

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0049999
(43) 공개일자 2020년05월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) *A23C 9/12* (2017.01)
A23L 33/135 (2016.01) *A61K 35/747* (2014.01)
A61P 19/10 (2006.01) *C12R 1/25* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2013.01)
A23C 9/12 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0131027

(22) 출원일자 2018년10월30일

심사청구일자 2018년10월30일

(71) 출원인

주식회사 종근당바이오

서울특별시 서대문구 충정로 8 (충정로3가)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

이인옥

인천광역시 남동구 논현동 한화에코메트로 1201동 1401호

박나현

서울특별시 성동구 왕십리로31나길 22 한신무학아파트 3동 810호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

공병욱

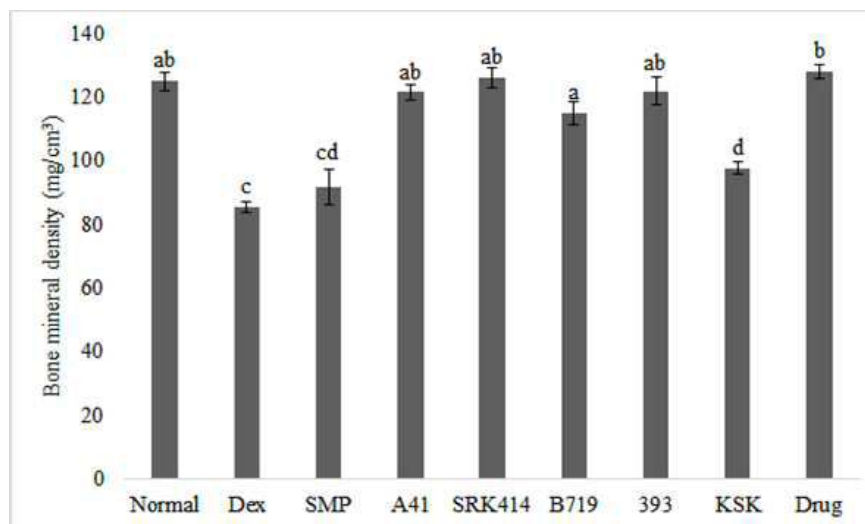
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 프로바이오틱스를 유효 성분으로 포함하는 이차성 골다공증의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 수탁번호 KCTC13686BP인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) A41 균주와, 상기 균주 또는 그 배양물을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물 및 식품조성물을 제공한다. 본 발명의 균주 및 그 배양물은 골다공증, 특히 이차성 골다공증을 예방하거나 개선, 또는 치료하기 위한 효과가 우수한 바, 동 목적의 식품조성물 및 약제학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 33/135 (2016.08)
A61K 35/747 (2013.01)
A61P 19/10 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/306 (2013.01)
A23Y 2220/67 (2013.01)
C12R 1/25 (2013.01)

(72) 발명자

김병국

서울특별시 양천구 신정로7길 76 푸른마을아파트
 202-1207

이철상

경기도 성남시 수정구 위례순환로 220 부영아파트
 5511동 604호

김세현

서울특별시 강남구 학동로 609 14동 1002호 (청담
 동, 삼익아파트)

최인석

경기도 성남시 분당구 내정로 151 306동 804호 (수내동, 양지마을금호3단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	IPET117051-3
부처명	농림축산식품부
연구관리전문기관	농림식품기술기획평가원
연구사업명	고부가가치식품기술개발사업
연구과제명	원발성 및 이차성 골다공증 개선 효과를 갖는 기능성 프로바이오틱스 제품 개발
기 여 율	1/1
주관기관	(주)종근당바이오
연구기간	2017.06.15 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

수탁번호 KCTC13686BP인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) A41 균주.

청구항 2

제1항의 균주, 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항의 균주, 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 개선용 식품조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 식품조성물은 발효유인, 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 조성물은 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*), 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*), 엔테로코커스 페시움(*Enterococcus faecium*), 엔테로코커스 페칼리스(*Enterococcus fecalis*), 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*), 비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*), 및 비피도 박테리움 락티스(*Bifidobacterium lactis*)로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 균, 또는 이의 배양물을 추가적으로 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 조성물은 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*), 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*), 엔테로코커스 페시움(*Enterococcus faecium*), 엔테로코커스 페칼리스(*Enterococcus fecalis*), 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*), 비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*), 및 비피도 박테리움 락티스(*Bifidobacterium lactis*)로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 균, 또는 이의 배양물을 추가적으로 포함하는 것인, 식품조성물.

청구항 7

제2항에 있어서, 상기 골다공증은 이차성 골다공증인, 약제학적 조성물.

청구항 8

제3항에 있어서, 상기 골다공증은 이차성 골다공증인, 식품조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 프로바이오틱스를 유효 성분으로 포함하는 이차성 골다공증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 골다공증(Osteoporosis)은 연령과 폐경 등 정상 생리적 변화에 기인하여 골량이 감소하는 일차성 골다공증(원발성, primary)과, 연령과 관계없이 질환이나 약물에 노출되어 초래되는 이차성 골다공증(속발성, secondary), 크게 두 가지로 분류된다. 흔히 골다공증은 노년기의 질병이라고 생각하기 쉽지만, 이차성 골다공증의 경우 노령이 아닌 경우에도 발병할 수 있고, 이 경우 향후 환자의 삶의 질에 미치는 영향이 매우 크기 때문에 이차성 골다공증의 치료 및 예방 방법을 개발하는 것은 매우 중요하다.

[0004] 이차성 골다공증의 원인들은 매우 다양하다. 여러 전신 질환과 약물 등이 원인으로 알려져 있으나, 이 중 글루코코르티코이드 복용으로 인한 골다공증이 가장 흔하다. 글루코코르티코이드(Glucocorticoid: GC)는 항염증과 면역억제 기능이 있어 류마티스 관절염, 천식, 아토피 피부염, 관절염 등 여러 질병의 치료에 보편적으로 사용되는 약제이다. GC의 장기간 투여는 이러한 질병을 효과적으로 억제하지만, 대부분 환자에게서 조골세포와 파골세포의 정상적인 활성을 저해하여 골다공증을 초래한다. 통계적으로 살펴보면, GC를 투여하는 환자의 경우 1년 이내 골밀도의 12%가 급격히 감소되고 그 이후로는 뼈의 손실이 서서히 진행되어 2~5% 정도의 골밀도가 매년 점차적으로 감소됨이 보고된 바 있다. 위와 같은 GC 투여에 의한 이차성 골다공증을 예방하기 위해서는 GC의 투여를 중단하는 것이 가장 이상적인 방법이지만, 해당 질병의 치료를 위해서는 소량이라도 복용이 지속되어야 한다는 점에서 문제가 된다.

