



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0036484
(43) 공개일자 2018년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/12 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) A61K 36/11 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/12 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0142422
(22) 출원일자 2016년10월28일
심사청구일자 2016년10월28일
(30) 우선권주장
1020160126767 2016년09월30일 대한민국(KR)
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
주식회사 코팜
경기도 고양시 덕양구 화정로 65, 1515호(화정동, 한화오벨리스크)
(72) 발명자
박길홍
서울특별시 용산구 이촌로64길 15, 107동 302호(이촌동, LG한강자이아파트)
손그림
서울특별시 강서구 공항대로 351-21, 101동 201호(등촌동, 미주진로아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이희숙, 김석만

전체 청구항 수 : 총 7 항

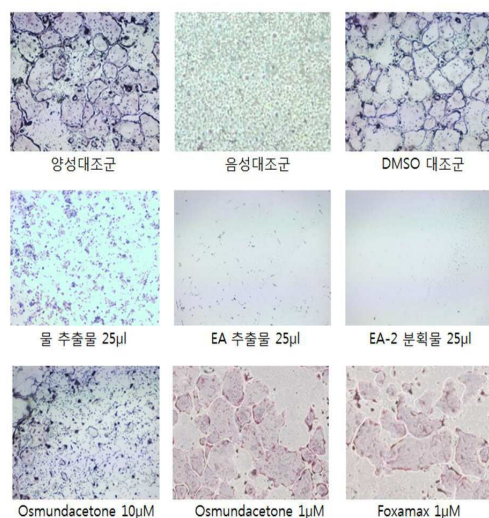
(54) 발명의 명칭 Osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 골 질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것으로, 보다 구체적으로는 osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 고비(Osmunda japonica) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 또는 골 절의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 개선용 식품용 조성물에 대한 것이다.

본 발명에 따른 조성물은 뼈 손실을 야기하는 파골세포에 대하여 강력한 증식 및 분화 억제 활성을 나타내기 때문에, 안전하고 효과적인 골 질환 치료용 의약품 또는 증상개선용 기능성 식품을 개발하는데 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A61K 36/11 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/306 (2013.01)

A23V 2250/21 (2013.01)

(72) 발명자

홍성수

경기도 화성시 봉담읍 와우로34번길 30, 116-1004호(다운마을쌍용스윗닷홈)

최춘환

경기도 용인시 기흥구 마북로 140, 102동 1102호(마북동, 동양파라곤)

최윤희

경기도 수원시 영통구 중부대로448번길 28, 207동 1902호(원천동, 원천2단지주공아파트)

김우중

경기도 수원시 팔달구 권광로 276번길 9, 103동 1905호 (삼성아파트)

박석인

서울특별시 성북구 낙산길 255, 102동 1304호 (보문동3가, 이편한세상보문)

이기호

서울특별시 도봉구 시루봉로 71, 106동 405호(방학동, 청구아파트)

최민지

경기도 의정부시 평화로 153, 대희파인빌 1동 302호 (호원동)

김한겸

서울특별시 양천구 목동서로 400, 1014동 503호(신정동, 목동신시가지아파트10단지)

강재우

서울특별시 중구 청계천로 400 (황학동, 롯데캐슬 베네치아)

이은정

경기도 남양주시 송산로307번길 16, 5313동 1004호(별내동, 남양주 별내 남광하우스토리)

명세서

청구범위

청구항 1

Osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 osmundacetone은 고비과(Osmundaceae) 식물에서 분리되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 고비과 식물은 고비(*Osmunda japonica*)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

Osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 개선용 식품 조성물.

청구항 5

고비(*Osmunda japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 추출물은 물, 에탄올, 주정, 메탄올, 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol), 아세톤, 에테르, 클로로포름, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산, 시클로헥산, 석유에테르(petroleum ether), 디에틸에테르, 벤젠으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

고비(*Osmunda japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것으로, 보다 구체적으로는 osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 고비(*Osmunda japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 개선용 식품용 조성물

에 대한 것이다.

