할 수 있다.

[0055] 본 발명은 다른 관점에서, IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 유효성분으로 함유하는 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 골질환의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

[0056] 본 발명은 또 다른 관점에서, IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 유효성분으로 함유하는 약학 조성물을 골질환의 예방 또는 치료에 사용하는 용도에 관한 것이다.

[0057] 본 발명은 또 다른 관점에서, 골질환의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 유효성분으로 함유하는 약학 조성물의 용도에 관한 것이다.

[0058] 본 발명의 용어 "개체"란 골질환이 이미 발병하였거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 조성물을 개체에게 투여함으로써, 상기 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.

[0060] 본 발명은 또 다른 관점에서, IF1 (ATPase inhibitory factor 1)을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 개선용 식품에 관한 것이다.

[0061] 본 발명의 용어 "개선"이란 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0062] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 골길이 및 골강도를 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0063] 본 발명에 있어서, 상기 골질환은 골다공증(osteoporosis), 성장기 발육부진, 골절, 골관절염, 파제트병 (Paget disease), 치주질환, 구루병, 골연화증, 골형성 부진증, 구루병 (rickets), 골연화증 (osteomalacia), 척추측만증 (scoliosis), 골반변형 (pelvic deformity), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 부갑상선기능항진증 (hyperparathyroidism), 신부전 환자의 신성골이영양증, 염증성 치조골 흡수질환 및 염증성 뼈 흡수질환으로 구성된 군에서 선택된 질환인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0064] 본 발명에 있어서, 상기 골다공증은 원발성(原發性) 골다공증인 일차성 골다공증, 속발성(續發性) 골다공증인 이차성 골다공증 및 특발성 골다공증을 모두 포함하는 의미이다.

[0065] 본 발명의 식품 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15중량% 이하, 바람직하게는 10중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0066] 본 발명의 식품은, 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태로 제조할 수 있다. 예를 들면, 건강식품으로는 본 발명

의 조성물을 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 하거나, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 기능성 식품으로는 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지, 콘비프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 조성물을 첨가하여 제조할 수 있다.

[0067] 상기 건강 기능식품 또한, 식품조성물로서 기능성 식품, 영양보조제, 건강식품, 식품 첨가제 등의 다양한 형태를 포함하는 것이며, 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태, 예컨대, 앞서 언급한 본 발명의 조성물을 차, 주스, 드링크의 형태로 제조하거나, 과립화, 캡슐화, 분말화 하거나, 이러한 화합물 또는 추출물을 음료, 과일 및 가공식품, 어류, 육류 및 그 가공식품, 빵류, 면류, 조미료 등 각종 식품에 첨가하여 제조함으로써 제공될 수 있다.

[0068] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

[0069] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.

[0071] [실시예]

[0072] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0074] 실시예 1: IF1의 세포 독성 및 세포외액 ATP 방출 측정

[0075] 세포는 마우스 유래의 MC3T3-E1 세포를 10% FBS와 1% penicilin/streptomycin을 포함한 α -MEM 배지로 37°C, 5% 이산화탄소 인큐베이터에서 배양하였다. 골아세포 분화유도는 50ug/mL 아스코브산 (ascorbic acid), 10mM 베타-글리세롤 인산 (beta-glycerolphosphate)을 이용하였다.

[0076] IF1의 세포독성은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide)을 이용해 측정하였다. 96-well 플레이트에 배양한 각 MC3T3-E1 세포에 IF1 단백질을 농도별로 처리한 후 24시간, 48시간 후 1mg/mL MTT를 첨가하였다. 3시간 배양 이후, 배지를 제거하고 DMSO를 이용해 formazan을 540nm에서 흡광도를 측정하였다 (도 1).

[0077] 그 결과, IF1의 세포독성은 없는 것으로 확인되었다.

[0078] 다음으로, IF1의 처리에 따른 세포외액 ATP 방출을 측정하였다. MC3T3-E1 세포에 IF1 1 μ M을 처리한 후, 시간에 따른 ATP 농도를 CellTiter-Glo Luminescent Assay kit (Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 측정하였다 (도 2).

[0079] 그 결과, 방출된 ATP 농도가 증가하는 것을 알 수 있었다.

