



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년06월16일
(11) 등록번호 10-1747775
(24) 등록일자 2017년06월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/336 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/336 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0091897
(22) 출원일자 2016년07월20일
심사청구일자 2016년07월20일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020150050705 A

(73) 특허권자
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
정우진
경기도 성남시 분당구 판교원로 7 403동 2401호 (운중동, LIG건강아파트)
서은경
서울특별시 성북구 숲샘로1길 9 (정릉동)
홍성은
충청북도 충주시 예성로 401 (연수동 주공4단지아파트) 503동 1101호
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 8 항

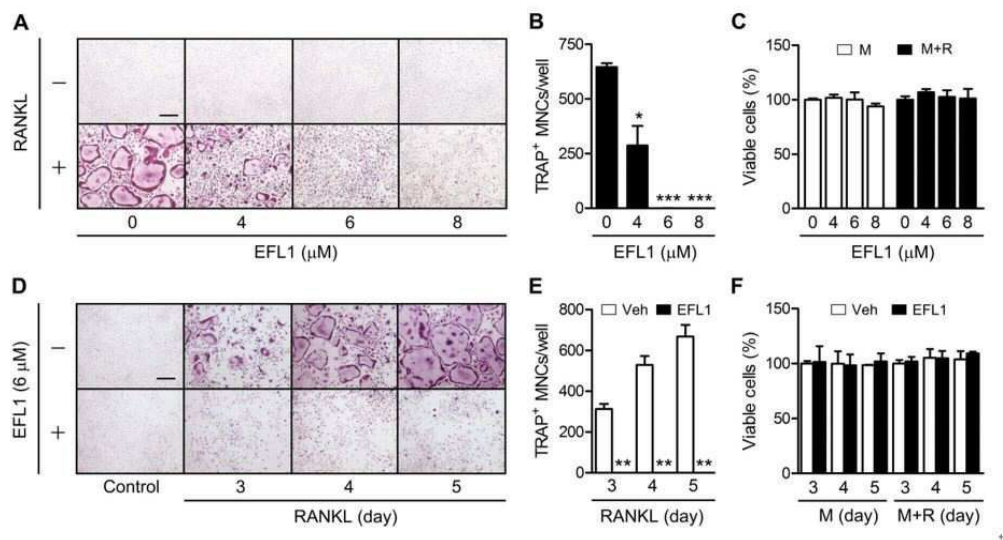
심사관 : 고일영

(54) 발명의 명칭 유포비아 인자 L1 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 유포비아 인자 L1(Euphorbia Factor L1) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 유포비아 인자 L1 존재 하에서 BMM세포에 RANKL을 처리하였을 때 파골세포의 분화가 유의적으로 억제되고, 파골세포 분화와 연관된 NFATc1과 그 타겟 유전자들, NFATc1의 upstream 조절자로 알려진 NF- κ B와 c-Fos, 미토콘드리아 biogenesis에 관여하는 전사인자인 PGC-1 β 와 그 타겟 유전자들의 발현이 억제되며, 레독스에 민감한 전사인자 Nrf2와 그 타겟 단백질인 항산화 효소 발현의 증가와 함께, 활성 산소의 생성이 감소되고, 파골세포의 성숙과 골 흡수 기능이 저해되며 분화된 파골세포의 사멸이 유도되고 염증에 의해 유발되는 골 손상이 억제되는 것을 확인함으로써, 본 발명의 유포비아 인자 L1은 골질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/306 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A2A2A01003983

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-중견연구자지원사업-핵심연구지원사업(개인)

연구과제명 파골세포 분화억제 천연물의 발굴, 작용기전 및 골 손상 억제효능 규명

기 여 율 80/100

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2014.05.01 ~ 2017.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A5A1051354

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터육성사업(학술진흥)-이공학분야(SRC)

연구과제명 세포항상성 연구센터-염증 유발 면역세포 기능조절 기전 연구(3총괄1세부)

기 여 율 20/100

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2019.08.31

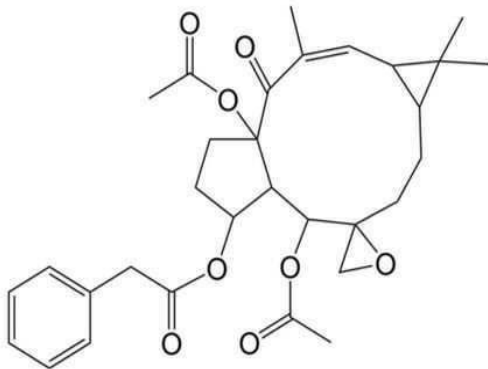
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 기재되는 유포비아 인자 L1(Euphorbia Factor L1) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 성장기 발육부진, 골절, 골다공증(osteoporosis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 치주질환(periodontal disease), 파제트병(Paget disease) 및 전이성 골암(metastatic bone cancers)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 유포비아 인자 L1은 0.1 내지 20 μM 농도인 것을 특징으로 하는 성장기 발육부진, 골절, 골다공증(osteoporosis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 치주질환(periodontal disease), 파제트병(Paget disease) 및 전이성 골암(metastatic bone cancers)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 NFATc1, NF- κB , c-FOS 및 PGC-1 β 의 발현 또는 활성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 성장기 발육부진, 골절, 골다공증(osteoporosis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 치주질환(periodontal disease), 파제트병(Paget disease) 및 전이성 골암(metastatic bone cancers)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 Nrf2의 발현 또는 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 성장기 발육부진, 골절, 골다공증(osteoporosis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 치주질환(periodontal disease), 파제트병(Paget disease) 및 전이성 골암(metastatic bone cancers)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 세포 내 활성산소의 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 성장기 발육부진, 골

절, 골다공증(osteoporosis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 치주질환(periodontal disease), 파제트병(Paget disease) 및 전이성 골암(metastatic bone cancers)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 분화된 파골세포의 사멸을 촉진하는 것을 특징으로 하는 성장기 발육부진, 골절, 골다공증(osteoporosis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 치주질환(periodontal disease), 파제트병(Paget disease) 및 전이성 골암(metastatic bone cancers)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 염증에 의한 골 손상을 억제하는 것을 특징으로 하는 성장기 발육부진, 골절, 골다공증(osteoporosis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 치주질환(periodontal disease), 파제트병(Paget disease) 및 전이성 골암(metastatic bone cancers)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

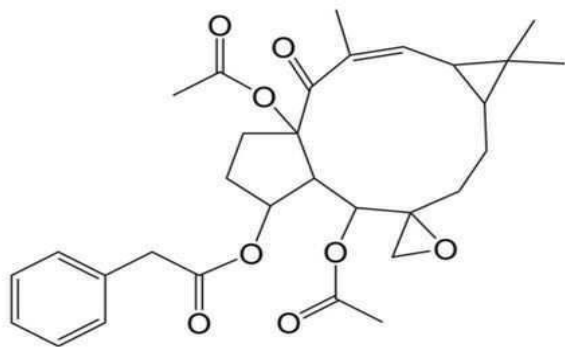
청구항 8

삭제

청구항 9

하기 화학식 1로 기재되는 유포비아 인자 L1(Euphorbia Factor L1) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 성장기 발육부진, 골절, 골다공증(osteoporosis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 치주질환(periodontal disease), 파제트병(Paget disease) 및 전이성 골암(metastatic bone cancers)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 골질환의 개선용 건강기능식품:

[화학식 1]



청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 유포비아 인자 L1(Euphorbia Factor L1) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유

[0001]