배경 기술

- [0002] 뼈는 몸의 골격 구조를 형성하고 혈중 칼슘(Ca^{2+}) 수준을 유지하는 데 매우 중요한 역할을 한다. 뼈는 대사적으로 뼈를 흡수하는 파골세포(osteoclast)와 생성하는 조골세포(osteoblast) 간의 뼈 리모델링 순환(bone remodelling cycle)의 균형을 통해 유지된다. 뼈의 흡수와 생성 간의 균형이 파괴되어 흡수량이 생성량보다 많아지면 다양한 뼈 관련 질환이 발생하며, 파골세포의 분화 및 활성화와 관련된 대표적인 질환은 골다공증, 류마티스관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절 등을 들 수 있다.(Kim JH and Kim N, 2016; Shiozawa Y *et al.*, 2011; Singer FR, 2016).
- [0003] 이 중에서, 골다공증은 파골세포의 활성화로 뼈의 흡수와 생성 간의 균형이 파괴되어 흡수량이 생성량보다 많아지면 유발된다. 골다공증은 뼈 실질의 밀도를 감소시켜서 골절 빈도를 증가시킨다. 중년 및 노년 여성 등 호르몬 균형이 무너진 여성에서 가장 빈번하게 발생하며, 골절이나 중증 질환으로 거동을 못하는 환자에서도 발병한다. 최근에는 중장년층 이상의 남성에서도 발생 빈도가 증가하고 있다.
- [0004] 골수 monocyte/macrophage lineage 세포가 파골세포로 분화하는 분자적 기전에는 먼저 아래 2개의 cytokine이 중요한 역할을 한다(Teitelbaum SL and Ross FP, 2003). (i) Macrophage colony-stimulating factor(M-CSF)가 그 수용체인 c-Fms와 결합하면 파골세포 전구세포들이 증식하고 생존한다. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand(RANKL)이 그 수용체인 RANK에 결합하면 파골세포의 분화와 골 흡수 기능을 활성화하고 성숙한 파골세포가 생존하게 한다(Lacey DL *et al.*, 1998; Lum L *et al.*, 1999; Sherr CJ, 1990; Suda T *et al.*, 1999; Wong BR *et al.*, 1999). (ii) M-CSF가 c-Fms의 활성화를 유도하면 파골세포 전구세포가 ERK 및 PI3K/Akt 경로를 통하여 증식하고 생존한다(Mancini *et al.*, 1997). (iii) RANKL(OPGL, ODF, TRANCE)과 RANK 역시 파골세포 형성과 기능을 조절한다(Anderson DM *et al.*, 1997; Dougall WC *et al.*, 1999; Kong YY *et al.*, 1999). RANKL이 RANK에 결합하면 TRAFs 1, 2, 3, 5, 6 등의 TNF receptor-associated factor(TRAF)들이 RANK와 결합한다(Darnay BG *et al.*, 1998; Walsh MC and Choi Y, 2003). 이중 TRAF6가 파골세포 형성과 기능에 가장 중요하다(Lomaga MA *et al.*, 1999; Naito A *et al.*, 1999). TRAF6는 RANKL/RANK 신호를 NF- κ B, c-Jun N-terminal kinase(JNK), extracellular signal-regulated kinase(ERK), p38, Akt, Nuclear Factor Of Activated T-Cells 1(NFATc1)에 전달하여 파골세포 증식, 융합, 분화가 이루어진다(Kobayashi N *et al.*, 2001; Lomaga MA *et al.*, 1999; Naito A *et al.*, 1999; Takayanagi H *et al.*, 2002; Wong BR *et al.*, 1998; Wong BR *et al.*, 1999).
- [0005]
- [0006] 기존의 골다공증의 치료제 개발 방향은 파골세포의 뼈 흡수를 억제하여 뼈 실질의 손실을 예방할 수 있는 물질을 발굴하는 것이었다. 그 대표적인 약품이 bisphosphonate 계열의 Fosamax이다. 같은 맥락에서 arachidonate 대사 산물이 뼈 조직 대사에 미치는 영향에 대하여서도 많은 연구가 이루어졌다(Lee Sung-eun, 1999). Leukotriene-B₄(LTB₄)는 arachidonate의 대사 경로인 5-lipoxygenase pathway의 대사 산물 중 하나이다(Ford-Hutchinson, A. W. *et al.*, 1980). Giant cell tumor에서 얻은 간질세포주(interstitial cell)인 C433은 5-lipoxygenase 대사 산물을 증가시켜서 조골세포의 수와 활성을 증가시키는 것으로 보고되었다(Mundy, G. R. *et al.*, 1993). 뼈 조직 배양 과정에서 LTB₄를 투여하면, 뼈 흡수가 증가하는 것이 관찰되기도 하였다(Bonewald, L. F. *et al.*, 1996). *In vitro*와 *in vivo* 연구에서 LTB₄는 파골세포의 생성을 증가시켜서 뼈 흡수를 유도한다는 연구 결과도 있다(Bonewald, L. F. *et al.*, 1996). 이에 따라, LTB₄ 수용체 억제제(LTB₄ receptor antagonist)들이 골다공증 치료를 위하여 많이 개발되었지만, 파골세포의 뼈 실질 흡수를 충분히 억제하는 데는 성공하지 못했다.
- [0007] 뿐만 아니라, 기존 골다공증 치료제의 부작용과 고가의 약값도 환자의 치료에 충분한 용량으로 투여하는데 큰 장애가 되고 있다. Fosamax의 주요 부작용으로는 중증 식도염, 신 손상, 간 손상, 저칼슘혈증, 근육 경련 등이 있고, 로슈(Roche)의 Bonviva는 전신근육통, 몸살 등의 부작용이 있다. 노바티스(Novartis)의 Aclasta(zoledronate)와 일라이 릴리(Eli Lilly)의 anabolic 치료제인 parathyroid hormone인 Forsteo와 Forteo(teriparatide)는 효과는 좋으나 가격이 너무 비싸서 사용이 매우 제한적이다. 특히 Forsteo/Forteo는 약물 파면반응 환자, 임산부, 모유수유, 고칼슘혈증(hypercalcemia), 신부전, 부갑상선 기능항진증(hyperparathyroidism)과 파제트 병(Paget' disease) 등의 대사성 골질환, 원인미상의 알칼리포스파타제 활성 증가(unexplained elevations of alkaline phosphatase), 방사선 치료 환자, 골수암 혹은 골 전이암 환자 등에겐 사용할 수 없기 때문에 적용가능한 환자군이 크지 않다.

[0009] 따라서 보다 효과가 강력하고 안전하며, 기존 치료제보다 저비용으로 생산가능한 골 관련 질환 치료제 개발이 시급히 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 이에 본 발명자들은 부작용이 적고 안전하며 효과가 뛰어난 골 관련 질환 치료제를 개발하기 위하여 천연물 성분에 대하여 연구한 결과, 오랫동안 식품으로 이용되어 온 고비의 추출물에 골 손실 억제 활성이 있는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서 본 발명의 목적은

[0012] Osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은

[0014] Osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 개선용 식품용 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은

[0016] 고비(*Osmunda japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은

[0018] 고비(*Osmunda japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 개선용 식품용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0019] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0020] Osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0022] Osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 개선용 식품용 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0024] 고비(*Osmunda japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0026] 고비(*Osmunda japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 개선용 식품용 조성물을 제공한다.

다.

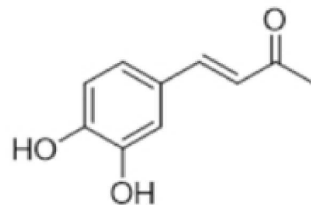
[0027] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0028] 본 발명은 osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0030] 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 osmundacetone을 유효성분으로 포함하는 조성물일 수도 있고, 유효성분으로서 osmundacetone으로 이루어진 조성물일 수도 있으며, 또는 유효성분으로서 osmundacetone이 필수적으로 구성되는 조성물일 수도 있다.

[0031] 본 명세서에서 용어 ‘~을 포함하는(comprising)’이란 ‘함유하는(including)’ 또는 ‘특징으로 하는(characterized by)’과 동일한 의미로 사용되며, 본 발명에 따른 조성물 또는 방법에 있어서, 구체적으로 언급되지 않은 추가적인 구성 성분 또는 방법의 단계 등을 배제하지 않는다. 또한 용어 ‘로 구성되는(consisting of)’이란 별도로 기재되지 않은 추가적인 요소, 단계 또는 성분 등을 제외하는 것을 의미한다. 용어 ‘필수적으로 구성되는(essentially consisting of)’이란, 조성물 또는 방법의 범위에 있어서, 기재된 물질 또는 단계와 더불어 이의 기본적인 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 물질 또는 단계 등을 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0032] < Osmundacetone의 구조 >



[0033]

[0035] Osmundacetone은 $C_{10}H_{10}O_3$ 의 분자식(분자량 178.184Da)으로 표시되며, 상단의 화학식의 구조를 갖는 화합물로, 본 발명자들에 의하여 고비 추출물로부터 파골세포의 증식과 분화의 억제 활성을 갖는 것으로 분리 동정된 성분이다. Dihydroxybenzylideneacetone, (3E)-4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one 또는 IUPAC 이름으로 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-[(2S, 3R, 4R, 5S, 6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]-6-[(2S, 3R, 4S, 5S)-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]-4H-chromen-4-one으로 불리며, 상온에서 무색 또는 황색에서 갈색의 유색 결정으로 존재한다.