[0005] GC의 장기 투여로 인한 골다공증을 예방할 수 있는 식품을 함께 섭취하는 것도 좋은 대안이 될 수 있지만, 시장에서 판매중인 제품들은 대부분 폐경기 여성, 및 노인성 골다공증과 같은 '원발성 골다공증'을 개선하기 위한 건강기능식품이며, 이차성 골다공증을 예방할 수 있는 제품은 아직까지 개발된 바 없다. 따라서 이차성 골다공증의 예방, 개선 또는 치료용도의 식품 또는 의약품의 개발이 절실히 필요한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Lee, C. B., (2008) Effect of weight reduction and calcitriol treatment for the obese patients with glucocorticoid induced osteoporosis. *Endocrinology and Metabolism*. 17(4):161-168.
- (비특허문헌 0002) Jung, H. Y., (2007) Osteoporosis Diagnosis and Treatment. *Endocrinology and Metabolism*. 23(2):76-108.
- (비특허문헌 0003) Kim, H. J., (2009) Pathological Mechanism of Glucocorticoid-induced Osteoporosis. *Endocrinology and Metabolism*. 24(4):231-235.
- (비특허문헌 0004) Park Y. S., Seo W. S., Joe J. L., Kim T. H., (2009) Long Term Use of Glucocorticoid Induced Osteoporotic Multiple Compression Fractures in Autoimmune Disease. *Journal of Rheumatic Diseases*. 16(3)228-231.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명자들은 향후 골다공증의 예방, 개선 또는 치료용도의 식품 및 의약품으로 응용이 가능한 프로바이오틱스 균주 및 이를 이용한 발효유를 개발하고자 하였다. 그 결과, 프로바이오틱스 균주를 사용하여 발효유를 제조한 후 이를 글루코코르티코이드-유도 이차성 골다공증 실험동물에게 경구 투여하면 골밀도 및 골비율의 증가되고, 칼슘 관련 흡수 및 대사에 관련된 유전자의 발현이 증가됨을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0009] 따라서, 본 발명의 목적은 수탁번호 KCTC13686BP 인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) A41 균주를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) A41 균주를 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) A41 균주를 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방 또는 개선용 식품조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 수탁번호 KCTC13686BP 인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) A41 균주를 제공한다.
- [0014] 본 발명자들은 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) A41 균주(수탁번호 : KCTC13686BP)를 신규 분리하였다. 또한, 본 발명자들은 상기 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) A41 균주(수탁번호 : KCTC13686BP)를 이용하여 발효유를 제조하였다. 상기 균주에 의해 제조된 발효유는 이차성 골다공증을 유도한 실험동물모델에 투여한 결과, 골밀도 및 골비율이 증가되는 효과가 있음을 확인하였다. 나아가, 상기 발효유를 투여한 실험동물모델의 장내에서 발현되는 칼슘 흡수 관련 단백질의 발현량이 증가되고, 혈중 칼슘농도가 증가되며, 파골세포 분화 억제 및 조골세포 분화 촉진과 관련된 유전자의 발현량을 조절함을 확인하였다.
- [0015] 위 결과로부터, 본 발명의 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) A41 균주(수탁번호 : KCTC13686BP)를 이용하여 제조된 발효유는 이차성 골다공증의 예방, 개선, 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0017] 본 명세서에서 용어 "골다공증(osteoporosis)"은 "골량의 감소와 미세구조의 이상을 특징으로 하는 전신적인 골격계 질환으로, 결과적으로 뼈가 약해져서 부러지기 쉬운 상태가 되는 질환"을 말한다. 골강도는 골량(quantity)과 골질(quality)에 의해 결정된다. 골량은 주로 골밀도(BMD)에 의해 표현되고 골질은 구조, 골교체율, 무기질화, 미세 손상 축적 등으로 구성된다. 현재는 골밀도를 측정하여 골다공증을 진단하고 있다.
- [0018] 골다공증은 일차성과 이차성 골다공증으로 분류된다. 일차성 골다공증 또는 원발성 골다공증은 폐경으로 인한 제1형 골다공증과 노화로 인한 제2형 골다공증으로 편의상 분류하지만 거의 같은 시기에 병합되어 진행되므로 정확히 분류하기 어려운 것으로 알려져 있다. 이차성 골다공증은 기저질환이나 약물에 의해 뼈의 미세구조가 변하고 골량이 감소하여 골절위험도가 증가한 것을 말한다. 이차성 골다공증의 원인으로 내분비질환(갑상선중독증, 당뇨병, 부갑상선기능항진증 등), 위장관질환(위절제술, 만성 간질환, 흡수장애증후군, 염증성 장질환, 알코올 중독 등), 골수질환, 결체 조직질환(강직성 척추염, 류마티스 관절염, 골형성부전증 등), 약물 등이 있다. 남성에서 가장 흔한 원인은 성선기능 저하증, 글루코코르티코이드 투여 등이다.
- [0019] 본 발명의 일구현예에서, 상기 골다공증은 이차성 골다공증이고, 보다 구체적으로는 글루코코르티코이드계 약물 투여에 의한 이차성 골다공증이다. 상기 글루코코르티코이드계 약물은 코르티솔, 프레드니손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 코르티손, 하이드록시코르티손, 트리암시놀론, 베타메타손, 또는 텍사메타손이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 상기 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) A41 균주는 "한국생명공학연구원 미생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, KCTC)"에 수탁번호 "KCTC13686BP"로 기탁된 것이다.
- [0021] 상기 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) A41 균주의 균체 성상은 다음과 같다:

- [0022] - 서열번호 1의 16s rRNA 서열을 포함함
- [0023] - 그람 양성 막대모양 또는 구형 간균의 형태임
- [0024] - 인간의 입, 위장, 여성 생식기관의 정상 세균총의 일부이며, 일반적으로 음식에 사용하는 것에 대해 안전하다고 여겨진다 (probiotics와 발효음식). *L. plantarum*은 *Lactobacillus* 속 구성원이며, 일반적으로 많은 발효 식품과 혐기성 식물의 물질에서 발견되며 타액에도 존재 하기도 한다.
- [0026] 따라서, 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 수탁번호 KCTC13686BP인 락토바실러스 플란타럼 (*Lactobacillus plantarum*) A41 균주, 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 수탁번호 KCTC13686BP인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) A41 균주, 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 개선용 식품조성물을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 일구현예에서, 상기 조성물은 유효성분으로 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*), 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*), 엔테로코커스 페시움(*Enterococcus faecium*), 엔테로코커스 페칼리스(*Enterococcus fecalis*), 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*), 비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*), 및 비피도 박테리움 락티스(*Bifidobacterium lactis*) 로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 균, 또는 이의 배양물을 추가적으로 포함한다.
- [0029] 본 발명의 구체적인 구현예에서, 상기 락토바실러스 퍼멘텀은 락토바실러스 퍼멘텀 SRK414 균주(수탁번호 KCTC13687BP)일 수 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 락토바실러스 퍼멘텀 SRK414 균주는 "한국생명공학연구원 미생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, KCTC)"에 수탁번호 "KCTC13687BP"로 기탁된 것이다.
- [0031] 상기 락토바실러스 퍼멘텀 SRK414 균주의 균체 성상은 다음과 같다:
- [0032] - 서열번호 2의 16s rRNA 서열을 포함함
- [0033] - 그람 양성 막대모양 또는 구형 간균의 형태임
- [0034] - 인간의 입, 위장, 여성 생식기관의 정상 세균총의 일부이며, 일반적으로 음식에 사용하는 것에 대해 안전하다고 여겨진다 (probiotics와 발효음식). *L. fermentum*은 *Lactobacillus* 속 구성원이며, 이 속에 속하는 종들은 다양한 활용이 가능하다고 한다. 이러한 활용은 식품과 사료 발효를 포함한다. *L. fermentum* 중 몇 균주들은 항생제 및 화학요법에 대해 자연내성을 갖는 것으로 밝혀져 있다.
- [0036] 본 발명의 조성물들의 유효성분인 상기 균주, 또는 이의 배양물은 상기 균주를 단리 및/또는 정제한 균체 외에 균체를 포함하는 배양물, 균체의 추출물, 배양물 상층액, 이들의 농축액, 농축물, 건조물, 또한 필요에 따라서 희석액, 희석물 등이며, 배양액, 배양물을 처리하여 얻어지는 모든 상태의 것을 포함한다.
- [0037] 상기 균체의 배양법, 추출법, 분리법, 농축법, 건조법, 희석법 등은 특별히 한정되지 않는다.
- [0038] 균체를 배양하기 위한 배지로는 통상적으로 탈지유, 웨이, 카제인 등의 우유 단백질, 당류, 효모 엑기스 등을 포함하고 있으며, 배양 방법으로는 일반적인 각종 호기적 또는 혐기적인 방법을 적당히 사용할 수 있다.
- [0039] 배양 온도로는 예를 들어 35~45℃를 설정하고, 배양 중에는 수산화나트륨 등의 알칼리를 사용하여 배지의 pH를 중성으로부터 산성, 예를 들어 pH가 5~6정도가 되도록 유지하는 중화배양법을 사용할 수도 있다. 이와 같은 중화배양법 외에 회분배양법 등의 임의의 배양 방법을 사용할 수 있으며, 배양한 후에는 필요에 따라서 배양물이나 그 상층액을 농축, 건조, 희석 등을 할 수도 있다.
- [0040] 또한 원심분리법이나 막분리법을 사용하여 배양물의 상층액과 균체를 분리하여 균체를 농축한 상태로 회수할 수도 있다. 그리고 균체에 초음파 처리나 효소 처리 등을 행하여 균체 내의 성분을 추출하거나, 배양물이나 그 상