하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 대표적인 대사성 골 질환인 골다공증(osteoporosis)은 골 조직의 석회화 감소되어 뼈의 치밀질이 얇아지고 그로 인해 골수강(骨髓腔)이 넓어지게 되는 질환으로, 증세가 진전됨에 따라 뼈가 약해지기 때문에 작은 충격에도 골절되기 쉽다.
- [0003] 골다공증은 골량의 감소와 미세구조의 이상을 특징으로 갖는데, 노화가 진행되면서 낡은 뼈의 흡수와 새로운 뼈의 형성 사이에 균형이 무너져 새로운 뼈의 대체(bone remodeling)가 원활히 이루어지지 않아 뼈가 영성해지고, 부러지거나 부서질 위험성이 커지게 된다. 이러한 골량은 유전적 요인, 영양 섭취, 호르몬의 변화, 운동 및 생활 습관의 차이 등 여러 가지 요인들에 의해 영향을 받으며, 노령, 운동 부족, 저체중, 흡연, 저칼슘 식이, 폐경, 난소 절제 등이 골량 감소의 주요한 원인이다.
- [0004] 한편, 개인차는 있지만 대개 골량은 14 ~ 18세에 가장 높고 노후에는 1년에 약 1%씩 감소한다. 특히, 여성의 경우 30세 이후부터 골 감소가 지속적으로 진행되며, 폐경기에 이르면 호르몬 변화에 의해 골 감소가 급격히 진행된다. 즉, 폐경기에 이르면 에스트로겐 농도가 급속히 감소하는데, 이때, IL-7(interleukin-7)에 의한 것처럼 B-림프구(B-lymphocyte)가 다량 생성되어 골수(bone marrow)에 B 세포 전구체(pre-B cell)가 축적되고, 이로 인해 IL-6의 양이 증가하여 파골세포의 활성을 증가시키므로 결국 골량이 감소하게 된다.
- [0005] 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 있으며, 앞으로 더 증가할 것으로 예상되기 때문에 세계적인 각 연구 기관과 제약회사에서는 골질환 치료제 개발에 많은 투자를 하고 있다.
- [0006] 국내에서도 근래에 평균수명이 80세에 육박하면서 골다공증 유병률이 급격하게 증가하고 있는데, 최근 지역 주민을 대상으로 실시된 연구에 의하면 전국 인구로 표준화하였을 경우 남성의 4.5%, 여성의 19.8%가 골다공증을 갖고 있다고 보고되었다. 이는 골다공증이 당뇨병이나 심혈관계 질환보다 더 흔한 질환이며, 골절로 인해 받는 환자들의 고통이나 치료를 위해 들어가는 비용을 추정할 때 골다공증은 매우 중요한 보건 문제임을 시사한다.
- [0007] 지금까지 여러 물질이 골다공증 치료제로 개발되었다. 그 중 골다공증 치료제로 가장 많이 사용되는 에스트로겐은 그 실제적인 효능이 아직 검증되지 않은 상태이며 생애 동안 계속 복용해야 하는 단점이 있으며, 장기간 투여하는 경우 유방암이나 자궁암이 증가하는 부작용이 있다. 알렌드로네이트(alendronate)도 그 효능이 명확하지 않고 소화관에서의 흡수가 더디며 위장과 식도점막에 염증을 유발하는 문제가 있다. 칼슘제제는 부작용이 적으면서도 효과가 우수한 것으로 알려져 있지만 치료제라기보다는 예방제에 해당한다. 그 외에 칼시토닌과 같은 비타민 D 제제가 알려져 있으나 아직 효능 및 부작용에 대한 연구가 충분히 되어있지 않은 상태이다. 이에, 부작용이 적고 효과가 우수한 새로운 대사성 골 질환 치료제가 요구되고 있는 실정이다.
- [0008] 파골세포는 척추동물의 뼈가 성장하는 과정에서 불필요하게 된 뼈조직을 파괴 또는 흡수하는 대형의 다핵세포로써, 파골세포 전구체(osteoclast precursor)로부터 분화되는 세포이다. 파골세포 전구세포들은 M-CSF 및 RANKL 존재 하에서 파골세포로 분화되며, 융합을 통해 다핵 파골세포(multinucleated osteoclast)를 형성한다. 파골세포는 $\alpha v \beta 3$ 인테그린(integrin) 등을 통해 골에 결합하며 산성 환경을 조성하는 한편 각종 콜라게네이즈(collagenase) 및 프로테아제(protease)를 분비하여 골 흡수(bone resorption)를 일으키는데, 이러한 파골세포의 억제제는 골질환 치료의 효과적인 방법이 될 수 있다.
- [0009] 한편, 유포비아 인자 L1은 (Euphorbia Factor L1; 이하 EFL1)은 Euphorbia lathyris linne (속수자/천금자)의 씨에서 얻어진 디테르페노이드로서 방부(antiseptic), 항암(anticancer) 및 세포사멸 민감화(apoptosis sensitization) 효과가 알려져 있다(Zang JY. et al., Molecules, 2013, 18, 12793-12808). 또한 대한민국 공개특허 특2001-0028373에서 각질 박리 촉진제로서 EFL1의 의약품 또는 화장품 재료로서 용도를 개시하고 있으나, 본 발명의 EFL1의 파골세포 분화 조절 효과 및 골질환 치료용도는 현재까지 알려진 바가 없다.
- [0010] 이에 본 발명자들은, 골질환을 치료하기 위한 새로운 물질을 찾고자 파골세포의 활성을 억제하는 물질을 탐색하던 중, EFL1이 파골세포에 의한 골 흡수를 저해하는 것을 발견하여, EFL1이 골질환 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 골질환의 예방 또는 치료를 위하여, 유포비아 인자 L1 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 유포비아 인자 L1 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다,
- [0013] 아울러, 본 발명은 유포비아 인자 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 골질환의 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명의 유포비아 인자(Euphorbia Factor)또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 파골세포 분화와 관련된 중요한 인자들을 억제함으로써, 파골세포의 분화를 억제하여 골 흡수를 저해하는 효과가 있으며 전임상 및 임상 연구에 유용하게 활용될 수 있다. 또한, 파골세포의 불균형에 의하여 유발되는 골 관련 질환을 치료할 수 있으므로, 골 관련 질환의 예방 또는 치료제 개발에 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 EFL1의 농도에 따른 RANKL이 처리된 파골세포 전구세포(BMMs)의 분화에 대한 본 발명의 조성물인 EFL1의 농도 및 시간 별 효과를 나타내는 도이다:

- A: 다양한 농도의 EFL1 존재 하에서 RANKL에 의해 분화된 파골세포의 TRAP 염색;
- B: 상기 A의 TRAP 염색된 다핵의 파골세포 수의 분석;
- C: EFL1의 농도별 세포독성 분석 (M: M-CSF/ M+R: M-CSF 및 RANKL);
- D: EFL1 존재 하에서 다양한 시간 동안 RANKL에 의해 분화된 파골세포의 TRAP 염색;
- E: 상기 D의 TRAP 염색된 다핵의 파골세포 수의 분석; 및
- F: EFL1의 시간별 세포독성 분석 (Veh: Vehicle).

도 2는 RANKL이 처리된 파골세포 전구세포(BMMs)의 NFATc1 및 타겟 유전자들의 발현에 대한 본 발명의 조성물인 EFL1의 효과를 나타내는 도이다:

- A: NFATc1의 발현에 대한 EFL1의 농도별 효과;
- B: NFATc1의 발현에 대한 EFL1의 시간별 효과; 및
- C: NFATc1 및 타겟 유전자들의 mRNA 발현에 대한 EFL1의 효과.

도 3은 RANKL이 처리된 파골세포 전구세포(BMMs)에서 NF- κ B 활성화 및 c-FOS 발현에 대한 본 발명의 조성물인 EFL1의 효과를 나타내는 도이다:

- A: I κ B α 의 인산화 및 분해에 대한 EFL1의 효과;
- B: NF- κ B 타겟 유전자의 발현에 대한 EFL1의 효과;
- C: c-Fos의 발현에 대한 EFL1의 효과; 및
- D: c-Fos 및 NF- κ B 타겟 유전자의 mRNA 발현에 대한 EFL1의 효과.

도 4는 RANKL이 처리된 파골세포 전구세포(BMMs)에서 MAPKs와 AKT의 인산화에 대한 본 발명의 조성물인 EFL1의 효과를 나타내는 도이다.

도 5는 RANKL이 처리된 파골세포 전구세포(BMMs)에서 CREB-PGC-1 β 의 활성화에 대한 본 발명의 조성물인 EFL1의

효과를 나타내는 도이다:

A: PGC-1 β 및 타겟 유전자들의 mRNA 발현에 대한 EFL1의 효과;

B: PGC-1 β 의 발현에 대한 EFL1의 효과; 및

C: CREB의 인산화에 대한 EFL1의 효과.

도 6은 RANKL이 처리된 파골세포 전구세포(BMMs)에서 Nrf2와 이의 타겟 유전자들의 활성 및 활성산소의 생성에 대한 본 발명의 조성물인 EFL1의 효과를 나타내는 도이다:

A: Nrf2 및 타겟 유전자들의 mRNA 발현에 대한 EFL1의 효과;

B: Nrf2 및 항산화효소를 비롯한 타겟 단백질들의 발현에 대한 EFL1의 효과; 및

C: 세포 내 활성산소 축적에 대한 EFL1의 효과.

도 7은 파골세포 분화 및 NFATc1과 PGC-1 β , 그리고 이들의 타겟 유전자들의 발현에 대한 본 발명의 조성물인 EFL1의 노출시점 별 효과를 나타내는 도이다:

A: 파골세포 분화에 대한 EFL1의 노출시점 별 효과;

B: NFATc1 및 타겟 유전자들의 mRNA 발현에 대한 EFL1의 노출시점 별 효과; 및

C: PGC-1 β 및 타겟 유전자들의 mRNA 발현에 대한 EFL1의 노출시점 별 효과.