[0036] Osmundacetone은 다수의 미국 유해독성물질 규제기관에서 인체독성, 자극성, 발암성, 환경독성 등 모든 검사에서 무해하며 안전하다는 판정을 받았다(참고: TSCA: Not Listed; CLEAN WATER ACT(CWA): Not Listed; SARA313: Not Listed; MARINE POLLUTANT: Not Listed; RIGHT TO KNOW LIST(NEW JERSEY): Not Listed; RIGHT TO KNOW LIST(MASSACHUSETTS): Not Listed; RIGHT TO KNOW LIST(PENNSYLVANIA): Not Listed; ILLINOIS TOXIC AIR CONTAMINANTS: Not Listed; CLEAN AIR ACT(CAA): Not Listed; DHS CHEMICALS OF INTEREST: Not Listed; CALIFORNIA PROP 65: Not Listed; OSHA: Not Listed; CALIFORNIA PROP 65 TOXICITY TYPE(CANCER, DEVELOPMENTAL, FEMALE, MALE): None; OSHA HAZ CLASS(CARCINOGEN, CORROSIVE, FLAMABLE, REACTIVE, TOXIC): None 등).

[0037] 본 발명의 조성물에 포함되는 osmundacetone은 그 자체 또는 염, 바람직하게는 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명에서 '약학적으로 허용가능한'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 말하며, 상기 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하다. 상기 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산을 포함한다. 또한 상기 무기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 염산, 브롬

산, 황산 및 인산을 포함한다.

- [0038] 상기 osmundacetone은 화학적으로 합성된 것일 수도 있고, 천연물에서 분리된 것일 수도 있는데, 천연물에서 분리된 osmundacetone을 사용하는 경우에는 특히 고비과(Osmundaceae) 식물에서 분리된 것일 수 있다. 가장 바람직하게는 고비과에 속하는 고비(*Osmunda japonica*)로부터 분리된 것일 수 있다.
- [0039] 고비과(Osmundaceae)의 식물은 고비목(Osmundales)에 속한 유일한 과목 식물이다. 고비목(Osmundales)은 약 2억 1000만 년 전 중생대, 트라이아스기에서 기원한 오래된 양치식물군으로서, 박벽포자낭고사리류(Leptosporangiate fern)로 분류된다.
- [0040] 고비과에 속하는 고비(*Osmunda japonica*)는 학명이 *Osmunda japonica* Thunb. 또는 *Osmunda nipponica* Makino이며, 라틴명으로는 *Osmundae Rhizoma*라고 한다. 영문으로 Japanese royal fern 또는 Japanese flowering fern으로도 불리는 식물로, 일본, 중국, 한국, 대만 등지의 동아시아와 러시아 등에 자생하는 식물이다. 고비의 어린 잎이 오랫동안 식재료로 이용되어 왔을 뿐만 아니라, 전통의학 및 민간요법으로 다양한 질병에 사용되어 온 약용식물이다. 고비는 osmundalactone, osmundacetone, osmundalin, dihydroisoomundalin, parasorboside 및 ponasterone A, ecdysone, ecdysterone 등 탈피호르몬 성분이 함유되어 있다. 전통의학에서는 뿌리줄기를 자기(紫箕) 또는 자기관중(紫箕貫衆)이라 하여, 독이 조금 있으나 회충, 촌백충, 요충 등 구충, 항바이러스, 항균 등 살충(殺蟲), 청열해독(熱解毒), 거어지혈(祛瘀止血), 풍열감모(風熱疳冒), 온열반진(溫熱斑疹), 토혈, 비혈, 암치질로 인한 변혈, 적리, 대하증 등의 치료에 사용한다(중약대사전).
- [0041] 본 발명자들은 일실시예에서 고비의 추출물이 뼈 조직을 파괴하고 재흡수하는 역할을 하는 파골세포(osteoclast)의 분화를 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다. 마우스에서 분리한 골수세포에서 파골세포의 줄기세포 전구세포인 단핵구 세포를 분리하여 분화촉진인자인 RANKL과 M-CSF로 자극하고, 고비 추출물을 처리하여 파골세포의 분화에 미치는 영향을 확인한 결과, 고비의 열수 추출물 또는 에틸 아세테이트 추출물이 골수세포가 다핵 파골세포로 분화하는 것을 효과적으로 억제하였다.
- [0042] 본 발명자들은 HPLC와 NMR을 이용하여 고비 추출물에서 파골세포 분화 억제 효과가 있는 성분을 분리 동정하였다. 고비의 열수 추출물과 에틸 아세트 추출물/분획물로부터 분리 동정된 단일 화합물이 osmundacetone이다. Osmundacetone은 뛰어난 파골세포 분화 억제 활성을 가지고 있을 뿐만 아니라, 세포독성은 매우 낮아 안전한 것으로 나타났다.
- [0044] 따라서 통상의 기술자는 본 발명자들이 규명한 고비 추출물과 osmundacetone의 상기 활성을 이용하여 파골세포에 의한 골 흡수와 조골세포에 의한 새로운 골 기질의 형성 및 이후의 무기질화 과정의 골 대사 과정의 균형이 깨지면서 골밀도와 강도가 감소하여 발생하는 다양한 골 질환에 대한 효과적인 예방, 증상의 개선 또는 치료의 효과를 기대할 수 있음을 이해할 수 있다.
- [0045] 바람직하게는, 본 발명에서 상기 골 질환은 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 또는 골 절일 수 있으며, 상기 각각의 질환과 파골세포와의 상관관계에 대해서는 본 명세서의 적용예를 참고한다.
- [0046] 본 명세서에서 '치료'란 치료되는 개체 또는 세포의 자연적 과정을 변경시키려는 임상적 시술을 의미하며, 임상적 병리의 예방을 위해서도 수행될 수 있다. 치료의 바람직한 효과는 질병의 발생 또는 재발 억제, 증상의 완화, 질병의 임의의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 질병 진행 속도의 감소, 질병 상태의 개선, 호전, 완화 또는 개선된 예후 등을 포함한다. 또한 용어 '예방'은 질병의 발병을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0047] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 투여 경로, 투여 시간, 치료 횟수, 치료 기간, 치료가 필요한 개체의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 약물에 대한 민감도, 식이 및 배설율, 등 다양한 요인을 고려하여 당업자가 상술한 특정 용도에 따른 적절한 유효량을 결정할 수 있다. 상기 "유효량"이란 개체에게 투여하였을 때, 골다공증의 개선, 치료, 예방, 검출 또는 진단 효과를 나타내기에 충분한 양을 말한다. 상기 '개체'란 동물, 바람직하게는 포유동물, 가장 바람직하게는 인간을 포함하는 동물일 수 있으며, 동물에서 유래한 세포, 조직, 기관 등일 수도 있다. 상기 개체는 치료가 필요한 골 질환 환자(patient)일 수 있다.
- [0048] 상기 투여는 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다. 본 발명의 약학 조성물은 단독으로 투여되거나 골 질환의 예방 또는 치료에 효과가 있는 것으로 알려진 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 병용하여 투여할 경우 다른 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 단독 투여 또는 병용 투여시 본 발명의 약