층액, 균체나 그 추출물 등을 건조할 수도 있다. 이들은 본 발명의 상기 조성물의 유효 성분으로서 사용할 수 있다.

[0041] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로서 상기 유산균 뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있다. 상기 첨가성분은 예컨대 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상기 탄수화물로는 모노사카라이드(예를 들어, 포도당, 과당 등), 디사카라이드(예를 들어 말토스, 수크로스, 올리고당 등) 및 폴리사카라이드(예를 들어 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.

[0042] 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 유효성분인 상기 균주 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 대추 추출액 또는 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0043] 본 발명의 식품조성물은 식품, 기능성 식품(functional food), 영양보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 천연소재의 가공 형태를 포함한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조될 수 있다.

[0044] 예를 들면, 건강식품으로는 상기 유산균 자체를 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 하거나, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 식품으로는 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지 콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 요거트, 발효유, 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등 본 발명의 유산균을 첨가하여 제조될 수 있다. 또한, 본 발명의 유산균을 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다.

[0046] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로오스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0047] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여 방식으로 적용된다. 본 발명의 약제학적 조성물은 하기의 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경/연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등이 있는데, 이들 제형은 상기 유효성분 이외에 통상적으로 사용되는 충전제, 증량제, 습윤제, 봉해제, 활택제, 결합제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 1종 이상 사용할 수 있다. 봉해제로는 한천, 전분, 알긴산 또는 이의 나트륨염, 무수인산일수소 칼슘염 등이 사용될 수 있고, 활택제로는 실리카, 탈크, 스테아르산 또는 이의 마그네슘염 또는 칼슘염, 폴리에틸렌 글리콜 등이 사용될 수 있으며, 결합제로는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로오스, 나트륨카복시메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 저치환도 하이드록시프로필셀룰로오스 등이 사용될 수 있다. 이외에도 락토즈, 텍스트로오스, 수크로오스, 만니톨, 소르비톨, 셀룰로오스, 글리신 등을 희석제로 사용할 수 있으며, 경우에 따라서는 일반적으로 알려진 비등 혼합물, 흡수제, 착색제, 향미제, 감미제 등을 함께 사용할 수 있다.

[0049] 상기 조성물은 멸균되거나 또는 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염, 완충제 등의 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.

[0050] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음

식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[0051] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0053] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0054] (a) 본 발명은 수탁번호 KCTC13686BP인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) A41 균주를 제공한다.

[0055] (b) 본 발명은 수탁번호 KCTC13686BP인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) A41 균주, 또는 이의 배양물을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물 및 식품조성물을 제공한다.

[0056] 본 발명의 균주 및 그 배양물은 골다공증, 특히 이차성 골다공증을 예방하거나 개선, 또는 치료하기 위한 목적의 식품조성물 및 약제학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 실험 그룹 별 골밀도(bone mineral density, mg/cm^3)를 나타낸 도이다.

도 2는 실험 그룹 별 골비율(percent bone volume, %)을 나타낸 도이다.

도 3은 실험 그룹 별 장내 칼슘 수용 단백질인 TRPV6의 mRNA 발현량을 나타낸 도이다.

도 4는 실험 그룹 별 장내 칼슘 수용 단백질인 Calbindin-D9k의 mRNA 발현량을 나타낸 도이다.

도 5는 실험 그룹 별 장내 칼슘 수용 단백질인 PMCA1의 mRNA 발현량을 나타낸 도이다.

도 6은 실험 그룹 별 혈중 칼슘 농도를 나타낸 도이다.

도 7은 실험 그룹 별 RANKL mRNA의 발현량을 나타낸 도이다.

도 8은 실험 그룹 별 OPG mRNA의 발현량을 나타낸 도이다.

도 9는 실험 그룹 별 BSP mRNA의 발현량을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0061] 실시예

[0063] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.

[0065] 실시예 1: 프로바이오틱스 균주 및 발효유의 제조

[0066] 본 실험에 사용된 프로바이오틱스 균주들은 영유아의 분변과 전통 발효식품으로부터 분리되었다(표 2). 본 발명

의 발효유를 제조하기 위하여, 탈지 우유(skim milk) 배지에 상기에서 분리한 프로바이오틱스 균주를 각각 접종하여 37℃에서 48시간 동안 배양하였다. 발효가 완료된 발효유는 동결건조 후 분말화 하여 PBS에 1×10^{10} CFU/ml 농도로 현탁하여 실험동물에게 급여하였다. 본 발명에 사용된 탈지 우유 배지의 조성, 프로바이오틱스 균주 목록은 표 1 및 표 2에 나타내었다.

표 1

본 발명의 탈지 우유 (Skim milk) 배지의 조성

연번	원료명	용량 (g/L)
1	Skim milk powder	100
2	Glucose	20
3	Yeast extract	3
4	Bacto peptone	3

표 2

본 발명의 프로바이오틱스 균주 목록

연번	균주명	약어
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> A41	A41
2	<i>Lactobacillus fermentum</i> SRK414	SRK414
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> B719	B719
4	<i>Lactobacillus casei</i> 393	393
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> KSK411	KSK411

실시예 2: 이차성 골다공증 동물모델의 제작 및 실험군 설정

2.1 이차성 골다공증 동물모델의 제작

이차성 골다공증 동물 모델은 다음과 같이 제작하였다. 체중 175~185 g 내외의 8주령 Wistar계 암컷 랫드 (Samtako, South Korea)를 펠렛형 사료와 물을 충분히 공급하여 1주일 간 개별 케이지에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 이차성 골다공증 모델의 수립은 Lucinda et al.(PHYTOTHERAPY RESEARCH 27(4), (2012), 515-520) 와 Sousa et al.(Archives of Oral Biology 77 (2017) 55-61)에 의거하여 근육내 주사법으로 글루코코르티코이드의 일종인 덱사메타손(Dexamethasone, DEX)을 7 mg/kg BW의 농도로 주 1회씩 5주간 투여하였다.