도 8은 RANKL이 처리된 파골세포 전구세포(BMMs)의 액틴링 형성과 dentine disc에서의 골 흡수에 대한 본 발명의 조성물인 EFL1의 노출시점 별 효과를 나타내는 도이다:

A: EFL1의 노출시점 실험설계를 보여주는 도표;

B: 액틴링의 형성에 대한 EFL1의 노출시점 별 효과; 및

C: 골 흡수에 대한 EFL1의 노출시점 별 효과.

도 9는 파골세포의 사멸에 대한 본 발명의 조성물인 EFL1의 효과를 나타내는 도이다:

A: EFL1의 처리시간에 따른 분화된 파골세포의 형태 변화;

B: 분화된 파골세포에서 EFL1의 세포독성 분석; 및

C: 분화된 파골세포의 사멸에 대한 EFL1의 효과.

도 10은 LPS 유도성 염증에 의한 골 손상에 대한 본 발명의 조성물인 EFL1의 억제효과를 나타내는 도이다:

A: TRAP과 Hematoxylin으로 염색된 두개골 절단면의 사진; 및

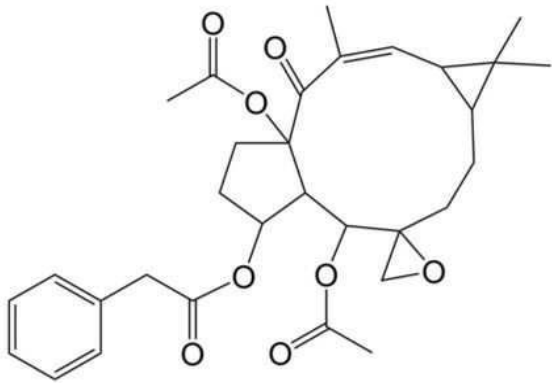
B: 상기 A의 bone cavity와 파골세포의 수의 분석.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0017] 본 발명이 유효성분으로 함유하는 유포비아 인자 L1 (Euphorbia Factor L1; 이하 EFL1)은 Euphorbia lathyris linne (속수자/천금자)의 씨에서 얻어진 디테르페노이드(diterpenoid)로써, 하기 화학식 1로 기재되는 구조를 갖는다:

화학식 1



- [0018]
- [0019] 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명의 유포비아 인자 L1은 0.1 내지 20 μ M 농도인 것이 바람직하다. 농도 0.1 μ M 미만의 농도를 갖는 유포비아 인자 L1 조성물은 골질환의 치료 효율이 저하되는 문제점이 있고, 20 μ M 이상이면 세포에 독성이 생길 수 있는 문제점이 있다. 이러한 측면에서 유포비아 인자 L1을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물의 농도는 1 내지 10 μ M 인 것이 바람직할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 6 μ M일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 상기 조성물은 NFATc1, NF- κ B, c-FOS 및 PGC-1 β 의 발현 또는 활성을 감소시키는 것을 특징으로 하고, Nrf2의 발현 또는 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하며, 세포 내 활성산소의 생성을 억제하고 파골세포의 사멸을 촉진하며 염증에 의한 골 손상을 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [0022] 아울러, 본 발명의 조성물이 적용될 수 있는 골질환으로는 성장기 발육부진, 골절, 과도한 파골세포의 골 흡수에 의한 골다공증(osteoporosis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 치주질환(periodontal disease), 파제트병(Paget disease) 및 전이성 골암(metastatic bone cancers)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명의 구체적인 실험 예에서, 상기 화학식 1로 기재되는 유포비아 인자 L1(이하 EFL1)가 RANKL에 의한 파골세포 분화를 효과적으로 억제함을 확인하였다(도 1 참조). 또한 EFL1을 처리하였을 때, 파골세포 분화에서 가장 중요하게 알려져 있는 transcription factor인 NFATc1 단백질과 그 타겟 유전자인 CK, MMP9 및 TRAP 유전자의 mRNA 발현이 억제되었다(도 2 참조).
- [0024] 또한, EFL1 존재 하에서 I κ B α 의 인산화가 억제되고 NFATc1의 upstream 조절자로 알려진 NF- κ B 활성 및 그 타겟 유전자인 SOD2의 발현이 억제되며 c-Fos 발현도 유의적으로 억제되는 것을 확인하였다(도 3 참조).
- [0025] 또한, EFL1이 PGC-1 β 및 그 타겟 유전자인 ND4, COX1, COX3의 mRNA 발현을 저해하는 것을 확인하였으며(도 5 참조), EFL1에 의해 Nrf2와 대표적 타겟 유전자인 NQO1과 Srx의 mRNA 발현이 함께 증가되는 것을 확인하였다. 그리고 동시에 Nrf2와 항산화 효소를 비롯한 Nrf2 타겟 단백질인 Srx, Prxl, PrxV, PrxVI, Trx1 및 TrxR1 항산화 효소들의 발현도 증가되었다. 또한 EFL1에 의해 활성산소의 발생이 감소하는 것을 확인하였다(도 6 참조).
- [0026] 또한, EFL1이 분화된 파골세포의 유지, 액틴링 형성 및 dentine disc에서 골 흡수를 저해하며(도 7 및 8 참조), 파골세포의 사멸을 촉진함을 확인하였고(도 9 참조), LPS 염증에 의한 골의 손상을 억제함을 확인하였다(도 10 참조).
- [0027] 따라서, 본 발명의 유포비아 인자 L1을 유효성분으로 함유하는 조성물은 골질환의 예방 또는 치료를 위해 유용하게 사용될 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물뿐만 아니라, 이의 약학적으로 허용되는 염, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 라세이체 또는 입체이성질체를 모두 포함한다.

- [0029] 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸이도에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설포산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 숙시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.
- [0030] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 동량의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 및 산 수용액 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조하거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.
- [0031] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능 한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조 시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.
- [0032] 상기 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.
- [0033] 경구 투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0034] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다.
- [0035] 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 81, 카카오지, 타우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 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, 유효용량 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 의학 분야에 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 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0037] 구체적으로, 본 발명에 따른 화합물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.1 mg 내지 100 mg, 바람직하게는 0.5 mg 내지 10 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 질환의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- [0038] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용될 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명은 유포비아 인자 L1 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 골질환의 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0040] 상기 골질환은 성장기 발육부진, 골절, 과도한 파골세포의 골 흡수에 의한 골다공증(osteoporosis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 치주질환(periodontal disease), 파제트병(Paget disease) 및 전이성 골암(metastatic bone cancers)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 본 명세서의 "건강기능식품"이란 일상 식사에서 결핍되기 쉬운 영양소나 인체에 유용한 기능을 가진 원료나 성분 (기능성 원료)을 사용하여 제조한 것으로, 인체의 정상적인 기능을 유지하거나 생리기능 활성화를 통하여 건강을 유지하고 개선하는 식품으로 식품의약품안전처장이 정한 것을 의미하나, 이에 한정되지 않으며 통상적인 의미의 건강식품을 배제하는 의미로 사용된 것이 아니다.
- [0042] 본 발명의 조성물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강기능식품 중의 상기 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취 시에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 조성물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 단당류, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 이당류, 예를 들어 말토스, 수크로스 등; 및 다당류, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제{타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진 등)} 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 g 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.
- [0044] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일 주스 및 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0045] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0046] 이하, 본 발명을 실험예에 의해서 상세히 설명한다
- [0047] 단, 하기의 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실험예에 의해서 한정되는 것은 아니다.
- [0048] <실험예 1> EFL1의 파골세포 분화 억제
- [0049] 본 발명이 유효성분으로 함유하는 유포비아 인자 L1(이하 EFL1)은 ChemFaces사의 CFN92883/76376-43-7 제품을 사용하여 실험에 사용하였다.
- [0050] 우선 EFL1의 파골세포 분화 억제 효과를 확인하기 위하여, BMM(Bone Marrow-Derived Macrophages) 세포를 대상으로 하여 실험을 수행하였다. BMM 세포는 파골세포(osteoclast)로 분화 할 수 있는 precursor cell로써, 본 실험에서는 8주령 C57BL/6 수컷 마우스의 대퇴골과 경골의 골수(Bone marrow)에서 추출한 세포를 사용하였다.
- [0051] 다양한 농도(0, 4, 6, 8 μ M)의 EFL1 존재 하에서 BMM(Bone Marrow-Derived Macrophages) 세포에 50 ng/ml의 RANKL을 3일 동안 처리하여 파골세포로 분화시키고 PBS 워싱처리 후 4% paraformaldehyde로 고정된 뒤 leukocyte acid phosphatase cytochemistry kit (Sigma?Aldrich)를 사용하여 TRAP 염색한 후, TRAP 염색된 3개

이상의 다핵을 가진 파골세포의 수를 현미경으로 분석하였다.

[0052] 그 결과, 6 μ M의 EFL1에서부터 파골세포 분화가 효과적으로 억제되었다(도 1의 A 및 B).