[0081] 실시예 2: IF1의 골아세포 증식 및 분화과정에서의 효과

[0082] 골아세포 증식과 관련된 IF1의 기능을 밝히기 위해, MC3T3-E1세포에 IF1을 처리한 결과, 세포의 형태 및 숫자가 대조군과 비교하여 비슷한 것을 관찰하였다 (도 3A 및 3B).

[0083] 조골세포 분화에 미치는 IF1의 효과를 확인하기 위해, alizarin red s 염색을 통해 분화 마지막 단계인 석회화

를 측정하였다. 12-well plate에 배양된 세포를 3주간 분화배지 및 미분화배지와 함께 물질처리를 진행하며 분화시켰다. 분화배지에 이루어진 물질처리는 각 PBS, GST, IF1을 사용하였다. 분화를 마친 세포는 4% 파라포름알데하이드를 이용해 고정한 이후, alizarin red s 용액으로 염색하였다. 각 그룹별 비교는 10% 세틸피리드니움클로라이드 (cetylpyridinium chloride) 용액을 사용해 550nm에서 측정한 흡광도를 통해 비교하였다.

그 결과, 대조군 대비 IF1 처리군에서 유의하게 증가된 석회화를 관찰할 수 있었다.

실시예 3: 마우스 준비

3-1: 비만 동물 모델

비만 마우스 모델로는 C57BL/6J 수컷을 사용하였으며, JOONGAH BIO에서 5주령의 마우스 40마리를 분양받아 1주간 보통식이를 제공하며 적응기간을 거쳤다. 사육환경으로는 18~24℃, 50~60%의 습도를 항상 유지하였으며, 조명을 통해 일주기를 조절하고, 적응기간 및 실험기간 모두 자유급식을 이행하였다.

1주일 적응기간이 끝난 후, 3개의 그룹으로 나누어 각각 다음 같은 조건으로 6주간 사육하였다.

그룹 1: 정상식이(ND) 대조군 (n=10)

그룹 2: 고지방식이(HFD) 대조군 (n=15)

그룹 3: 고지방식이(HFD) 실험군 (n=15)

표 1

정상 (ND; Normal Diet) 및 고지방식이 (HFD; 40% High Fat Diet) 조성표

Ingredients	ND (g)	HFD (g)
corn starch	15	15
Casein	20	20
Sucrose	50	34
corn oil	5	3
Mineral mix	3.5	3.5
Vitamin mix	1	1
Cellulose	5	5
DL-methionine	0.3	0.3
choline bitartrate	0.2	0.2
Lard		17
Cholesterol		1
BHT	0.001	0.001
Total	100 (g)	100 (g)

1주일 적응기간이 끝난 마우스들은 고지방식으로 6주 동안 비만을 유도한 다음, IF1을 투여하였다.

3-2: 난소절제 동물 모델

난소 절제시 여성호르몬 결핍으로 인해 골질환이 발생하므로, 난소절제 모델을 이용하여 여성호르몬 결핍을 유도한 다음, IF1의 골질환 치료 효과를 관찰하였다.

난소절제 동물 모델로는 난소절제 수술을 시행한 8주령 C57BL/6J 16마리를 분양받아, 1주간 보통식이를 제공하며 적응기간을 거쳤다. 사육환경으로는 18~24℃, 50~60%의 습도를 항상 유지하였으며, 조명을 통해 일주기를 조절하고, 적응기간 및 실험기간 모두 자유급식을 이행하였다.

1주일 적응기간이 끝난 후, 2개의 그룹으로 나누어 각각 다음 같은 조건으로 사육하였다.

그룹 1: 고지방식이(HFD) 대조군 (n=8)

[0101] 그룹 2: 고지방식이(HFD) 실험군 (n=8)

[0103] 3-3: 골관절염 동물 모델

[0104] 골관절에 미치는 IF1의 효과를 확인하기 위하여, 수술을 통해 유도된 골관절염 마우스 모델을 사용하였다. 마우스 모델로는 15주령 C57BL/6J 수컷을 사용하였으며, DMM (Destabilization of the medial meniscus) 및 Sham 수술을 다음과 같이 진행하였다.