2.2 실험군의 설정 및 발효유의 급여

본 발명의 프로바이오틱스 균주 및 발효유의 이차성 골다공증에 대한 치료효과를 확인하기 위하여, 실험군을 하기 표 3과 같이 총 9개의 그룹으로 분류하였다. 각 그룹별로 실험동물을 7마리씩 배정하였고, Normal 그룹을 제외한 모든 그룹은 상기 2.1의 방법대로 덱사메타손(DEX)을 주 1회 7 mg/kg(BW)의 농도로 5주간 투여하였다.

모든 발효유는 1×10^{10} CFU/ml의 농도로 PBS(Phosphate buffer saline)에 희석하여 위관 영양법(oral gavage)으로 경구 투여하였다. 한편, 본 실험의 목적이 프로바이오틱스를 이용한 우유 발효물의 항 골다공증 효과를 확인하기 위함이기 때문에 대조군으로는 발효를 진행하지 않은 Skim milk 투여군(SMP)을 사용하였다.

표 3

본 발명의 실험군 설정

연번	실험그룹	농도	약어
1	Normal-PBS투여군	-	Normal
2	Dexamethasone 투여군	7 mg/kg	Dex

3	Skim milk 투여군		SMP
4	발효유 투여군 (<i>L. plantarum</i> A41)	1×10^{10} CFU/ml	A41
5	발효유 투여군 (<i>L. fermentum</i> SKR414)		SKR414
6	발효유 투여군 (<i>L. plantarum</i> B719)		B719
7	발효유 투여군 (<i>L. casei</i> 393)		393
8	발효유 투여군 (<i>L. plantarum</i> KSK411)		KSK411
9	이차성 골다공증 약물(alendronate) 투여군	0.16 mg/kg	Drug

실시예 3: 본 발명의 발효유 투여에 따른 골의 형태학적 분석

골밀도(Bone mineral density)와 골비율(Percent bone volume)은 뼈의 강도를 측정할 때 가장 기본적으로 확인하는 지표이다. 본 발명의 프로바이오틱스 균주 및 발효유의 골밀도 개선효과를 측정하기 위하여, Micro Ct 영상분석기(Sky Scan 1176)와 이를 재구성하는 프로그램(NRecon), 그리고 이를 분석하는 프로그램(CTAn)을 이용하였다.

실험 결과, 텍사메타손을 투여한 DEX 그룹에서는 골밀도 및 골비율이 Normal 그룹 대비 유의적으로 감소한 것으로 보아 이차성 골다공증이 유도됨을 확인할 수 있었다. 이차성 골다공증 약물(alendronate)을 텍사메타손과 함께 투여한 Drug 그룹에서는 텍사메타손 투여로 인해 감소된 골밀도와 골비율이 회복된 것으로 나타났다. 본 발명의 프로바이오틱스 균주로 발효시킨 발효유를 투여한 A41 그룹, SRK414 그룹, B719 그룹, 및 393 그룹도 drug 그룹과 유사한 정도의 골밀도 및 골비율 회복 효과를 나타내었다. (도 1 및 도 2)

상기 결과로부터, 본 발명의 프로바이오틱스 균주인 *L. plantarum* A41, *L. fermentum* SRK414, *L. plantarum* B719, *L. casei* 393 으로 발효시킨 발효유가 텍사메타손의 투여로 유발된 이차성 골다공증의 증상인 골밀도, 골비율 감소를 회복시킴을 확인하였다.

실시예 4. 본 발명의 발효유 투여에 의한 칼슘 흡수 관련 지표 분석

혈중 칼슘농도가 부족할 경우, 뼈에 있는 칼슘이 혈중으로 유리되어 골소실이 증가하게 된다. 따라서 장내에서 칼슘 흡수를 촉진시킴으로써 혈중 칼슘 농도를 증가시키는 것은 골소실을 낮출 수 있는 중요한 예방책이 될 수 있다. 칼슘은 장에서 칼슘을 이동시키는 역할을 하는 단백질인 TRPV6, Calbindin-D9k, PMCA1 등에 의해 소장에서 혈관으로 유입되는데, 이들의 발현량이 증가한다면 칼슘 흡수가 원활히 진행된다고 볼 수 있다. 따라서 본 발명자들은 본 발명의 발효유 투여에 따른 장내 칼슘 수용 단백질의 mRNA 발현량을 알아보기 위해서 qRT-PCR 분석을 실시하였으며, 혈중 칼슘 농도와의 관련성을 확인하였다.

4.1 장내 칼슘 수용체 유전자 발현 확인

발효유가 장내 칼슘 수용 단백질(TRPV6, Calbindin-D9k, PMCA1)의 발현량에 미치는 효과를 알아보기 위해서 qRT-PCR 분석을 진행하였다. 구체적으로, 실험 기간 종료 후 각 실험동물의 회장을 적출하여 균질화(homogenized)과정을 거친 후 TRIzol(Invitrogen)을 사용하여 조직에 포함되어 있는 RNA를 추출하였다. 정제된 RNA는 역전사효소 oligo(dT) 프라이머와 함께 cDNA합성에 사용되었으며, PCR 조건은 95 °C에서 3분 이후, 94 °C에서 10초 60 °C에서 30초로, 총 44주기 반복하였다. qRT-PCT 분석을 위한 프라이머는 표 4에 나타내었다. 총 전사의 정도는 β -actin 전사 레벨로부터 정규화(normalization)하여 그래프로 나타내었다(도 3 내지 도 5).

표 4

유전자명	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
TRPV6	GAT GGC ACG ACC CTT TGG	CTT CGG GAG GTA CTT CGA GAC A
Calbindin-D9k	CGC TAA GAA ATC TCC CGA AG	CTC CAT CAC CGT TCT TAT CCA
PMCA1	ACT CTG GGG CCA GCT TAT TT	GTT CGG CAT GGT CAA TCT CT

[0092] 도 3 내지 5에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 발효유 투여 그룹 중에서 A41 그룹 및 SRK414 그룹이 다른 그룹에 비해 상대적으로 높은 장내 칼슘 수용 단백질(TRPV6, Calbindin-D9k, PMCA1)의 발현량을 나타내었다(도 3 내지 도 5).

[0094] 4.2 혈중 칼슘 농도 조절효과

[0095] 본 발명의 발효유 투여가 혈중 칼슘 농도에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 혈중 칼슘 농도를 확인하였다. 구체적으로, 동물실험 기간 종료 후 심장천자(heart puncture)법으로 혈액을 채취하였으며 원심분리(2500 g, 15분, 4℃)하여 수집한 혈청을 분석 전까지 -70 ℃에 보관하였다. 혈청 내에 있는 칼슘(Ca) 농도는 Calcium activity assay kit (쎈엠비엘, Korea)를 사용하여 분석하였다. 결과는 도 6에 나타내었다.