[0053] 또한, EFL1의 파골세포 분화 억제효과가 세포독성에 의한 것임을 배제하기 위하여, EASY Cyttox (WST-1) assay kit로 세포독성을 분석하였다. BMM 세포를 각각 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt (WST-1) reagent (Roche Applied Science)를 10 μ l씩 넣어 주고 37 $^{\circ}$ C에서 2 - 4시간 배양한 뒤, 450nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[0054] 그 결과, 8 μ M 농도 까지 EFL1에 의한 세포독성이 나타나지 않는 것을 확인하였다(도 1의 C). 또한, BMM 세포를 6 μ M EFL1의 존재 하에 RANKL을 3 에서 5일 동안 처리하여 분화시킨 경우에도 파골세포 분화가 유의적으로 억제되었으며(도 1의 D 및 E), 5일까지 세포독성이 나타나지 않는 것을 확인하였다(도 1의 F). 이는 EFL1의 파골세포 분화 억제효과가 세포사멸에 의한 것이 아님을 보여준다.

[0055] <실험예 2> EFL1에 의한 NFATc1 활성화 억제

[0056] EFL1의 파골세포 분화 억제 효과를 확인하기 위하여, 다양한 농도(0, 4, 6, 8 μ M)의 EFL1 존재 하에서 BMM 세포에 2일 동안 50 ng/ml 의 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화시키고, 파골세포의 분화에서 가장 중요하게 알려져 있는 transcription factor인 NFATc1 단백질의 발현을 확인하기 위해 NFATc1에 대한 항체를 사용한 immunoblot을 수행하였다.

[0057] 10% polyacrylamide gel을 이용하여 단백질을 분리하고, 분리된 단백질을 nitrocellulose membranes에 옮겨주었다. TBST(0.05% Tween-20 in Tris-buffered saline, pH 7.4)에 녹인 5% 탈지유를 이용하여 막에 있는 비특이적 결합부위를 모두 블로킹하였다. 일차항체(mouse monoclonal antibodies, Santa Cruz Biotechnology Inc)를 14시간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 처리한 후 이차항체를 1시간 동안 상온에서 처리하여 West save Up (Ab Frontier)으로 분석하였다.

[0058] 그 결과 NFATc1 단백질은 4 μ M EFL1 농도에서부터 상당히 억제되었으며(도 2의 A), 5일까지 억제효과가 지속되는 것을 확인하였다(도 2의 B).

[0059] 또한, NFATc1의 타겟 유전자인 CK, MMP9 및 TRAP 유전자의 mRNA 발현 변화를 real time-PCR을 사용하여 확인하였다.

[0060] real time-PCR을 위해, Trizol reagent (Invitrogen)을 사용하여 총 RNA를 추출하여 260 nm의 흡광도에서 정량 분석하였으며, 총 RNA를 0.5 mg의 oligo(dT) primers를 포함, 총 15 ml가 되게하여 70 $^{\circ}$ C에서 5분간 인큐베이션한 후, 얼음에서 바로 식혀주었다. cDNA 처음 가닥은 M-MLV reverse transcriptase (Promega) 200 units, ribonuclease inhibitor 24 units 및 각각의 dNTP 0.25 mM를 포함한 최종볼륨 25 μ l에서 42 $^{\circ}$ C에서 1시간, 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 합성하였다. 희석 cDNA template의 0.8 μ l씩(1:2.5)을 2X SYBR Green PCR Master Mix(M Biotech) 10 μ l, 각 gene-specific primer(제노텍) 10 μ M 의 1 μ l씩을 포함한 최종 20 μ l 볼륨에서 ABI 7300 real time PCR System (Applied Biosystems)을 사용하여 증폭시켰으며, 증폭은 50 $^{\circ}$ C에서 2분간, 95 $^{\circ}$ C에서 2분간, 다음으로 95 $^{\circ}$ C에서 15초간, 60 $^{\circ}$ C에서 1분간 40 사이클을 수행하여 실험하였다. 실험에서 사용한 Primer의 서열은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0061] real-time PCR primer의 서열 및 amplicon 크기

Gene		Primer(sense & antisense)	서열번호	Amplicon length(bp)
1	NFATc1	5'-CTTCAGCTGGAGGACACC-3'	1	79
		5'-CCAATGAACAGCTGTAGCG-3'	2	
2	CK	5'-ACCACTGCCTTCCAATACG-3'	3	99
		5' -CGTGGCGTTATACATACAAC-3'	4	
3	MMP9	5' -AGACGACATAGACGGCATC-3'	5	97
		5' -TGCTGTCGGCTGTGGTTC-3'	6	
4	TRAP	5'-CCAGCGACAAGAGGTTCC-3'	7	113
		5'-AGAGACGTTGCCAAGGTGAT-3'	8	
5	SOD2	5'-ATTAACGCGCAGATCATGCA-3'	9	161
		5'-TGTCCCCCACCATTGAACTT-3'	10	

6	COX2	5'-GATCATAAGCGAGGACCTG-3'	11	85
		5'-GTCTGTCCAGAGTTTCACC-3'	12	
7	c-Fos	5'-GAGAAACGAGAATCCGAAG-3'	13	97
		5'-GAGAAACGAGAATCCGAAG-3'	14	
8	PGC-1 β	5'-CTCCAGGCAGGTCAACCC-3'	15	83
		5'-GGGCCAGAAGTCCCTTAGG-3'	16	
9	ND4	5'-CATCACTCTATTCTGCCTAGCAA-3'	17	74
		5'-TCCTCGGGCCATGATTATAGTAC-3'	18	
10	COX1	5'-TTTTCAGGCTTACCCTAGATGA-3'	19	81
		5'-GAAGAATGTTATGTTTACTCTACGAATATG-3'	20	
11	COX3	5'-CGGAAGTATTTTTCTTTGAGGAT-3'	21	82
		5'-CAGCAGCCTCCTAGATCATGTG-3'	22	
12	Cytb	5'-GCCACCTTGACCCGATTCT-3'	23	64
		5'-TTGCTAGGGCCGCGATAAT-3'	24	
13	Nrf2	5'-TCTCTCGCTGGAAAAAGAA-3'	25	498
		5'-AATGTGCTGGCTGTGCTTTA-3'	26	
14	NQO1	5'-TTCTCTGGCCGATTACAGAG-3'	27	180
		5'-GGCTGCTTGGAGCAAAATAG-3'	28	
15	Srx	5'-AGCCTGGTGGACACGATC-3'	29	97
		5'-AGGAATAGTAGTAGTCGCCA-3'	30	
16	b-actin	5'-ACCCTAAGGCCAACCGTG-3'	31	81
		5'-GCCTGGATGGCTACGTAC-3'	32	

CK, cathepsin K; MMP9, matrix metalloprotease 9; SOD2, superoxide dismutase 2; COX2, cyclooxygenase 2

[0062] 그 결과, 6 μ M EFL1 존재 하에서 2일 동안 50 ng/ml RANKL을 처리하였을 때, NFATc1과 그 타겟 유전자인 CK, MMP9 및 TRAP 유전자의 mRNA도 발현이 현저히 억제되는 것을 확인하였다(도 2의 C).

[0063] <실험예 3> EFL1에 의한 NF- κ B 및 c-FOS 조절

[0064] EFL1이 NFATc1의 upstream 조절자로 알려진 NF- κ B 활성화와 c-Fos 발현을 조절하는지 확인하기 위하여, I κ B α 와 p-I κ B α 에 대한 항체(rabbit polyclonal antibodies, Cell Signaling Technology)를 사용한 immunoblot으로 I κ B α 의 인산화 정도를 확인하였고, SOD2 및 c-FOS 단백질 발현도 항체(SOD2/rabbit polyclonal antibody, Upstate; c-FOS/rabbit polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology, Inc)를 이용한 immunoblot으로 확인하였으며, SOD2 및 c-Fos mRNA 발현을 상기 실험예 2에 기재된 방법으로 real-time PCR로 분석하였다(표 1 primer 서열 참조).

[0065] 그 결과, EFL1(6 μ M)은 RANKL(50 ng/ml)의 존재 하에서 I κ B α 의 인산화를 상당히 저해하였고(도 3의 A), NF- κ B 타겟 유전자인 SOD2의 단백질 및 mRNA 발현도 유의적으로 억제하였다(도 3의 B 및 D). 또한 EFL1은 c-Fos의 단백질과 mRNA 발현도 유의적으로 억제하는 것을 확인하였다(도 3의 C 및 D).

[0066] <실험예 4> EFL1에 의한 MAPKs 및 AKT 활성 억제

[0067] RANKL에 의해 활성화되는 MAPKs와 AKT에 대한 EFL1의 효과를 보기 위하여, 이들의 항체(phospho-JNK, phospho-ERK, phospho-p38, phospho-AKT에 대한 Rabbit polyclonal antibodies, AKT에 대한 rabbit monoclonal antibody, Cell Signaling Technology; JNK1, p38에 대한 Rabbit polyclonal antibodies, ERK2 mouse monoclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 이용한 immunoblot으로 MAPKs와 AKT 단백질의 인산화 정도를 비교해본 결과, RANKL에 의한 MAPKs와 AKT의 인산화는 EFL1에 의해 영향을 받지 않음을 확인하였다(도 4).