학 조성물의 투여량은 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 바람직하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [0049] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법으로 투여경로에 따라 다양하게 제형화될 수 있다. ‘약학적으로 허용되는’이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 활성성분의 작용을 저해하지 않으며 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다. 상기 담체로는 모든 종류의 용매, 분산매질, 수중유 또는 유중수 에멀전, 수성 조성물, 리포솜, 마이크로비드 및 마이크로솜이 포함된다.
- [0050] 투여 경로로는 경구적 또는 비경구적으로 투여될 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 약학적 조성물을 경구투여하는 경우 본 발명의 약학적 조성물은 적합한 경구투여용 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 현탁액, 웨이퍼 등의 형태로 제형화될 수 있다. 적합한 담체의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 등을 포함하는 셀룰로오스류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 붕해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 상기 약학적 조성물은 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0052] 또한, 비경구적으로 투여하는 경우 본 발명의 약학적 조성물은 적합한 비경구용 담체와 함께 주사제, 경피투여제 및 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법에 따라 제형화될 수 있다. 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 포함하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 보다 바람직하게는, 적합한 담체로는 헵크스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 텍스트로즈와 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 나트륨 클로라이드와 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0054] 경피투여제의 경우 연고제, 크림제, 로션제, 겔제, 외용액제, 파스타제, 리니먼트제, 에어로졸제 등의 형태가 포함된다. 상기에서 ‘경피투여’는 약학적 조성물을 국소적으로 피부에 투여하여 약학적 조성물에 함유된 유효한 양의 활성성분이 피부 내로 전달되는 것을 의미한다. 예컨대, 본 발명의 약학적 조성물을 주사형 제형으로 제조하여 이를 30게이지의 가는 주사 바늘로 피부를 가볍게 단자(prick)하거나 피부에 직접적으로 도포하는 방법으로 투여될 수 있다. 이들 제형은 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania)에 기술되어 있다.
- [0055] 흡입투여제의 경우, 본 발명에 따라 사용되는 화합물은 적합한 추진제, 예를 들면, 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체를 사용하여, 가압 팩 또는 연무기로부터 에어로졸 스프레이 형태로 편리하게 전달할 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투약 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공하여 결정할 수 있다. 예를 들면, 흡입기 또는 취입기에 사용되는 젤라틴 캡슐 및 카트리지는 화합물 및 락토오스 또는 전분과 같은 적합한 분말 기체의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화할 수 있다.
- [0056] 그밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).
- [0058] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS), 카보하이트레이트(예를 들어, 글루코스, 만노스, 슈크로즈 또는 텍스트란), 항산화제, 정균제, 킬레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 아쥘반트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제 및/또는 보존제를 추가로 포함할

수 있다.

- [0059] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다.
- [0060] 또한 본 발명은 osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 개선용 식품용 조성물을 제공한다.
- [0061] 본 발명자들이 규명한 osmundacetone의 상기 골 질환에 대한 예방 또는 개선의 효과는 본 명세서에서 전술한 바와 같다.
- [0062] 상기 식품용 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품첨가제(food additives) 등의 모든 형태를 포함한다. 상기 유형들은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.
- [0063] 예를 들면, 건강식품으로는 본 발명의 식품용 조성물 자체를 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 하거나, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한 본 발명의 식품용 조성물은 골 질환 예방 또는 개선의 효과가 있다고 알려진 공지의 물질 또는 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다.
- [0064] 또한 기능성 식품으로는 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품 (예를 들어 과일 통조림, 병조림, 잼, 마야말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예를 들어 햄, 소시지콘비이프 등), 빵류 및 면류(예를 들어 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예를 들어 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예를 들어 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 식품용 조성물을 첨가하여 제조할 수 있다.
- [0065] 본 발명에 따른 식품용 조성물의 바람직한 함유량으로는 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 최종적으로 제조된 식품 총 중량 중 0.01 내지 50중량%이다. 본 발명의 식품용 조성물을 식품첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다.
- [0066] 또한 본 발명은 고비(*Osmunda japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0067] 본 발명자들이 규명한 고비 추출물에서 기대되는 골 질환에 대한 예방 또는 치료의 효과는 본 명세서에서 전술한 바와 같다. 특히 고비 추출물에 포함된 화합물 osmundacetone이 뼈 흡수를 담당하는 파골세포의 증식 및 분화를 억제하는 활성을 갖는 것으로 규명한 바 있다.
- [0069] 상기 고비(*Osmunda japonica*) 추출물은 신선한 고비로부터 제조할 수 있으며, 냉동, 건조 등 보관을 위한 가공 과정을 거친 고비를 사용할 수도 있다. 상기 고비 추출물의 형태나 성상에는 제한이 없으며, 용액, 농축물일 수도 있고, 추출물 제조에 사용된 용매를 제거한 고형분 또는 분말일 수도 있다.
- [0070] 상기 고비의 추출물은 천연물 추출 방법으로 알려진 것이라면 제한없이 선택하여 사용할 수 있으며, 특히 osmundacetone이 포함되는 추출물을 제조할 수 있는 추출 방법을 이용하는 것이 가장 바람직하다. 예를 들어, 적절한 추출 용매를 선택하여 당업계에 공지된 산/염기추출, 열수추출, 상온교반추출, 냉침, 환류냉각추출, 초음파추출, 가압가열추출, 저온고압추출, 효소처리추출, 용매추출 등의 추출 방법을 사용하여 제조할 수 있다.
- [0071] 상기 추출 용매로는 물, 에탄올, 주정, 메탄올, 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol), 아세톤, 에테르, 클로로포름, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산, 시클로헥산, 석유에테르(petroleum ether), 디에틸에테르, 벤젠으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 용매를 사용할 수 있다.
- [0072] 또한 본 발명에 따른 고비 추출물은 상기 용매 추출법에 의하여 1차로 추출된 추출물일 수도 있고, 추출의 효율을 높이기 위하여 1차 추출 후 추출 잔류물을 재추출하여 1차 추출물과 혼합할 것일 수도 있다. 또한 불순물을 제거하고 활성 성분의 농도를 높이기 위하여 당업계에 공지된 방법에 따라 추가적으로 크로마토그래피에 의한 분리, 분획, 규조여과, 한외여과(막분리, ultrafiltration) 등의 다양한 정제 또는 여과 과정을 거친 것일 수도 있다. 최종 추출물은 침전농축, 증발농축, 공비농축, 감압농축, 증류농축, 원심분리, 역삼투법 등 공지된 농축방법과 농축장치를 이용하여 농축할 수 있으며, 동결건조, 분무건조, 열풍건조 등의 방법에 의해 용매를 제거

하고 고형화하여 분말 형태로 제조할 수 있다.