[0096] 도 6에 나타난 바와 같이, 장내 칼슘 수용 단백질의 발현량과 마찬가지로 본 발명의 발효유 투여 그룹 중에서 A41 그룹 및 SRK414 그룹이 다른 그룹에 비해 상대적으로 높은 혈중 칼슘 농도를 나타냄을 확인하였다. 따라서 본 발명의 *L. plantarum* A41, 및 *L. fermentum* SRK414 균주에 의해 발효된 발효유는, 발효유가 투여된 동물의 소장 내 칼슘 흡수를 촉진시킴으로써 높은 혈중 칼슘 농도 유지하여 골소실을 효과적으로 예방할 수 있다고 사료된다.

[0099] 실시예 5. 본 발명의 발효유 투여에 따른 골 대사 관련 지표 분석

[0100] 조골세포 또는 활성화된 면역세포에서 RANKL(Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand)이 발현되면 파골전구세포 세포막의 RANK(Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B)와 결합하여 파골세포의 분화가 이루어지는데, 이 경우 뼈 흡수가 촉진되어 골다공증이 유발될 수 있다. 반면 OPG(Osteoprotegerin)는 RANK 대신 RANK에 수용되는 인자로, OPG가 RANK와 RANKL의 결합을 방해함으로써 파골세포의 분화를 억제시킬 수 있다.

[0101] 본 발명자들은 본 발명의 발효유 투여가 골 대사에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 골대사 관련 마커인 RANKL, OPG, 및 BSP의 mRNA 발현량을 qRT-PCR을 통해 분석하였다. 구체적으로, 실험동물의 넙다리뼈와 골피질을 균질화(homogenization)한 후 TRIzol reagent(Thermofisher, USA)를 이용해 총 RNA를 추출하였다. 정제된 총 RNA는 cDNA합성을 위해 사용하였다. PCR은 Biorad RT-PCR을 사용하였으며 95 ℃에서 3분간 처리한 후, 94 ℃에서 10초, 60 ℃에서 30초를 총 44주기 반복하였다. qRT-PCT 분석을 위한 프라이머는 표 5에 나타내었다. 총 전사의 정도는 β -actin 전사 레벨로부터 정규화(normalization)하여 그래프에 나타내었다(도 7 내지 9).

표 5

유전자명	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
RANKL	CCC ATC GGG TTC CCA TAA AGT C	GCC TGA AGC AAA TGT TGG CGT A
OPG	ACG GTT TGC AAA AGA TGT CC	GTG AGC TGC AGT TGG TGT GT
BSP	AGA AAG AGC AGC ACG GTT GAG T	GAC CCT CGT AGC CTT CAT AGC C

[0103] 도 7에 나타난 바와 같이, A41 그룹, 및 SRK414 그룹에서 Dex 그룹에 비해 RANKL mRNA의 발현량이 유의미하게 감소하여 A41과 SRK414 발효유가 파골세포의 분화를 감소시키는 것을 확인하였다.

[0104] 또한, 도 8에 나타난 바와 같이, OPG mRNA 발현량도 393과 KSK를 제외한 모든발효유 투여 그룹에서 모두 유의미하게 증가하여 파골세포 분화의 억제를 확인하였다.

[0105] 마지막으로, 도 9에 나타난 바와 같이, 궁극적인 조골세포 분화 표지인자인 BSP(Bone sialoprotein) 발현량 역시 A41, SRK414 그리고 B719 그룹에서 상대적으로 높은 발현량을 나타내어 조골세포 분화가 촉진되어 골다공증의 치료효과가 뛰어남을 확인할 수 있었다.

[0106] 상기 결과를 바탕으로 본 발명의 *L. plantarum* A41 균주, 및 *L. fermentum* SRK414 균주로 발효시킨 발효유를 동물모델에 투여하였을 때 체내 조골세포가 OPG 생성을 촉진시키고 RANKL의 생성을 억제시켜 파골세포의 분화를 억제하고, 조골세포의 분화를 촉진함으로써 이차성 골다공증에 대한 예방 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

수탁번호

[0108]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13686BP

수탁일자 : 20181025

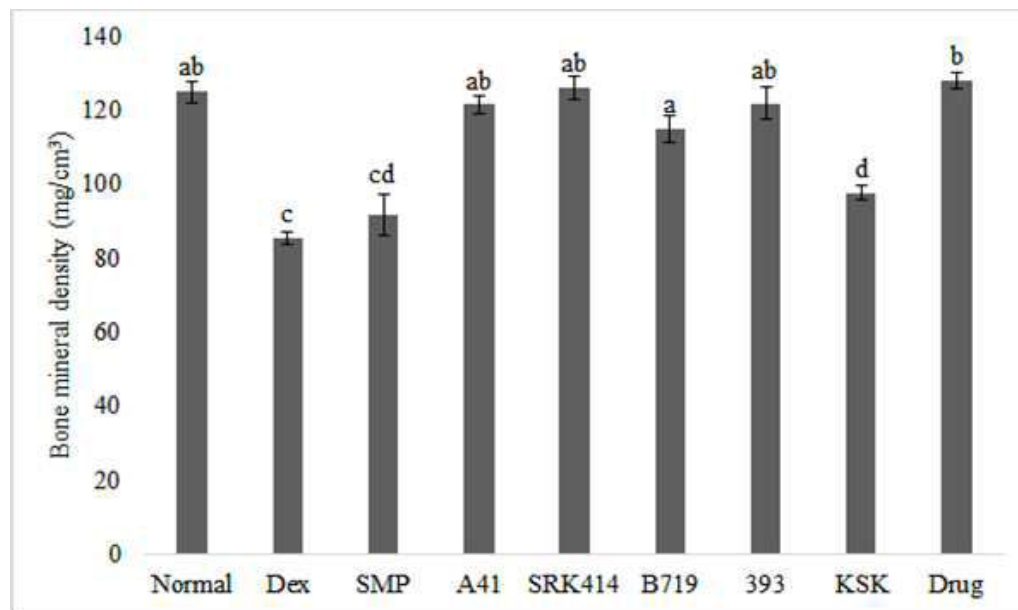
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13687BP