[0068] <실험예 5> EFL1에 의한 PGC-1 β 활성 억제

[0069] PGC-1 β 는 RANKL에 의해 활성화되고 파골세포 분화과정에도 관여하는 것으로 잘 알려진 전사인자이다. EFL1의 PGC-1 β 조절효과를 확인하기 위하여, real-time PCR을 통해 PGC-1 β 와 그 타겟 유전자인 ND4, COX1 및 COX3의 mRNA 발현을 확인하였다(표 1 primer 서열 참조).

[0070] 그 결과, EFL1(6 μ M)은 RANKL(50 ng/ml)에 의한 PGC-1 β , ND4, COX1 및 COX3 mRNA 발현을 상당히 억제하였다

(도 5의 A). 또한, EFL1은 PGC-1 β (rabbit polyclonal antibody, Abcam) 단백질의 발현도 저해하였으나, PGC-1 β 의 상위 전사인자인 CREB(phospho-CREB rabbit monoclonal antibody, Cell Signaling Technology; CREB mouse monoclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology, Inc)의 인산화에는 영향을 주지 않았다(도 5의 B 및 C).

[0071] <실험예 6> EFL1에 의한 Nrf2 활성화

[0072] 레독스에 민감한 전사인자 Nrf2는 생체 내 환원제인 GSH의 합성효소와 항산화효소의 발현을 조절함으로써 파골세포의 분화에 관여한다고 알려져 있으므로, EFL1의 Nrf2 활성 조절을 통한 파골세포 분화 억제 효과를 알아보기 위하여, Nrf2, NQO1 및 Srx 유전자 발현을 real-time PCR을 통하여 확인하였고(표 1 primer 서열 참조), Nrf2의 타겟 단백질들인 NQO1, Srx, Prx1, PrxV, PrxVI, Trx1 및 TrxR1 (rabbit polyclonal antibodies, Young In Frontier)단백질 발현을 immunoblot을 통해 확인하였다.

[0073] 그 결과, Nrf2와 그 타겟 유전자인 NQO1과 Srx의 mRNA 발현이 RANKL(50 ng/ml)의 존재 하에서 EFL1(6 μ M)처리에 의해 증가하였다(도 6의 A). 또한 Nrf2와 그의 타겟 단백질인 NQO1, Srx, Prx1, PrxV, PrxVI, Trx1 및 TrxR1 항산화 효소들도 발현이 증가하는 것을 확인하였다(도 6의 B).

[0074] 또한, RANKL에 의한 파골세포의 분화에서 활성산소가 생성되며 분화과정에도 관여한다는 것이 잘 알려져 있고, EFL1가 Nrf2를 활성화시켜 항산화 효소를 비롯한 Nrf2 타겟 단백질의 발현이 증가되었다면 이들 항산화효소에 의해 RANKL에 의해 생성되는 활성산소가 제거될 수도 있으므로 이러한 가능성을 확인해보기 위하여, EFL1 존재 하에서 RANKL을 2일 동안 처리하고 활성산소(Reactive oxygen species; ROS)를 측정하였다.

[0075] ROS의 측정은 CM-H2DCFDA를 사용한 산화제 민감 형광 탐지 방식으로 진행하였다. CM-H2DCFDA는 ROS와 반응하여 형광을 내므로, 세포를 RANKL로 처리 후 HBSS로 워싱한 뒤, 5 μ M의 CM-H2DCFDA를 어두운 곳에서 10분간 처리하고 FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences)를 사용하여 분석하였다.

[0076] 그 결과, EFL1의 존재 하에서 세포 내 활성산소가 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(도 6의 C 좌).

[0077] 또한, EFL1이 항산화제로써 직접 활성산소를 제거할 수 있는 가능성을 확인해보기 위해 EFL1 (6 μ M)를 30분간 전 처리하고 RANKL (도 6의 C, 중) 혹은 H₂O₂ (도 6의 C, 우)를 15분간 처리한 후 상기와 같이 CM-H2DCFDA를 사용하여 활성산소를 측정하였다.

[0078] 그 결과, EFL1에 의해 세포 내 활성산소가 감소하는 것을 확인하였다(도 6의 C, 중 및 우). EFL1이 Nrf2 활성화에 의한 항산화효소의 발현이 일어나기 전 짧은 시간 동안만 전처리 되었으므로, 이 결과는 EFL1에 의해 활성산소가 직접 제거될 수 있음을 의미한다.

[0079] <실험예 7> EFL1에 의한 파골세포의 골 흡수 억제

[0080] EFL1의 파골세포의 분화억제 작용시점을 알아보기 위하여, RANKL을 처리하여 BMM 세포를 파골세포로 분화시키는 동안, 여러 시점 (E0, RANKL 처리시; E1, RANKL 1일 처리 후; E2, RANKL 2일 처리 후)에서 EFL1에 노출시키고 TRAP 염색된 다핵의 파골세포의 수를 분석하였다.

[0081] 그 결과, EFL1(6 μ M)을 RANKL(50 ng/ml)과 함께 처리하였을 때(E0)와 마찬가지로 2일 후 EFL1을 처리하였을 때(E2)에도 파골세포의 형성을 현저히 억제하였다(도 7의 A). 동일한 실험조건에서 NFATc1과 그 타겟 유전자들인 CK, MMP9, TRAP의 발현 또한 real-time PCR을 통해 측정해 본 결과(표 1 primer 서열 참조), RANKL을 처리하고 2일 후에 처리된 EFL1에 의해서 RANKL과 함께 처리 되었을 때와 마찬가지로 유의적으로 억제 되었다(도 7의 B). 그리고 PGC-1 β 와 그 타겟 유전자인 ND4, COX1, COX3, Cyt b의 발현 또한 RANKL을 처리하고 2일 후에 노출된 EFL1에 의해서 유의적으로 억제 되는 것을 확인하였다(도 7의 C).

[0082] 또한 유사한 실험조건에서 EFL1이 액틴 링(acting ring)의 형성과 골 흡수에 미치는 영향을 보기 위하여, BMM 세포에 3일 동안 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화시킨 후 EFL1을 처리한 세포와, EFL1을 RANKL과 함께 처리한 세포를 다음과 같이 고정하고 액틴링과 핵을 염색하거나 dentine disc에서 골 흡수 정도를 분석하였다. 3.7 % formaldehyde가 첨가된 PBS에서 세포를 고정하여 0.1 % Triton X-100 처리를 한 뒤, Alexa Fluor 488-phalloidin(Invitrogen)을 20 분간 처리하고, 다시 DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole, Roche)로 염색하여 형광 현미경을 통해 관찰하였다. 또한 골 흡수 정도는 dentine disc(Immunodiagnostic Systems Ltd)에 배양된 BMM 세포들을 상기와 같은 조건으로 처리 후, cotton tip을 사용하여 세포들을 제거한 뒤 재흡수 구멍(resorption pit)을 hematoxylin으로 염색하여 현미경 100배율로 촬영한 사진을 Image-Pro Plus 4.5 software

(Media Cybernetics)로 분석하였다.

[0083] 그 결과, EFL1이 처리시점에 상관없이 두 경우 모두 액틴 링(acting ring)의 형성과 dentine disc에서 파골세포에 의한 골 흡수를 완전히 억제하는 것을 확인하였다(도 8의 A, B 및 C). 이러한 결과는 EFL1이 파골세포의 형성과 골 흡수 기능을 저해할 수 있음을 보여준다.

[0084] <실험예 8> EFL1에 의한 파골세포의 사멸

[0085] BMM 세포를 파골세포로 분화시킨 후 처리한 EFL1에 의해 파골세포와 액틴 링의 형성 및 골 흡수 등이 억제된 것이 EFL1이 분화된 파골세포의 사멸을 유도하여 기인된 것인지를 알아보기 위하여, 분화된 파골세포에 EFL1(6 μ M)을 처리하고 시간(0, 6, 12, 18h)에 따른 세포의 모양 변화를 현미경을 통해 관찰하였다.

[0086] 그 결과, vehicle만 처리한 파골세포는 세포들이 융합하여 더욱 커진 반면 EFL1을 처리한 파골세포는 시간이 지남에 따라 세포의 윤곽이 사라졌다(도 9의 A). 또한 WST-1 assay를 통해 세포성장을 측정해 본 결과, EFL1이 세포의 성장을 저해하는 것을 확인하였다(도 9의 B). 이러한 결과는 상기 실험예 1에서 보였듯, EFL1이 BMM 세포의 성장에는 영향을 주지 않으나 분화된 파골세포의 성장을 저해한다는 것을 보여준다.