- [0073] 상기 고비 추출물에서 osmundacetone의 함량을 높이기 위해서는 먼저 고비로부터 열수 추출물을 제조하고, 열수 추출물을 다시 에틸 아세테이트 등 유기용매로 추출물 및 분획물을 제조하는 것이 바람직하다.
- [0074] 상기 고비 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 약학적 조성물의 제형화, 투여 경로와 투여량 등의 투여 방법 등에 대하여서는 전술한 바와 같다.
- [0075] 또한 본 발명은 고비(*Osmunda japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 개선용 식품용 조성물을 제공한다.
- [0076] 상기 식품용 조성물을 제조하기 위한 고비 추출물에 대하여서는 전술한 바와 같다. 또한 상기 식품용 조성물의 예시 및 함유량에 대하여서도 전술한 바와 같다.

발명의 효과

- [0077] 따라서, 본 발명은 osmundacetone 또는 그 유도체, 또는 이를 포함하는 고비의 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 조성물은 뼈 손실을 야기하는 파골세포에 대하여 강력한 증식 및 분화 억제 효과가 있으며, 세포독성이 매우 낮다.

도면의 간단한 설명

- [0078] 도 1은 고비에 포함된 파골세포 분화억제 활성 물질을 분리 동정하기 위한 고비의 물(열수) 또는 에틸아세테이트(EA) 추출물의 HPLC 결과를 나타낸다(검출파장 280nm). EA-2는 7개 분획으로 분리된 EA 추출물 중 2번째 분획이다. Osmundacetone의 peak는 검정색 화살표로 표시하였다. 적색 타원형으로 표시한 peak들은 정제 과정에서 관찰되는 동일한 peak의 위치를 나타낸다.
- 도 2는 고비 추출물과 분획물, osmundacetone의 파골세포의 증식 및 분화억제 활성을 확인하기 위해 마우스 골수세포를 이용한 TRAP assay 결과를 나타낸다.
- 도 3은 Osmundacetone의 파골세포 분화 억제능력인 IC50을 구하기 위하여, 상업적으로 구입한 osmundacetone(Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific) 1, 4, 7, 10 μ M의 파골세포의 증식 및 분화억제 활성을 확인하기 위한 마우스 골수세포를 이용한 TRAP assay 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0079] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0080] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0081] <실시예 1>
- [0082] 고비 추출물과 분획물 제조 및 화합물 분리 동정
- [0083] 고비(*Osmundae Rhizoma* 또는 *Osmunda japonica*)를 열수, 에틸아세테이트(ethyl acetate)의 순서로 추출한 후, 에틸아세테이트 추출물(EA 추출물)을 HPLC로 7개의 분획으로 분리하였다.
- [0084] 구체적으로, 고비 추출물은 강원도에서 채취한 고비 200~250g을 깨끗이 씻어 증숙용기(OSK-2002, 홍삼박사, Well sosanaTM, 대응계약)에 넣고 물 1.5L를 첨가하여 24시간 증숙한 후, 물 3.5L를 추가로 첨가하여 72시간 동안 숙성시키고 냉장보관한 것을 열수 추출물로 사용하였다. 열수 추출물에 동일한 부피의 에틸 아세테이트(ethyl acetate, EA)를 첨가하고 잘 혼합한 후, EA 층을 rotary evaporator로 건조하여 EA 추출물로 사용하였다. EA 추출물을 최소량의 DMSO에 녹인 후 물로 희석하였는데, 이 때 희석 배수는 수율을 대략 70%로 예상하여 열수 추출물 원래 부피의 70%까지 희석하였다. EA 추출물을 HPLC로 7개의 분획으로 나눈 후, 두 번째 분획을 rotary evaporator로 건조하여 EA-2 추출물로 사용하였다. 7개 분획물 중, 2번째 분획물(EA-2)이 파골세포 분화 억제 활성을 갖는 것으로 관찰되었다(도 1, <실시예 2> 참고).
- [0085] 파골세포 분화억제 활성을 갖는 물질을 동정하기 위하여 EA-2 분획물에서 9개의 단일 화합물을 분리, 정제하고, 핵자기공명(NMR)과 질량분석(MS)으로 각 화합물의 종류와 화학구조를 규명하였다. EA-2 분획물에서 단일 화합물

을 분리하기 위한 HPLC의 조건은 **표 1**에 나타난 바와 같다. 분리된 화합물 중, 파골세포 분화억제 활성을 나타내는 물질은 osmundacetone인 것으로 확인되었다(<실시예 2> 참고). 고비 추출물에서 동정된 osmundacetone의 구체적인 NMR과 MS 분석 결과는 다음과 같다:

¹H-NMR(700 MHz, methanol-d₄) δ 7.52(1H, d, J=16.1, H-7), 7.08(1H, d, J=2.1 Hz, H-2), 6.99(1H, dd, J=7.7, 2.1 Hz, H-6), 6.79(1H, d, J=7.7 Hz, H-5), 6.55(1H, d, J=16.1 Hz, H-8), 2.34(3H, s, H-10); ¹³C-NMR(175 MHz, methanol-d₄) δ 201.7(C-9), 150.1(C-4), 147.1(C-3), 147.0(C-7), 127.9(C-1), 124.9(C-8), 123.7(C-6), 116.7(C-5), 115.4(C-2), 27.2(C-10); ESI-MS(negative mode) m/z 177 [MH]⁻; ESIMS(positive mode) m/z 179 [M+H]⁺, 201 [M+Na]⁺.

표 1

EA-2 fraction HPLC separation method

HPLC	Agilent 1200
Column	Kromasil 100-5-C18 (4.6*250 mm)
Detector	UV (210 nm, 254 nm, 280 nm)
Flow	1 ml/min
Oven	30°C
Injection	10 µl

Mobile phase	A (0.05% TFA in H ₂ O) %	B (MeOH) %
0 min	80	20
20 min	0	100
30 min	0	100

<실시예 2>

파골세포의 증식 및 분화억제 활성

<실시예 1>에서 제조한 고비의 추출물, 분획물과 분리된 화합물은 파골세포 특이적인 염색법인 TRAP assay(tartrate-resistant acid phosphatase)를 이용하여 파골세포에 대한 증식 및 분화억제의 활성을 확인하였다.

TRAP assay의 구체적인 방법은 다음과 같다.

1. 골수세포 배양

6~8주령 수컷 C57BL/6 마우스의 정강뼈(tibia)와 대퇴골(femur)을 무균적으로 절제하고 골수세포를 syringe(21G, Korea Green Cross)로 무균적으로 채취하였다. 골수세포를 sodium bicarbonate(2.0g/L), streptomycin(100mg/L), penicillin(100,000unit/mL)을 포함하는 α-MEM 배지(Gibco BRL Co.) 500 µ에 부유하여 48well plate에 분주하고, triplicate으로 assay를 진행하였다. 파골세포의 줄기세포 전구세포인 단핵구세포를 분리하여 분화촉진인자인 RANKL과 M-CSF로 처리하면 5~7일 내에 파골세포로 분화되었다.