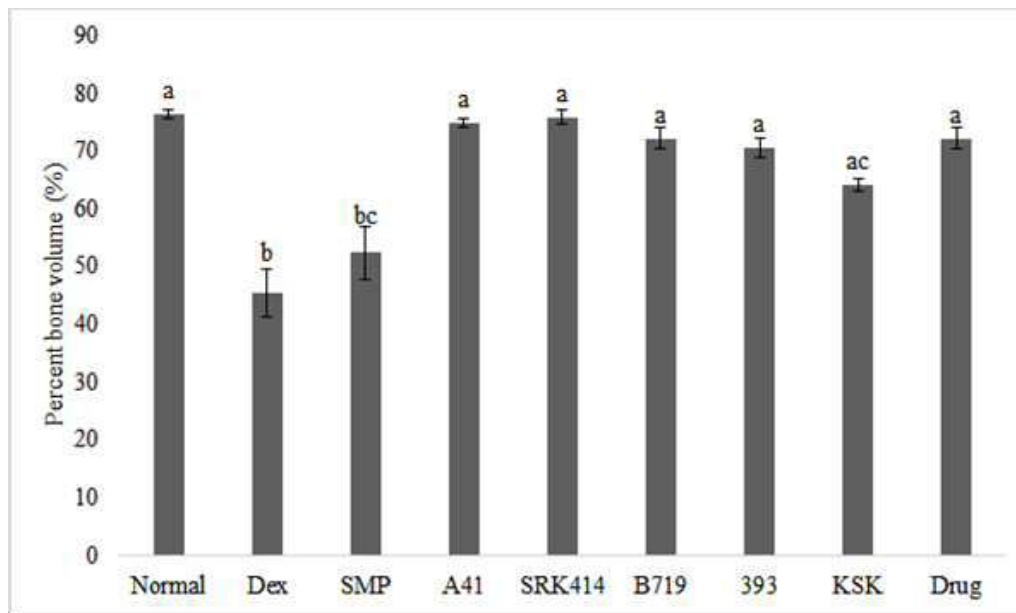
수탁일자 : 20181025

도면

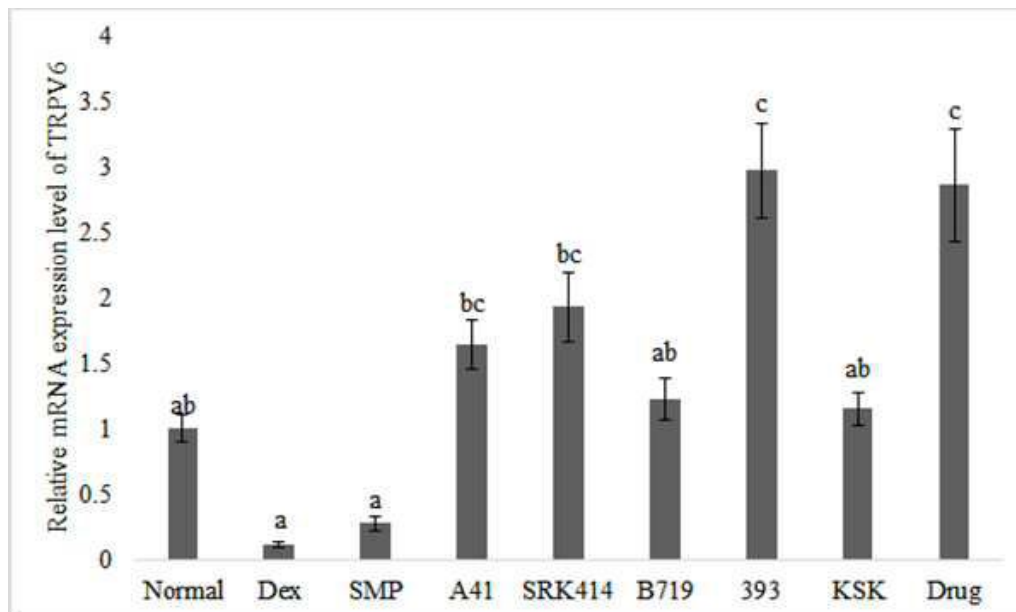
도면1



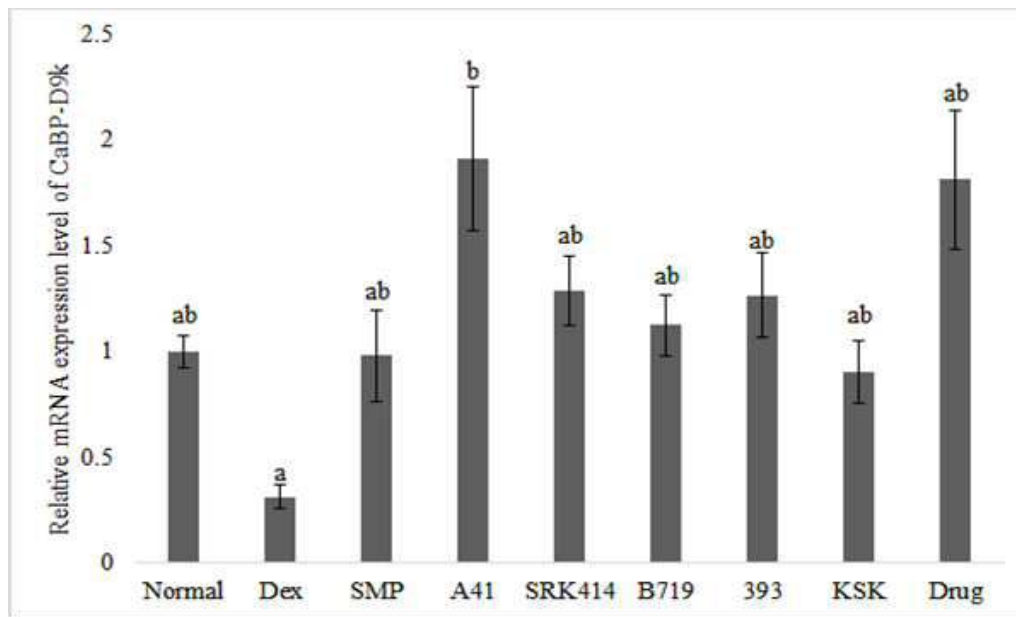
도면2



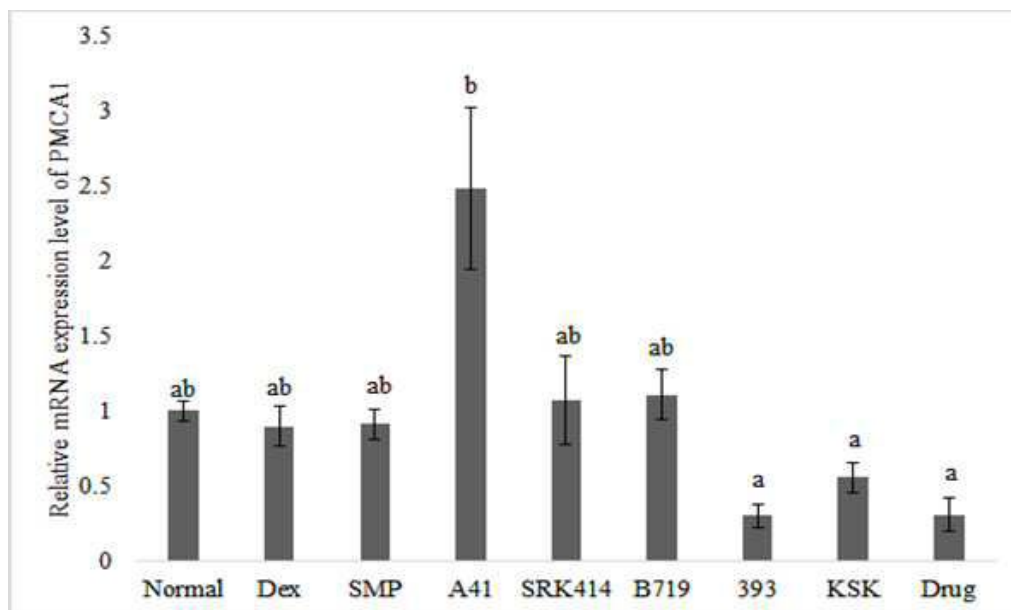
도면3



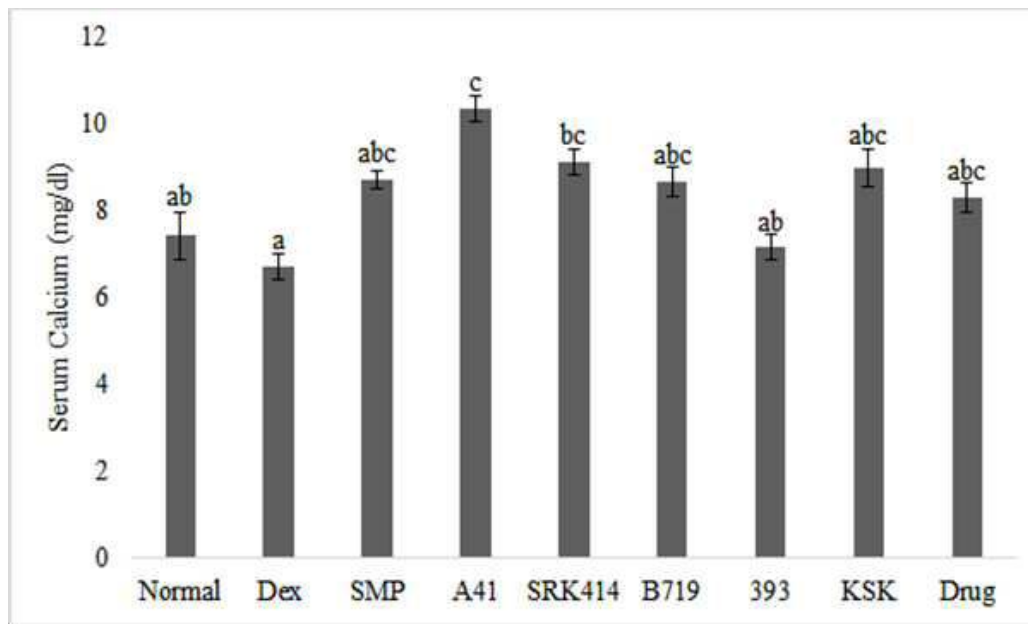
도면4



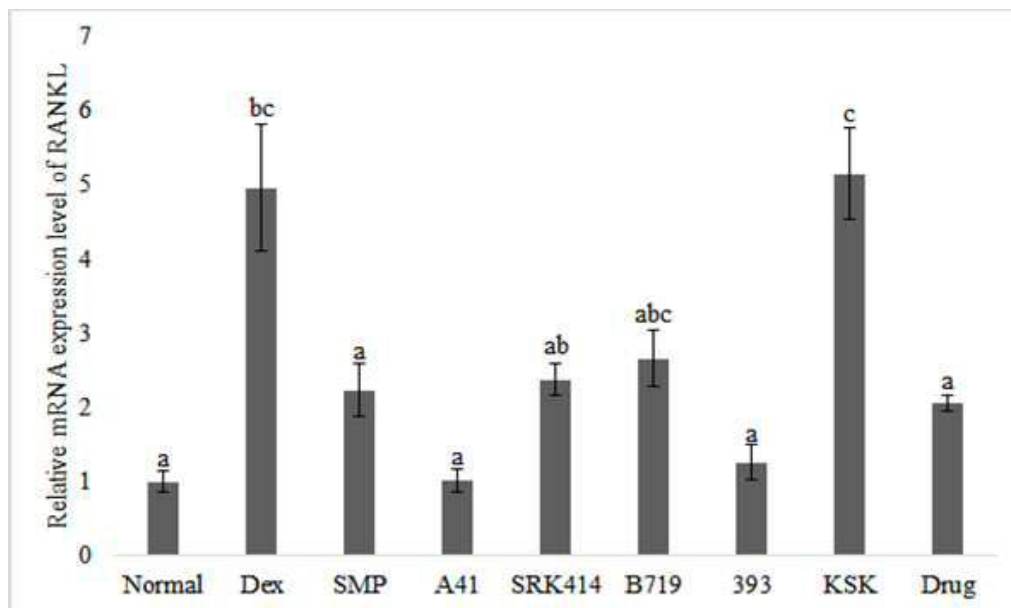
도면5