[0087] 또한, 같은 조건에서 분화된 파골세포의 사멸을 유도하는지를 확인하기 위해, 다음과 같이 파골세포를 고정한 후 DAPI 염색 및 TUNEL assay를 수행하였다: 파골세포를 4% formaldehyde로 상온 60분간 고정하고 PBS로 워싱한 뒤, In Situ Cell Death Detection Kit TMR red (Roche)를 사용하여 세포사멸이 일어난 세포를 염색하고, 상온에서 3분동안 DAPI로 핵을 염색한 뒤 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과, EFL1이 분화된 파골세포의 사멸을 유도하는 것을 확인하였다(도 9의 C).

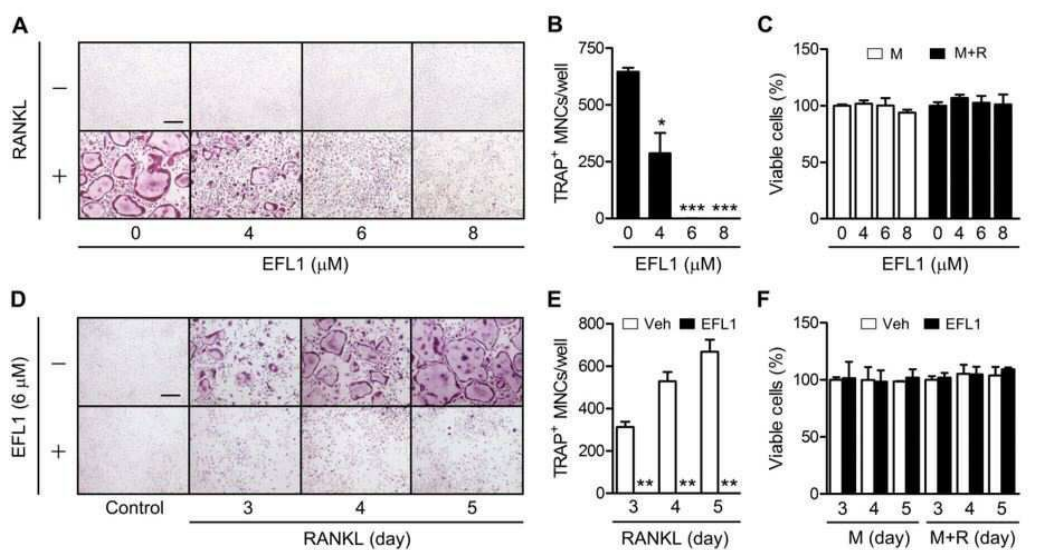
[0088] <실험예 9> EFL1의 염증에 의한 골 손상 억제

[0089] EFL1의 염증에 의해 유발되는 골 손상 억제효능을 동물모델에서 확인하기 위해, 마우스 두개골에 염증유도물질인 LPS(Lipopolysaccharide, 12.5 mg/kg body weight)를 하루 간격을 두고 2회 주입하였다. 이 때 Vehicle (40% DMAC + 10% Tween 80 + 50% distilled water) 또는 EFL1 (10mg/kg)이 함께 투여되었고, 첫 주입 5일 후에 두개골을 4% paraformaldehyde로 고정하고 PBS 워싱하였다. 또한 0.5 M ethylenediaminetetraacetic acid로 7일간 석회질을 제거하고, 파라핀 블록을 만든 후 절단하여 TRAP과 Hematoxylin으로 염색한 뒤 관찰하였다.

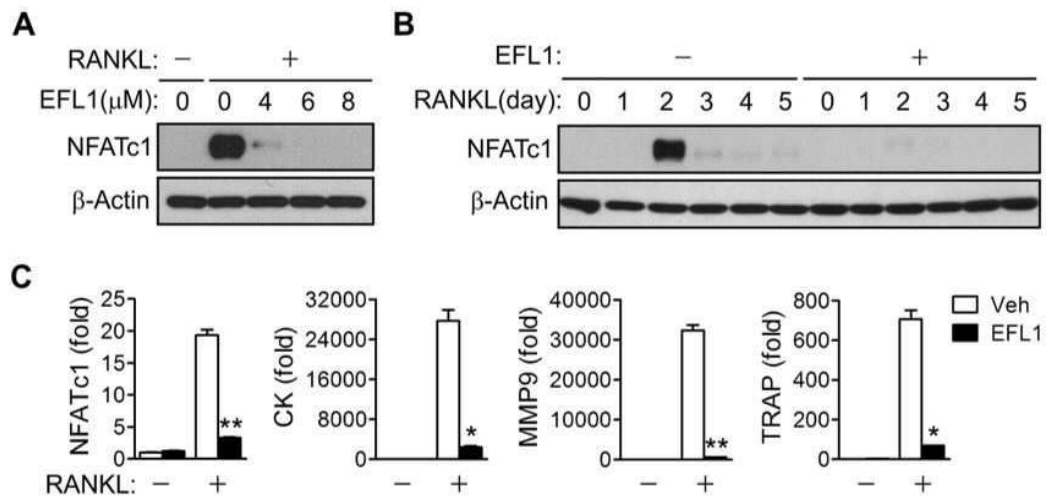
[0090] 그 결과, LPS만 처리한 두개골에서는 TRAP 염색된 부분이 많았으나, EFL1를 함께 처리한 두개골에서는 TRAP 염색된 부분이 현저히 감소된 것을 확인하였다(도 10의 A). 또한 이를 정량적으로 분석한 결과, LPS 처리에 의해 증가된 bone cavity와 파골세포의 수가 EFL1에 의해 상당히 감소되는 것을 확인하였다(도 10의 B).