[0105] 충분히 마취가 진행된 마우스는, 해부현미경 위에 고정되어 움직임을 봉쇄하였다. 먼저, 메스를 이용하여 마우스 좌측 뒷다리 경골과 넙다리뼈가 만나는 관절부위의 피부를 약 3mm 절개하였다. 노출된 관절 캡슐 (capsule) 을 벗긴 이후, 지방을 걷어내고 안쪽반 달(medial meniscus, MM)과 인대 (medial meniscotibial ligament, MMTL)를 들어냈다. 마지막으로 봉합용 실을 이용하여 수술부위를 봉합하고, 이틀간 봉합부위를 관찰후 실을 제거하였다. Sham 수술은 인대노출 이후 과정을 생략하여 진행하였다.

[0106] 수술진행 후 마우스는 1주간 회복기를 가진 후, 5개 그룹으로 나뉘어 각각 다음과 같은 조건으로 사육하였다.

[0107] 그룹 1: 고지방식이(HFD) Sham 대조군 (n=6)

[0108] 그룹 2: 고지방식이(HFD) DMM 골관절염 예방 대조군 (n=8)

[0109] 그룹 3: 고지방식이(HFD) DMM 골관절염 예방 실험군 (n=8)

[0110] 그룹 4: 고지방식이(HFD) DMM 골관절염 치료 대조군 (n=8)

[0111] 그룹 5: 고지방식이(HFD) DMM 골관절염 치료 실험군 (n=8)

[0113] 실시예 4: IF1 투여에 따른 골길이 증가

[0114] 6주간 비만유도가 진행된 비만 모델 마우스는 IF1 (5mg/kg BW)을 4주 동안 주당 4회 복강주사 하였다. 난소절제 모델 마우스의 경우는 IF1 (5mg/kg BW)을 8주간 매일 복강주사 하였다. IF1은 GST-tag를 포함한 IF1의 DNA data를 클로닝을 통하여 분리, 정제하여 재조합 단백질을 생산하였다.

[0115] 실시예 3의 비만 및 난소절제 마우스 그룹에 IF1을 투여하는 조건은 다음과 같다 (표 2 및 표 3).

표 2

비만 모델	식이	주입 단백질
그룹1 대조군 (n=10)	정상식이(ND)	GST
그룹2 대조군 (n=15)	고지방식이(HFD)	GST
그룹3 실험군 (n=15)	고지방식이(HFD)	IF1 (5mg/kg BW)

표 3

난소절제 모델	식이	주입 단백질
그룹1 대조군 (n=8)	고지방식이(HFD)	GST
그룹2 실험군 (n=8)	고지방식이(HFD)	IF1 (5mg/kg BW)

[0118] 모든 실험 및 사육기간이 모두 종료된 마우스는 해부를 위해 16시간 절식시키고, 다음날 우레탄 (urethane) 1.5g/ml을 복강주사 하여 완전히 마취시켰다. 마취 여부는 다리부분의 반사작용을 통해 검증하였으며, 마취가 이루어지면 인슐린 시린지 (syringe)를 통해 채혈하였다. 채혈로 얻어진 혈액은 즉시 8000rpm으로 10분간 4℃에서 원심분리하여 혈청을 분리하고, 채혈이 완료된 마우스는 해부하여 빠르게 뼈를 적출하였다. 몸체에서 분리된 뼈는 디지털 캘리퍼를 통해 대퇴골 길이, 대퇴골 AP (Anterior-posterior) 직경, 대퇴골 ML (Medial-lateral) 직경, 대퇴골 ML (Medial-lateral) 직경, 경골 길이, 경골 AP 직경 및 경골 ML 직경의 1차 길이측정을 진행하였다. 더욱 정밀한 측정을 위해 1차 측정 이후의 뼈는 10% 포르말린 용액에 곧바로 보관하며 마이크로 CT 측정을

통해 2차 측정을 시행하였다.

[0119] 그 결과, 1차 측정 및 2차 측정 모두에서 정상식이 및 고지방식이 대조군에 비해 IF1 투여군에서 골밀도가 증가한 것으로 확인되었다 (도 4). 즉, IF1이 골밀도 증가에 효과가 있음을 보여주는 것이다.