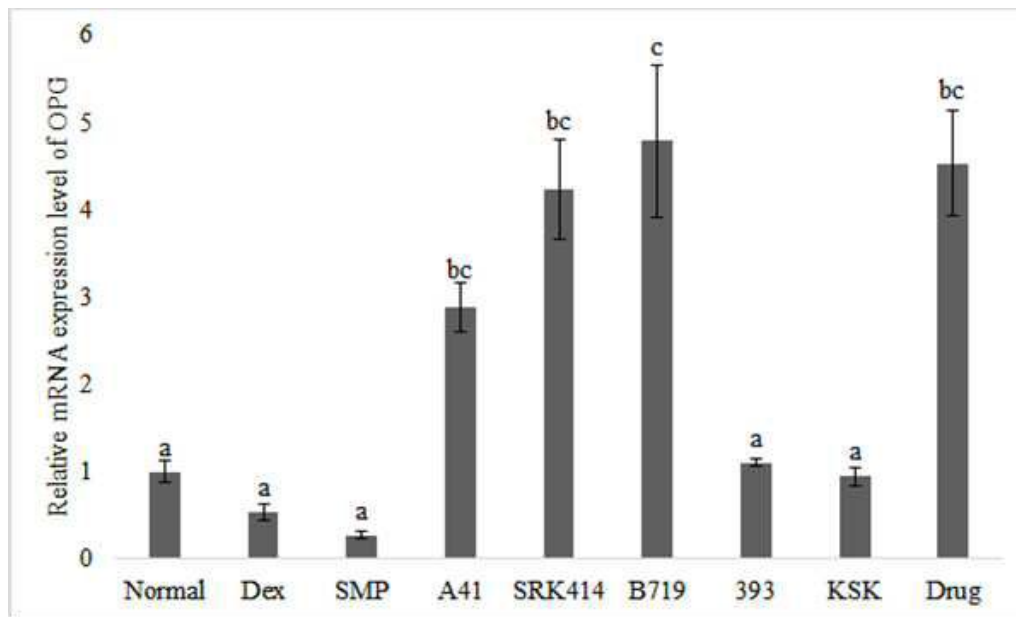
도면6



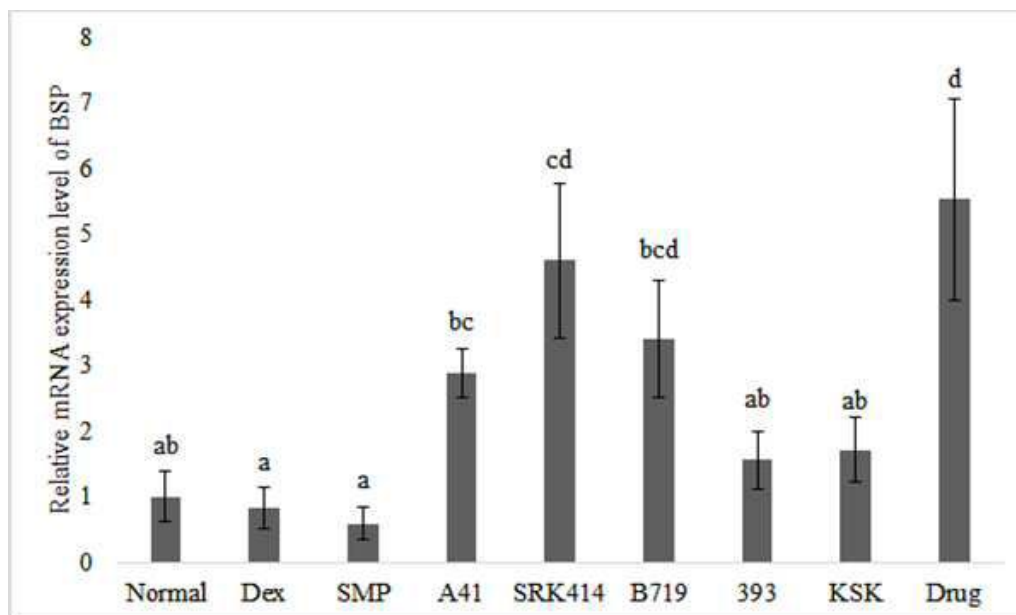
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> CKD Bio Corp
- <120> Composition for Preventing or Treating Secondary Osteoporosis
Comprising Probiotics
- <130> PN180362
- <160> 14
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1487