2. 파골세포 분화 측정

1) 시료 준비: osmundacetone(1µ 또는 10µ Fosamax(1µ 등을 각각 적정한 농도로 DMSO(dimethylsulfoxide 또는 무균 증류수에 용해하였다. 고비의 열수 추출물, EA 추출물 또는 분획물은 <실시예 1>과 동일한 방법으로 제조하였다. EA-2 추출물은 최소량의 DMSO에 녹인 후 EA-2 추출 과정의 수율을 대략 70%로 예상하여 원래 열수 추출물 부피의 50%까지 물로 희석하였다.

2) 시료 투여: 시료는 골수세포 배양 첫날부터 1:20(v/v; 배지 500 µ 당 시료 25 µ)로 지속적으로 배지에 투여하

고, 배지는 2~3일 간격으로 교체하였다.

[0097] 3) 파골세포 분화 측정: 파골세포는 TRAP으로 염색된 TRAP-양성 다핵세포로 정의하였다. TRAP 염색 용액은 기질인 naphthol AS-MS phosphate(Sigma N-4875) 5 mg과 발색시약인 Fast Red Violet LB salt 25mg을 약 0.5 ml의 N,N-dimethylformamide에 녹인 후, 50mM tartaric acid를 포함하는 0.1N NaHCO₃ buffer solution(50mL)과 혼합하였다. 반응시약은 사용 전까지 냉장고에 보관하였다.

[0098] 골수세포는 분화촉진인자를 포함하는 배지에서 7일간 배양한 후, 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 10% formalin을 포함한 PBS로 2~5분 동안 고정하였다. 이후 ethanol과 acetone의 1:1 혼합용액으로 1분간 고정하고, 건조하였다. 고정된 세포는 TRAP 염색용액으로 15 분간 처리하고 PBS로 세척한 후, 세포의 염색 정도를 현미경으로 관찰하였다.

[0099] 현미경 시야에서 TRAP-양성세포 중, 2개 이상의 핵을 갖는 세포를 파골세포로 판정하고 세포의 수를 측정하였다. Osmundacetone의 파골세포 분화억제 효과는 대조군 대비 50% 억제 농도를 IC50로 계산하였다.

[0100] 도 2에서 확인할 수 있듯이, DMSO를 처리한 골수세포는 양성대조군(배양 배지에 고비 추출물 없이 분화촉진인자만 첨가한 군)과 같이 정상적으로 거대한 파골세포를 형성하였다. 이와 대조적으로, 같은 부피의 고비의 물 추출물, EA 추출물, EA-2 분획물 및 osmundacetone(10 μ로 처리한 군에서는 음성대조군(배양 배지에 고비 추출물과 분화촉진인자 모두 첨가하지 않은 군)과 유사하게 다핵세포인 거대한 파골세포 형성이 현저히 억제되었을 뿐만 아니라, 음성대조군의 결과에 부가적으로, 파골세포 전구세포의 증식도 현저히 억제되어 파골세포의 분화뿐만 아니라 증식 억제효과도 매우 큰 것으로 관찰되었다. 특히 osmundacetone을 처리한 경우에는 10 μ농도에서 골수의 단핵구 세포가 증식하고 융합하여 다핵 세포인 파골세포로 분화하는 과정이 95% 이상 거의 완전히 억제된 것으로 나타났다. Osmundacetone 1 μ를 처리한 군에서는 거대한 파골세포가 형성되었으나 양성대조군에 비하여 그 수가 적었다. Fosamax 1 μ를 처리한 군 역시 거대한 파골세포가 형성되었으나 양성대조군에 비하여 수가 적었으며 Osmundacetone 1 μ 처리군과 파골세포 밀도가 유사하였다.

[0101] <실시예 3>

[0102] 파골세포의 증식 및 분화 억제 활성 IC50 도출

[0103] Osmundacetone은 TRAP assay를 이용하여 파골세포에 대한 증식 및 분화억제의 활성을 측정하였다.

[0104] 1. 파골세포 분화 측정

[0105] 1) 시료 준비: Osmundacetone을 Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific에서 구입하여 최소량의 DMSO(dimethylsulfoxide)에 용해하였다.

[0106] 2) 시료 투여: Osmundacetone은 골수세포 배양 첫날부터 1:20(v/v; 배지 500 μ 당 시료 25 μ)으로 최종농도 각각 1, 4, 7, 10 μ이 되도록 지속적으로 배지에 투여하고, 배지는 2~3일 간격으로 교체하였다.

[0107] 3) 파골세포 분화 측정: <실시예 1>의 방법으로 수행하였다.

[0108] 현미경 시야에서 TRAP-양성세포 중, 2개 이상의 핵을 갖는 세포를 파골세포로 판정하고 세포의 수를 측정하였다. Osmundacetone의 파골세포 분화억제 효과는 대조군 대비 50% 억제 농도를 IC50로 계산하였다.

[0109] 도 3에서 확인할 수 있듯이, osmundacetone(Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific)을 10 μ농도로 처리한 경우에는 골수의 단핵구 세포가 증식하고 융합하여 다핵 세포인 파골세포로 분화하는 과정이 거의 완전히 억제되었으며 7 μ농도로 처리한 경우에는 약 3-40% 억제된 것으로 나타났다(IC50≈8 μ

[0110] <실시예 4>

[0111] 세포독성 확인

[0112] <실시예 1>에서 제조한 고비의 추출물, 분획물과 분리된 화합물은 MTT assay를 이용하여 세포독성을 확인하였다.

[0113] MTT assay 방법은 다음과 같다.

[0114] 세포(마우스 섬유아세포주 NIH/3T3)는 2³ cells/well의 밀도로 10% FBS(fetal bovine serum)가 첨가된 DMEM를 포함하는 96 well plate에서 5% CO₂, 37℃에서 배양한 후, osmundacetone을 세포배지에 첨가하고 48시간 배양하

였다. 그 후 MTT(5mg/ml)를 10 μ g/well의 농도로 투여한 후, 4시간 배양하였다. 각 well에 100 μ l의 DMSO를 가하고 상층액을 제거하였다. 10분간 배양 후 마이크로플레이트 리더(microplate reader; SPCTRA MAX 340PC, Molecular Devices, USA)를 이용하여 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 생존한 세포의 수를 나타내는 지표로서 하단의 식으로 계산되며, 3회의 실험으로 재현성을 확인하였다.

[0115] 세포 증식율(%)=OD550(sample)/OD550(control)

표 2

Osmundacetone의 세포독성

시료		세포증식률 (%: 평균 $\pm$ 표준편차)
음성대조군 ¹⁾		100
Osmundacetone ²⁾	5 μ M	101.0 $\pm$ 2.56
	50 μ M	90.1 $\pm$ 2.01
	500 μ M	99.9 $\pm$ 1.72
	5000 μ M	48.1 $\pm$ 1.24

¹⁾음성대조군: 배양 배지에 osmundacetone을 처리하지 않은 군.