[0121] **실시예 5: IF1 투여에 따른 골강도 및 골구조 변화**

[0122] **5-1: 비만 동물 모델**

[0123] 실시예 4에서 얻어진 마이크로 CT의 이미지를 BMA (Bone microarchitecture analysis)를 통해 분석하여, 골강도 및 골구조 변화를 확인하였다.

[0124] 그 결과, IF1 투여군에서 TV (Total volume; 총 부피), BS (Bone surface; 골 표면적), Tt.Ar (Total cross-sectional area; 총 단면적), Ec.Pm (Endocortical perimeter; 내피 피질 경계면)이 유의하게 증가하는 것을 알 수 있었다 (도 5). 특히, IF1의 처리는 대조군과 비교하여 뼈 직경 및 단면적에 효과를 나타내는 것을 확인하였다 (도 6). 이러한 TV와 BS 값의 증가 및 Tt.Ar 값은 IF1이 골대사에 긍정적으로 기능한다는 것을 나타내며, 따라서 뼈의 총 부피 및 크기를 증가시킨다는 것을 시사한다.

[0125] 또한, cortical fraction의 경우에 Ct.Ar (Cortical area fraction)은 증가하는 경향을 보인 반면, Ec.Pm (Endocortical perimeter)은 IF1 투여군에서 유의하게 증가하였다. Ec.Pm의 증가는 골흡수 및 골막성(perioosteal) 골형성과 깊은 관련이 있는 것이 알려져 있으므로 (Hammond, M. A. *et al.*, *PLoS one*, 11(9), e0163273, 2016), IF1의 류린성 영향이 골 세포막 부근의 파골세포와 연계하여 골흡수에 의한 구조 및 구성 변화와 외부자극에 대한 반응에 이롭게 작용함을 알 수 있다.

[0126] 다음으로, 골밀도 (BMD, bone mineral density)의 경우, 각 마우스의 체중으로 보정한 결과, BMD와 cortical BMD 값이 유의하게 증가하는 것을 관찰하여 IF1의 골밀도 증가를 확인하였다 (도 8A). 세포의 ATP에 의한 류린성 수용체 반응에 대한 다운스트림으로 조골세포의 분화 (Agrawal, A. *et al.*, *Bone*, 95: 91-101, 2017) 및 골수세포의 무기화가 이루어지는데 (Xing, Y. *et al.*, *PLoS One*, 9(9), e108417, 2014), 이는 IF1에 의한 골의 길이, 부피 신장 및 내부 부피의 증가에 직접적으로 연관되는바, IF1의 뼈에 대한 작용에는 조골세포를 포함하는 것을 알 수 있다.

[0128] **5-2: 난소절제 동물 모델**

[0129] 난소절제 동물 모델에 IF1를 투여하여, 실시예 5-1의 방법으로 골강도 및 골구조 변화를 확인하였다.

[0130] 그 결과, IF1 투여군에서 TV (Total volume; 총 부피), Tt.Ar (Total cross-sectional area; 총 단면적), Ec.pm (Endocortical perimeter; 내피 피질 경계면), Tb.Th (Trabecular thickness; 섬유주 두께)가 유의하게 증가하는 것을 관찰하였다 (도 7). 즉, 실시예 5-1 비만모델과 마찬가지로 IF1의 뼈 크기 및 부피증가 효과를 확인하였다.

[0131] 골밀도(BMD, bone mineral density)의 경우, 각 마우스의 체중으로 보정한 결과, BMD와 cortical BMD값이 유의하게 증가하는 것을 관찰하였다 (도 8B). 마찬가지로, 실시예 5-1 비만모델과 마찬가지로 IF1의 골밀도 증가를 확인하였다.

[0133] **실시예 6: IF1 투여에 따른 골관절염 개선 효과**

[0134] 골관절염 개선 마우스군은 DMM 수술 이후 약 8주간 매일 GST 및 IF1 복강투여를 진행하였다. 각 물질의 농도는 7.5mg/kg BW로 진행하였다. IF1은 GST-tag를 포함한 IF1의 DNA data를 클로닝을 통하여 분리, 정제하여 재조합 단백질을 생산하였다.