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16s rRNA of *Lactobacillus plantarum* A41 (KCTC13686BP)

<400> 1

ggctcaggac gaacgctggc ggcgtgccta atacatgcaa gtcgaacgaa ctctggtatt	60
gattggtgct tgcacatga ttacatttg agtgagtggc gaactggtga gtaacacgtg	120
ggaaacctgc ccagaagcgg gggataaacac ctggaaacag atgctaatac cgcataacaa	180
cttggaccgc atgggccgag ttgaaagat ggcttcggct atcacttttg gatgggcccg	240
cggcgattta gctagatggt ggggtaacgg ctccatgg caatgatacg tagccgacct	300
gagagggtaa tcggccacat tgggactgag acacggccca aactcctacg ggaggcagca	360
gtagggaatc ttccacaatg gacgaaagtc tgatggagca acgcccgtg agtgaagaag	420
ggtttcggct cgtaaaactc tgtttgtaaa gaagaacata tctgagagta actgttcagg	480
tattgacggt atttaaccag aaagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtataac	540
gtaggtggca agcgttgtcc ggatttattg ggcgtaaagc gagcgcaggc ggttttttaa	600
gctgatgtg aaagccttcg gctcaaccga agaagtgcac cgaaactgg gaaacttgag	660
tgcagaagag gacagtggaa ctccatgtgt agcgtgaaa tgcgtagata tatggaagaa	720
caccagtggc gaaggcggct gtctggtctg taactgacgc tgaggctcga aagtatgggt	780
agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc ataccgtaaa cgatgaatgc taagtgttgg	840
agggtttccg cccttcagtg ctgcagctaa cgcattaagc attccgcctg gggagtacgg	900
ccgcaaggct gaaactcaa ggaattgacg ggggcccgca caagcgggtg agcatgtggt	960
ttaattcgaa gctacgcgaa gaaccttacc aggtcttgac atactatgca aatctaagag	1020
attagacgtt cccttcgggg acatggatac aggtgggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt	1080
cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgaaccct tattatcagt tgccagcatt	1140
aagttgggca ctctggtgag actgccgtg acaaaccgga ggaagggtgg gatgacgtca	1200
aatcatcatg ccccttatga cctgggctac acacgtgcta caatggatgg tacaacgagt	1260
tgcgaactcg cgagagtaag ctaatctctt aaagccattc tcagttcgga ttgtaggctg	1320
caactcgctt acatgaagtc ggaatcgcta gtaatcgagg atcagcatgc cgcggtgaat	1380
acgttcccgg gccttgtaca caccgcccgt cacacatga gagttttaa caccctaaagt	1440
cggtggggta acccttttagg aaccagccgc ctaaagtggg acagatg	1487

<210> 2

<211> 1503

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16s rRNA of Lactobacillus fermentum SRK414 (KCTC13687BP)

<400> 2

gctcaggatg aacgccggcg gtgtgcctaa tacatgcaag tcgaacgcgt tggcccaatt 60
gattgatggt gcttgcacct gattgatttt ggtcgccaac gaggggcgga cgggtgagta 120
acacgtagggt aacctgccca gaagcggggg acaacatttg gaaacagatg ctaataccgc 180
ataacaacgt ttttcgcatg aacaacgctt aaaagatggc ttctcgctat cacttctgga 240

tggacctgcg gtgcattagc ttgttggtgg ggtaacggcc taccaaggcg atgatgcata 300
gccgagttga gagactgatc ggccacaatg ggactgagac acggcccata ctctacggg 360
aggcagcagt agggaaatctt ccacaatggg cgcaagcctg atggagcaac accgcgtgag 420
tgaagaaggg tttcggctcg taaagctctg ttgttaaaga agaacacgta tgagagtaac 480
tgttcatacg ttgacgggat ttaaccagaa agtcacggct aactacgtgc cagcagccgc 540
ggtaatacgt aggtggcaag cgttatccgg atttattggg cgtaaagaga gtgcaggcgg 600
ttttctaagt ctgatgtgaa agccttcggc ttaaccggag aatgcatcg gaaactggat 660

aacttgagtg cagaagaggg tagtggaact ccatgtgtag cgggtggaatg cgtagatata 720
tggaagaaca ccagtggcga aggcggctac ctggtctgca actgacgctg agactcgaaa 780
gcatgggtag cgaacaggat tagataacct ggtagtccat gccgtaaacg atgagtgcta 840
ggtgttgagg ggtttccgcc cttcagtgcc ggagctaacg cattaagcac tccgcctggg 900
gagtacgacc gcaaggttga aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca agcgggtggag 960
catgtggttt aattcgaagc tacgcaaga accttaccag gtcttgacat cttgcgcaa 1020
ccctagagat agggcgtttc cttcggaac gcaatgacag gtggtgcatg gtcgtcgta 1080

gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaacccttg ttactagtgtg 1140
ccagcattaa gttgggcact ctagtgagac tgccggtgac aaaccggagg aaggtgggga 1200
cgacgtcaga tcatcatgcc cttatgacc tgggctacac acgtgctaca atggacggta 1260
caacgagtgc cgaactcgcg agggcaagca aatctcttaa aaccgttctc agttcggact 1320
gcaggctgca actgcctgc acgaagtcgg aatcgctagt aatcgcgat cagcatgccg 1380
cggatgaatac gttccggggc cttgtacaca ccgccgtca caccatgaga gtttgtaaca 1440
cccaaagtcg gtggggtaac cttttagagc cagccgccta agtgggacag atgattaggg 1500

tga 1503

<210> 3

<211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer of TRPV6
 <400> 3
 gatggcacga ccctttgg 18
 <210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer of TRPV6
 <400> 4
 cttcgggagg tacttcgaga ca 22
 <210> 5
 <211> 20

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer of Calbindin-D9k
 <400> 5
 cgctaagaaa tctcccgaag 20
 <210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer of Calbindin-D9k
 <400> 6
 ctccatcacc gttcttatcc a 21
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer of PMCA1
 <
 <400> 7

actctggggc cagcttattt	20
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse primer of PMCA1	
<400> 8	
gttcggcatg gtcaatctct	20
<210> 9	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Forward primer of RANKL	
<400> 9	
cccatcgggt tcccataaag tc	22
<210> 10	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse primer of RANKL	
<400> 10	
gcctgaagca aatgttggcg ta	22
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Forward primer of OPG	
<400> 11	
acggtttgca aaagatgtcc	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse primer of OPG	

<400

> 12

gtgagctgca gttggtgtgt

20

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer of BSP

<400> 13

agaaagagca gcacggttga gt

22

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of BSP

<400> 14

gaccctcgta gccttcatag cc

22