도면

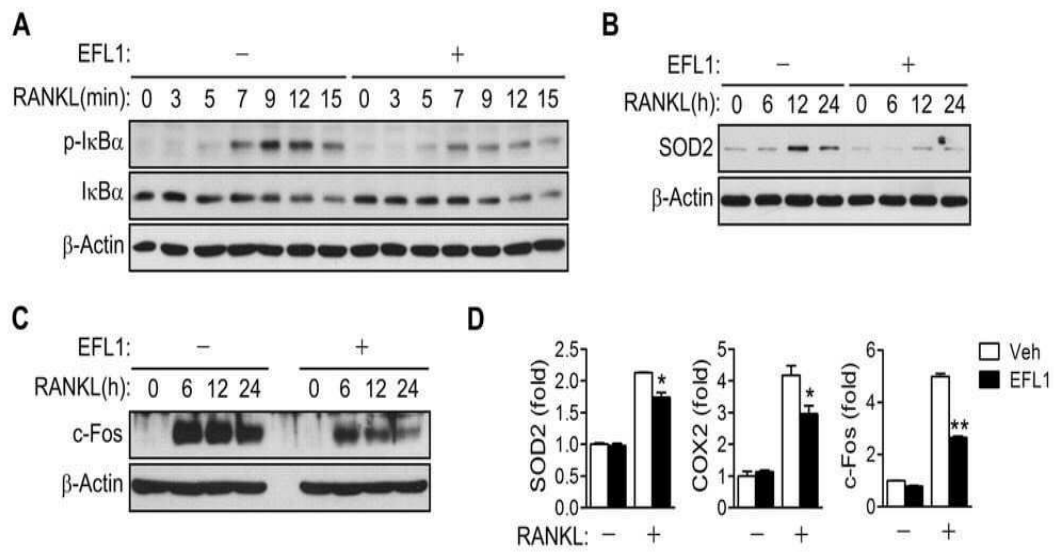
도면1



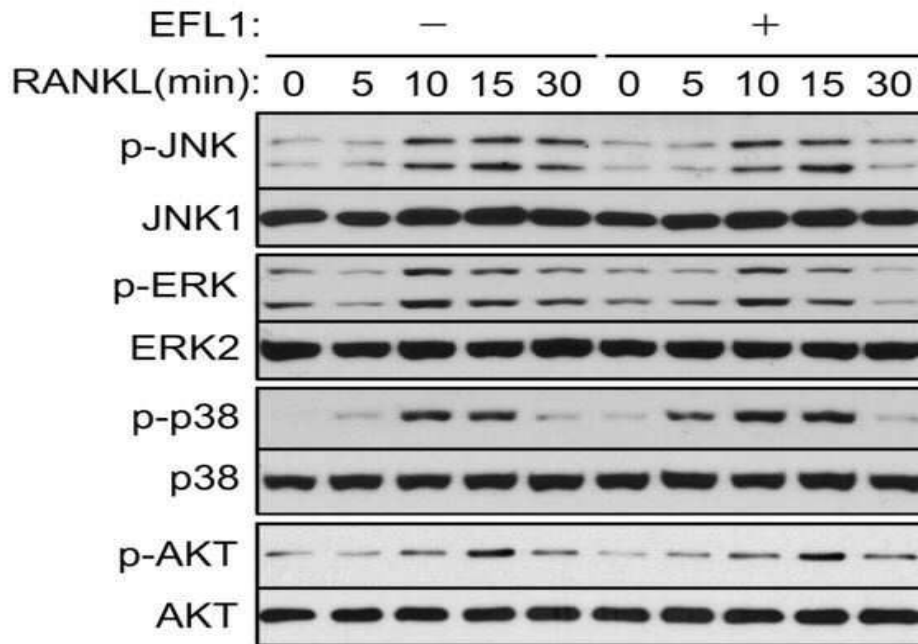
도면2



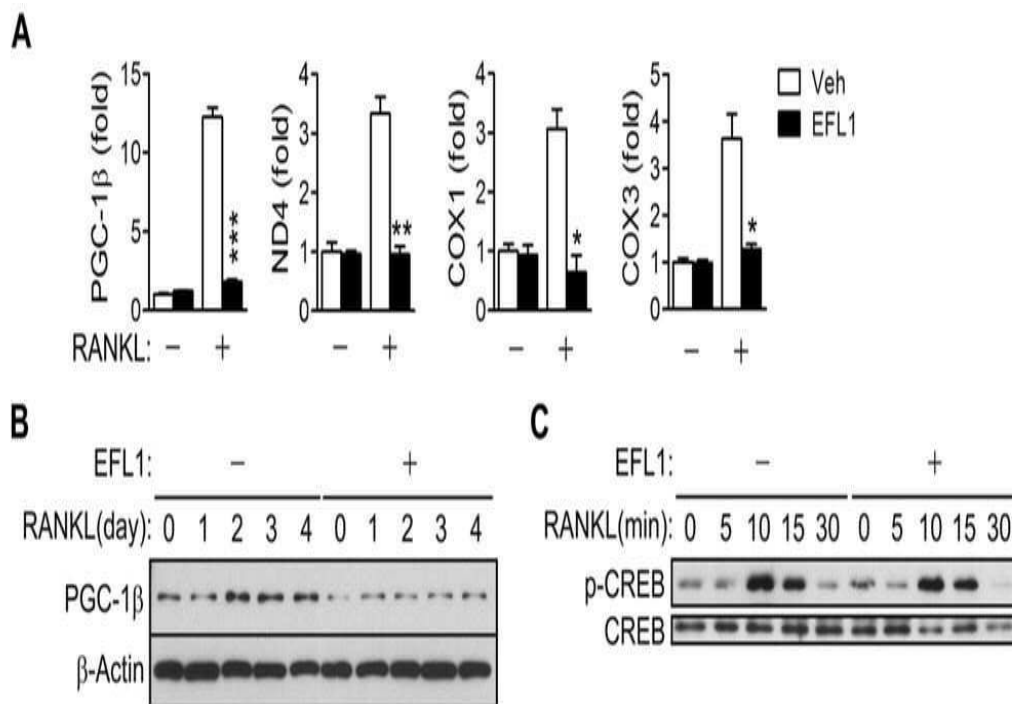
도면3



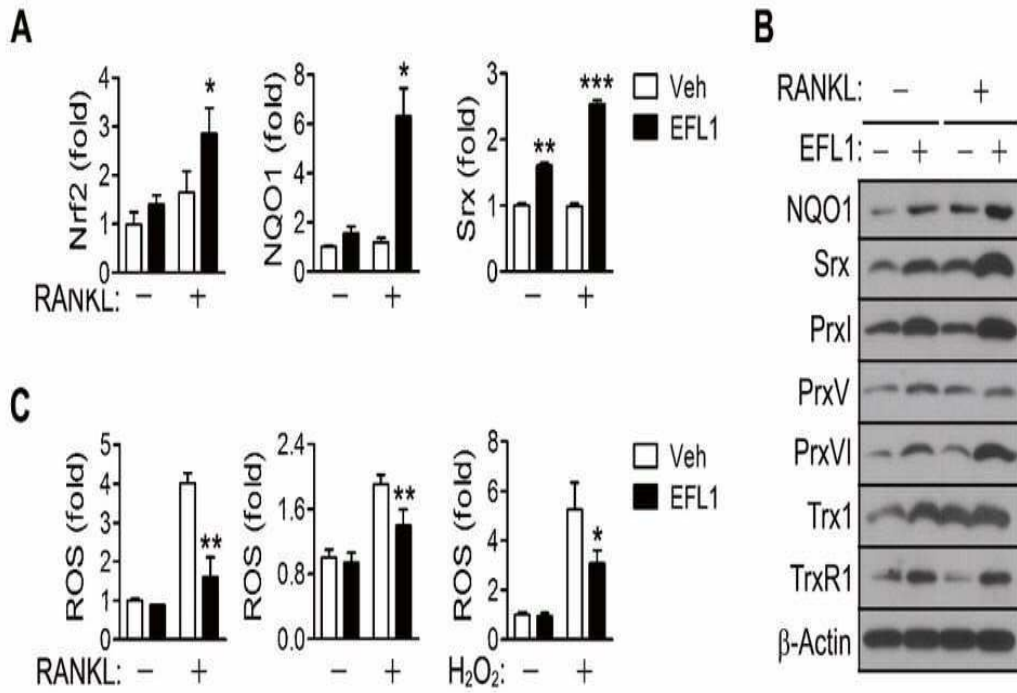
도면4



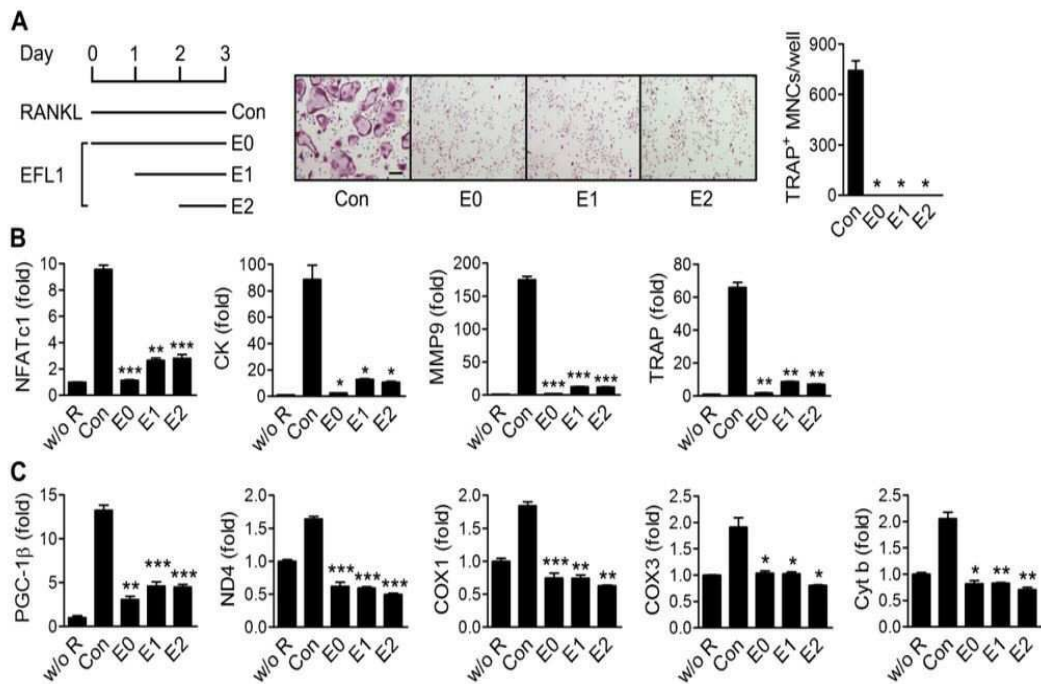
도면5



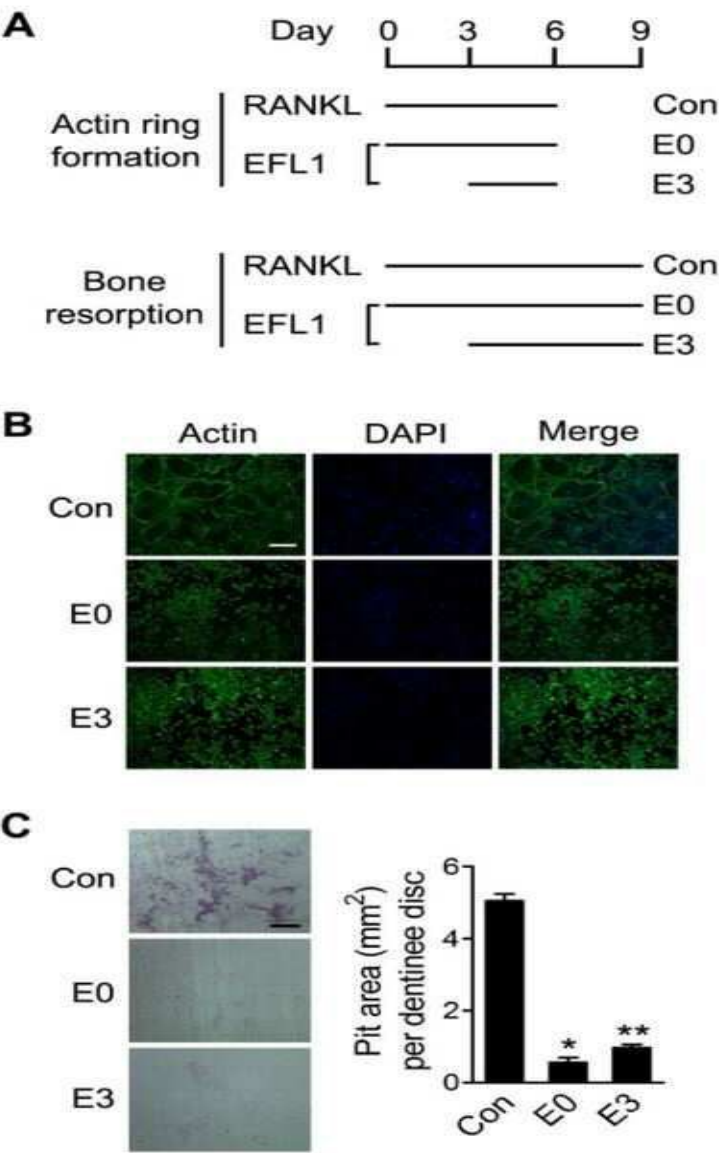
도면6



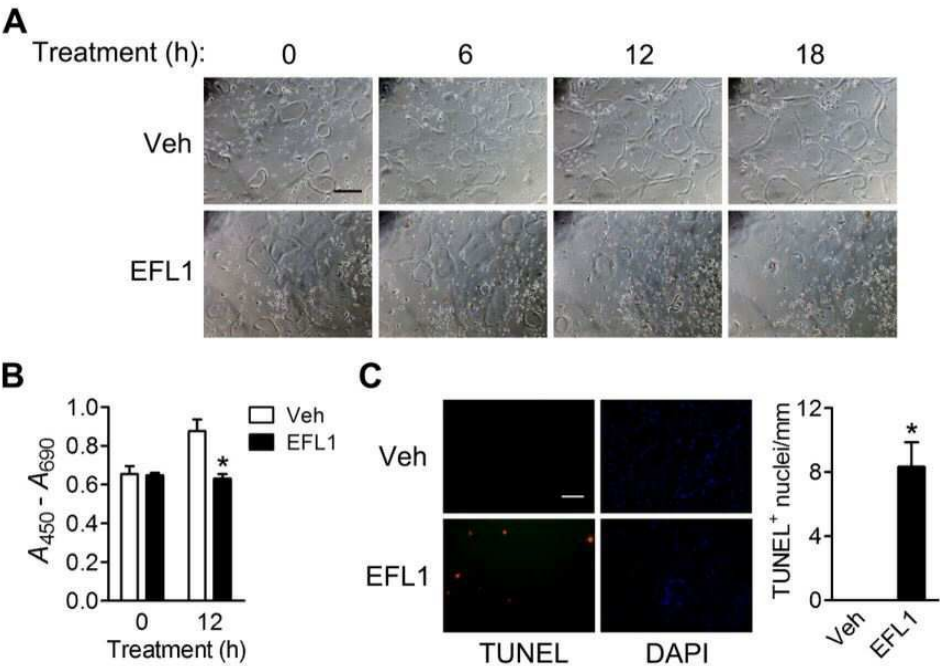
도면7



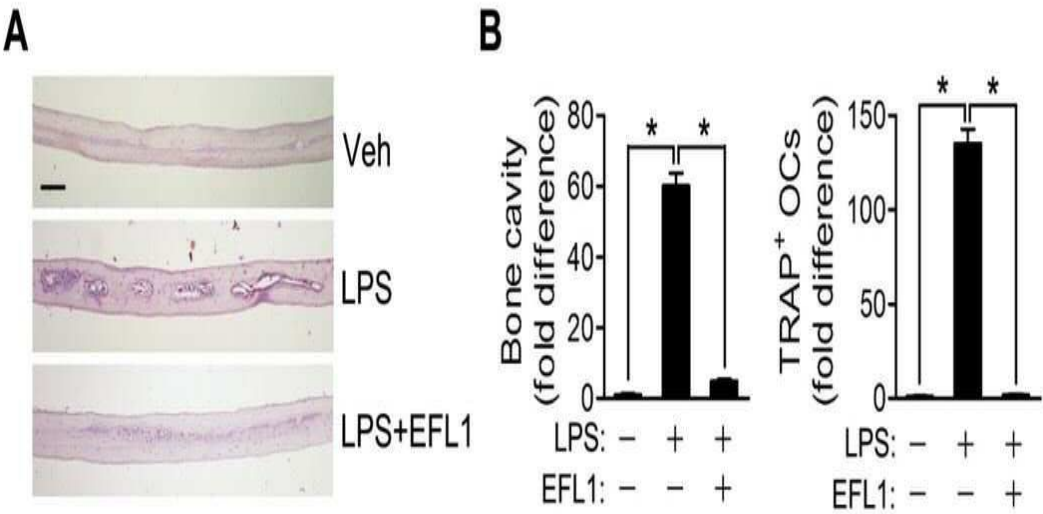
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Composition for prevention or treatment of bone disease
containing Euphorbia Factor L1 or pharmaceutically acceptable
salts thereof as an active ingredient
- <130> 2016P-03-042
- <160> 32

<170> Kopatent In 2.0
 <210> 1
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NFATc1 F
 <400> 1
 cttcagctgg aggacacc 18
 <210> 2

 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NFATc1 R
 <400> 2
 ccaatgaaca gctgtagcg 19
 <210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CK F
 <400> 3
 accactgcct tccaatacg 19
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CK R
 <400> 4
 cgtggcgtta tacataaac 20

 <210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223>	MMP9 F	
<400>	5	
agacgacata gacggcatc		19
<210>	6	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	MMP9 R	
<400>	6	
tgctgtcggc tgtggttc		18
<210>	7	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TRAP F	
<400>	7	
ccagcgacaa gaggttcc		18
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TRAP R	
<400>	8	
agagacgttg ccaagtgat		20
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SOD2 F	
<400>	9	
attaacgcgc agatcatgca		20
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SOD2 R	
<400>	10	
	tgtcccccac cattgaactt	20
<210>	11	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	COX2 F	
<400>	11	
	gatcataagc gaggacctg	19
<210>	12	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	COX2 R	
<400>	12	
	gtctgtccag agtttcacc	19
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	c-Fos F	
<400>	13	
	gagaaacgga gaatccgaag	20
<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	c-Fos R	