[0135] 실시예 3의 골관절염 마우스 그룹에 IF1를 투여하는 조건은 다음과 같다 (표 4).

표 4

골관절염 모델	식이	주입 단백질
그룹1 Sham 대조군 (n=8)	고지방식이(HFD)	GST

그룹2 DMM 예방 대조군 (n=8)	고지방식이(HFD)	GST
그룹2 DMM 예방 실험군 (n=8)	고지방식이(HFD)	IF1 (7.5mg/kg BW)

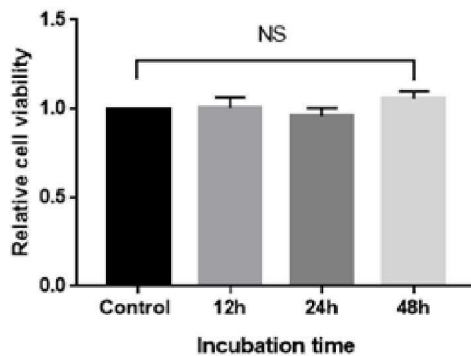
[0137] 모든 실험 및 사육기간이 종료된 마우스는 실시예 4에 기술된 바와 같이 해부를 진행하였다. 다만 골관절염 마우스의 경우, 좌측 뒷다리 뼈 전체를 하루간 10% 포르말린 용액에 담궈 고정하였다. 고정된 뼈는 10% EDTA를 사용하여 3주간 탈회과정을 거친 후, Safranin O & Fast green을 이용해 관절염 진행 정도를 파악하였다.

[0138] 그 결과, IF1 처리군에서 GST 대조군 대비 세포수의 증가 및 safranin O 염색의 정도가 증가하는 것을 관찰하였다 (도 9). 즉, IF1의 처리가 관절염의 개선에 관여하는 것을 알 수 있다.

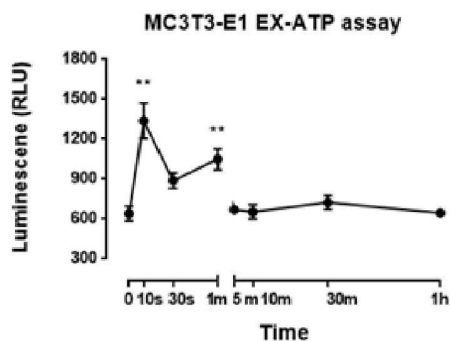
[0140] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