²⁾Osmundacetone: 배양 배지에 osmundacetone을 표시된 농도별로 처리한 군.

[0116]

[0117] 표 2에서 확인할 수 있듯이, Osmundacetone 투여 후 세포증식율의 변화에 근거하여 산출된 Osmundacetone의 NIH3T3 세포에 대한 LD50는 약 5,000 μ M이었다.

[0118] <적용예 1>

[0119] 골다공증

[0120] 뼈는 대사적으로 뼈를 흡수하는 파골세포(osteoclast)와 생성하는 조골세포(osteoblast) 간의 뼈 리모델링 순환(bone remodelling cycle)의 균형을 통해 유지된다. 그러나, 파골세포와 조골세포의 균형이 깨어지고 파골세포가 지나치게 활성화되면 뼈의 흡수와 생성 간의 균형이 파괴되어 흡수량이 생성량보다 많아지면서 골다공증이 유발된다(Kim JH and Kim N, 2016; Shiozawa Y et al., 2011; Singer FR, 2016).

[0121] 따라서, 본 발명의 osmundacetone은 파골세포의 증식 및 분화를 억제하는 효과를 나타내기 때문에, 골다공증 예방 또는 치료효과를 나타낼 수 있다.

[0122] <적용예 2>

[0123] 류마티스 관절염

[0124] 류마티스관절염은 자가면역질환인데 자가면역항체가 파골세포 분화를 촉진한다. 그로 인한 과도한 골 흡수는 류마티스관절염을 악화시킨다(Takayanagi H, 2007). 그 기전은 다음과 같다. 파골세포 분화 관련 중추적인 전사인자인 NFAT 전사인자들은(NFATc1/c2/c3/c4) 기본적으로 calcium/calmodulin signaling에 의하여 활성화된다(Takayanagi H et al., 2002). 완전한 활성화를 위해서는 면역조절 단백질들인 DNAX-activating protein 12(DAP12) 및 면역항체 Fc receptor common γ chain(FcR γ)과 같은 tyrosine-based activation motif (ITAM)-bearing molecule들이 면역세포에서 calcium signaling을 자극한다(Pitcher LA and van Oers NS, 2003). 파골세포에서 역시 DAP12와 FcR γ 가 calcium signaling을 통하여 NFATc1을 활성화시킨다. 따라서 DAP12 및 FcR γ 와 연계된 immunoglobulin-like receptor가 파골세포 분화에서 중요한 역할을 한다(Koga T et al., 2004; Mocsai A et al., 2004). 즉, FcR γ 는 파골세포에서 osteoclast-associated receptor(OSCAR) 및 paired immunoglobulin-like receptor(PIR-A)와 상호작용한다. ITAM이 인산화되면 phospholipase C γ (PLC γ)를 활성화하고 이는 세포 내 calcium을 유리하고 이는 calmodulin-dependent phosphatase인 calcineurin을 활성화한다. Calcineurin은 직접 NFATc1의 serine을 탈인산화하여 핵 내로 보내고 활성화시킨다. 결과적으로 면역항체는 파골세포 분화를 촉진하게 되고, 파골세포에 의한 과도한 골 흡수는 류마티스 관절염을 악화시키게 된

다. 결국, 류마티스관절염 환자에서 파골세포 분화 억제제는 자가면역기전 자체의 이상을 교정하지는 못 해도 그 결과 유발된 관절염과 통증 등 골격계 증상은 치료할 수 있다.

[0125] 따라서, 본 발명의 osmundacetone은 파골세포의 증식 및 분화를 억제하는 효과를 나타내기 때문에, 류마티스 관절염의 예방 또는 치료효과를 나타낼 수 있다.

[0126] <적용예 3>

[0127] 파제트 병(Osteitis deformans)

[0128] 파제트 병(Osteitis deformans) 역시 파골세포의 비정상적 골 흡수가 유발한다(Singer FR, 2016). 그러면 조골 세포의 비정상적 골 생성이 진행되고 이 과정이 반복되면서 골의 기형과 그로 인한 통증, 두통, 청력손실 등이 초래된다. 팔, 다리, 골반, 척추, 두개골에 호발한다. 새로 생성된 골은 약하여 골절 빈도가 높다. 고칼슘혈증, 심장마비, 반신불수가 유발될 수 있다(Ralstone SH, 2016). 발병 원인은 밝혀져 있지 않으나 유전적 소인과 어릴 적 바이러스 감염이 그 원인으로 의심된다. 약물치료가 병의 진행을 억제하는데 도움이 된다. 현재 가장 많이 사용하는 치료제는 파골세포 분화 억제제인 Fosamax 및 골 대사를 조절하는 calcitonin이다. 하지만 Fosamax 는 부작용으로 일부 환자에서 장기 복용이 제한적이다. 통증이 심하면 Acetaminophen(Tylenol)이나 nonsteroidal anti-inflammatory drugs(NSAIDs)를 사용한다.

[0129] 따라서, 본 발명의 osmundacetone은 파골세포의 증식 및 분화를 억제하는 효과를 나타내기 때문에, 파제트 병의 예방 또는 치료효과를 나타낼 수 있다.

[0130] <적용예 4>

[0131] 골 전이암

[0132] 파골세포는 또한 고형암(solid tumor)의 골 전이를 촉진한다. 뼈는 암의 전이가 가장 호발하는 부위이다. 뼈에 암이 전이되면 극심한 통증과 함께 뼈가 부서져서 완치 가능성이 현저히 낮아진다(Weilbaecher KN et al., 2011). 전신에 퍼진 암세포들은 골수 내의 혈액 줄기세포 증식 장소에서 발견된다(Shiozawa Y et al., 2013). 암세포는 골수세포로부터 파골세포의 분화를 현저히 촉진하여 골 전이와 암 성장, 골 파괴를 촉진한다. 따라서 파골세포는 암의 골 전이에서 핵심적인 역할을 하여 파골세포 분화를 억제하면 골 전이가 감소한다. 많은 고형 암의 전이가 골 전이인데 혈액 줄기세포 증식 장소를 거점으로 혈액 줄기세포를 몰아내고 증식하다가 다시 혈액 으로 나와 다른 곳으로 전이하기도 한다. 골 전이가 가장 흔한 암은 전립선암으로서 골 전이가 암을 악화시켜서 완치를 어렵게 하고 사망의 주요 원인이다. 사람 전립선 암세포의 직접적인 주요 표적 역시 혈액 줄기세포 증식 장소로서 전이암의 거점으로 사용한다(Shiozawa Y et al., 2011). 또한 파골세포는 전립선 암 조직 내에 혈관 형성을 촉진하여 암 성장을 촉진한다(Bruni-Cardoso A et al., 2010). 유방암 세포도 파골세포 분화를 촉진하여, 유방 절제술을 시행한 유방암 환자에서 파골세포가 골 전이를 통한 암 재발을 촉진한다(Danilin S et al., 2012; Lu X et al., 2011).