<400>	14	
	gagaaacgga gaatccgaag	20
<210>	15	

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PGC-1 beta F
 <400> 15
 ctccaggcag gttcaaccc 19
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PGC-1 beta R
 <400> 16
 gggccagaag ttcccttagg 20

 <210> 17
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ND4 F
 <400> 17
 catcactcct attctgccta gcaa 24
 <210> 18
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ND4 R
 <400> 18
 tcctcgggcc atgattatag tac 23
 <210> 19
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> COX1 F
 <400> 19

ttttcaggct tcaccctaga tga	23
<210> 20	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> COX1 R	
<400> 20	
gaagaatggt atgtttactc ctacgaatat g	31
<210> 21	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> COX3 F	
<400> 21	
cggaagtatt tttctttgca ggat	24
<210> 22	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> COX3 R	
<400> 22	
cagcagcctc ctagatcatg tg	22
<210> 23	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Cytb F	
<400> 23	
gccaccttga cccgattct	19
<210> 24	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	Cytb R	
<400>	24	
ttgctagggc	cgcgataat	19
<210>	25	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Nrf2 F	
<400>	25	
tctcctcgct	ggaaaaagaa	20
<210>	26	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Nrf2 R	
<400>	26	
aatgtgctgg	ctgtgcttta	20
<210>	27	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	NQ01 F	
<400>	27	
ttctctggcc	gattcagag	19
<210>	28	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	NQ01 R	
<400>	28	
ggctgcttgg	agcaaaatag	20
<210>	29	
<211>	18	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Srx F	
<400>	29	
	agcctggtgg acacgatc	18
<210>	30	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Srx R	
<400>	30	
	aggaatagta gtagtcgcca	20
<210>	31	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta-actin F	
<400>	31	
	accctaaggc caaccgtg	18
<210>	32	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta-actin R	
<400>	32	
	gcctggatgg ctacgtac	18