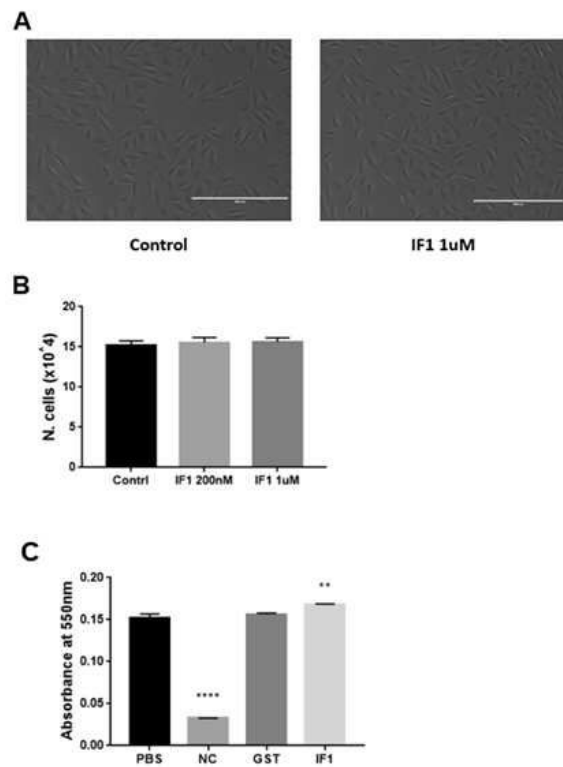
도면1



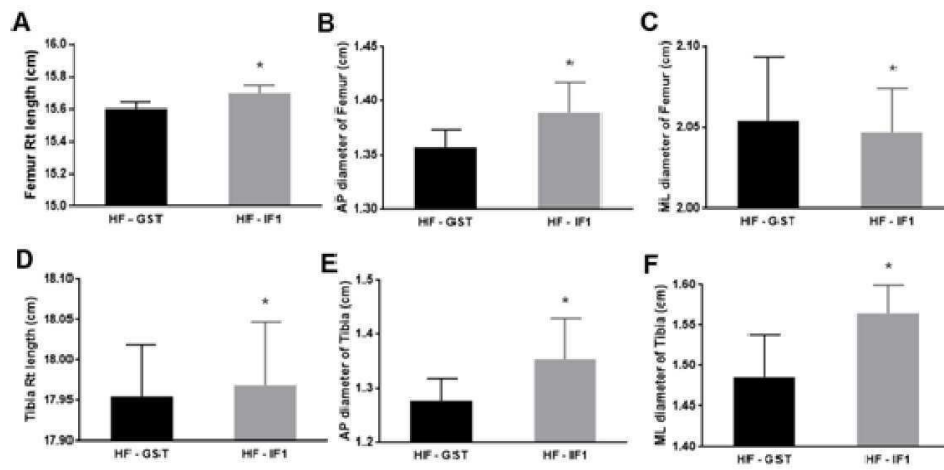
도면2



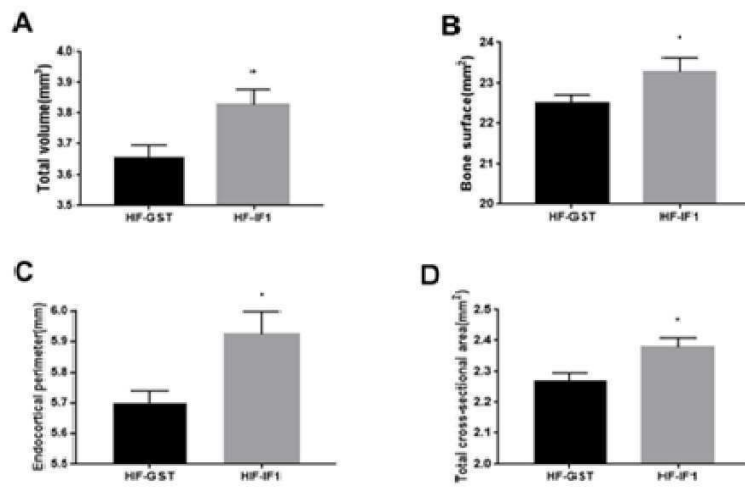
도면3



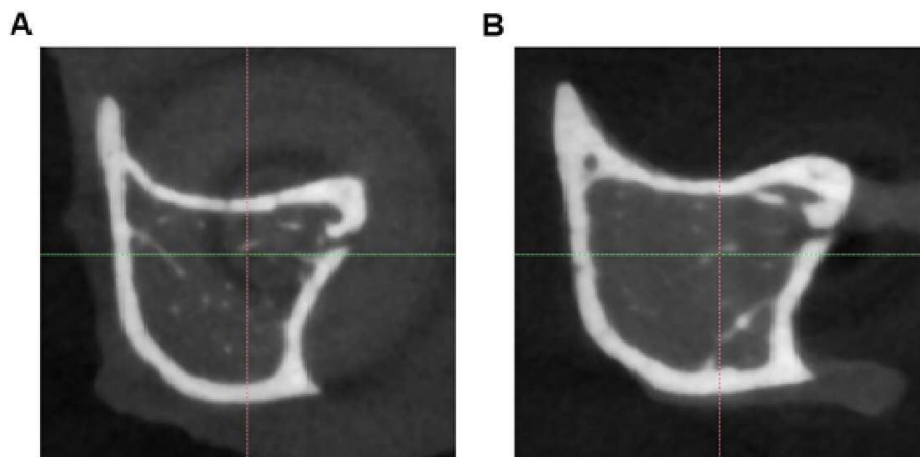
도면4



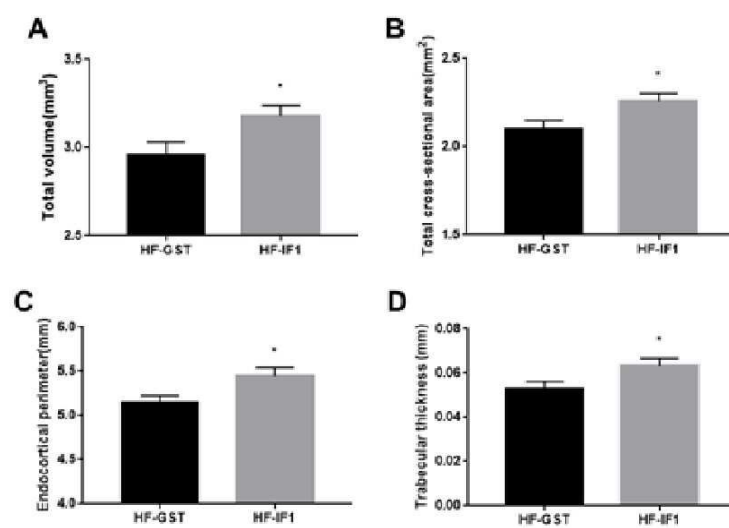
도면5



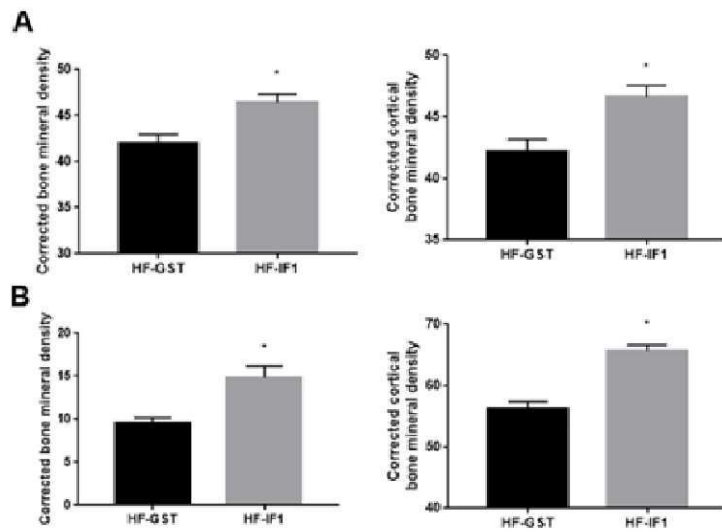
도면6



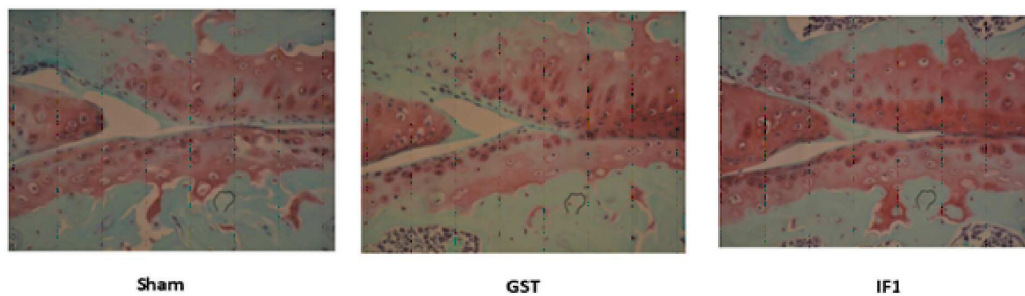
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Composition for Preventing or Treating Bone Diseases Comprising IF1
- <130> P19-B199
- <150> KR 10-2018-0117693
- <151> 2018-10-02
- <160> 1
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 81
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant IF1

<400> 1

Val Ser Asp Ser Ser Asp Ser Met Asp Thr Gly Ala Gly Ser Ile Arg

1 5 10 15

Glu Ala Gly Gly Ala Phe Gly Lys Arg Glu Lys Ala Glu Glu Asp Arg

20 25 30

Tyr Phe Arg Glu Lys Thr Lys Glu Gln Leu Ala Ala Leu Arg Lys His

35 40 45

His Glu Asp Glu Ile Asp His His Ser Lys Glu Ile Glu Arg Leu Gln

50 55 60

Lys Gln Ile Glu Arg His Lys Lys Lys Ile Gln Gln Leu Lys Asn Asn

65 70 75 80

His