[0133] 골 전이암을 예방하기 위한 골 표적 치료제가 현재 임상에서 사용되고 있으며 파골세포가 암 골 전이의 핵심 기전 중 하나이므로 항암 신약개발의 주요 표적이 되고 있다. 이에 따라 파골세포 분화를 억제하기 위한 목적으로 현재 미국 FDA 승인을 받은 유일한 bisphosphonate 계열 약제가 Zoledronic acid이다(El-Amm J et al., 2013). Zoledronic acid는 뼈를 보존하고 생존률을 높인다. 고 위험 비전이 전립선암(high risk nonmetastatic prostate cancer)에서 Zoledronic Acid는 골 전이를 크게 감소시켰다(Wirth M et al., 2014). Zoledronic acid 를 부갑상선호르몬(parathyroid hormone)과 함께 투여하면 골 전이가 더욱 감소하였다(Schneider A et al., 2005). 파골세포 분화의 신호전달물질인 RANKL에 대한 단클론 항체(monoclonal antibody)인 Denosumab 역시 전립선암의 골 전이를 억제하여 파골세포 억제가 암의 골 전이 억제에 중요함이 다시 입증되었다(Smith MR et al., 2012). Multiple myeloma 환자에서도 Zoledronic acid를 투여하면 파골세포 분화가 억제되어 골 전이가 현저히 억제된다(Zhuang J et al., 2012). 즉, 부작용 적고 저렴한 파골세포 억제제가 개발되면 암 환자에서 전이를 억제하기 위하여 장기 투여할 수 있다.

[0134] 따라서, 본 발명의 osmundacetone은 파골세포의 증식 및 분화를 억제하는 효과를 나타내기 때문에, 골 전이암의 예방 또는 치료효과를 나타낼 수 있다.

[0135] [참고문헌]

[0136] Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature

1997;390:175-9.

- [0137] Bonewald, L. F., *et al.*, Leukotriene B₄ stimulates osteoclastic bone resorption both in vitro and in vivo. *J. Bone Miner. Res.*, 11, 1619-1627, 1996.
- [0138] Bonewald, L.F. *et al.*, Effects of synthetic peptido-leukotrienes on bone resorption in vitro. *J. Bone Miner. Res.*, 11, 521-529, 1996.
- [0139] Bruni-Cardoso A, Johnson LC, Vessella RL, Peterson TE, Lynch CC. Osteoclast-derived matrix metalloproteinase-9 directly affects angiogenesis in the prostate tumor-bone microenvironment. *Mol Cancer Res.* 2010 Apr;8(4):459470. PMID: PMC2946627
- [0140] Danilin S, Merkel AR, Johnson JR, Johnson RW, Edwards JR, Sterling JA. Myeloid-derived suppressor cells expand during breast cancer progression and promote tumor-induced bone destruction. *oncoimmunology.* 2012 Dec 1;1(9):14841494.
- [0141] Darnay BG, Haridas V, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF- κ B (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF- κ B and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 1998;273:20551-5.
- [0142] Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, *et al.* RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 1999;13:2412-24.
- [0143] El-Amm J, Freeman A, Patel N, Aragon-Ching JB. Bone-targeted therapies in metastatic castration-resistant prostate cancer: evolving paradigms. *Prostate Cancer.* Hindawi Publishing Corporation; 2013;2013:210686. PMID: PMC3771418
- [0144] Ford-Hutchinson, A.W., *et al.*, Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature (London)*, 286, 264-265, 1980.
- [0145] Kim JH and Kim N. Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. *Chonnam Med J* 2016; 52:12-17.
- [0146] Kobayashi N, Kadono Y, Naito A, Matsumoto K, Yamamoto T, Tanaka S, *et al.* Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. *EMBO J* 2001; 20:1271-80.
- [0147] Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, *et al.* Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* 2004;428:758-63.
- [0148] Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, *et al.* OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999;397: 315-23.
- [0149] Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-76.
- [0150] Lee Sung-eun, Synthesis and Biological Activity of Natural Products and Designed New Hybrid Compounds for the Treatment of LTB₄ Related Disease, Ph. D thesis, Graduate School of Pusan Univ., August 1999
- [0151] Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, *et al.* TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* 1999;13: 1015-24.
- [0152] Lum L, Wong BR, Josien R, Becherer JD, Erdjument-Bromage H, SchloJ, *et al.* Evidence for a role of a tumor necrosis factor- α (TNF- α)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem* 1999;274: 13613-8.
- [0153] Lu X, Mu E, Wei Y, Riethdorf S, Yang Q, Yuan M, Yan J, Hua Y, Tiede BJ, Lu X, Haffty BG, Pantel K, MassaguE J, Kang Y. VCAM-1 promotes osteolytic expansion of indolent bone micrometastasis of breast cancer by engaging α 4 β 1-positive osteoclast progenitors. *Cancer Cell.* 2011 Dec 13;20(6):701714. PMID: PMC3241854
- [0154] Mancini A, Niedenthal R, Joos H, Koch A, Trouliaris S, Niemann H, *et al.* Identification of a second

Grb2 binding site in the v-Fms tyrosine kinase. *Oncogene* 1997;15:1565-72.

- [0155] MoA, Humphrey MB, Van Ziffle JA, Hu Y, Burghardt A, Spusta SC, et al. The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma-chain (FcRgamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:6158-63.
- [0156] Molina M´ ICREA VR-G, PARDO-DE-SANTAYANA M. Local Knowledge and Management of the Royal Fern (*Osmunda regalis* L.) in Northern Spain: Implications for Biodiversity Conservation. *American Fern Journal* 2009;99(1):4555
- [0157] Mundy, G.R., *et al.*, 5-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid stimulate isolated osteoclasts to resorb calcified matrices. *J. Bio. Chem.*, 268, 10087-10094, 1993.
- [0158] Naito A, Azuma S, Tanaka S, Miyazaki T, Takaki S, Takatsu K, et al. Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes Cells* 1999;4:353-62.
- [0159] Pitcher LA, van Oers NS. T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM- *Trends Immunol* 2003;24:554-60.
- [0160] Ralston SH. Paget disease of bone. In: Goldman L, Schafer AI, eds. *Goldman's Cecil Medicine*. 25th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2016:chap 247.
- [0161] Schneider A, Kalikin LM, Mattos AC, Keller ET, Allen MJ, Pienta KJ, McCauley LK. Bone turnover mediates preferential localization of prostate cancer in the skeleton. *Endocrinology*. 2005 Apr;146(4):17271736. PMID: 15637291
- [0162] Sherr CJ. Colony-stimulating factor-1 receptor. *Blood* 1990;75: 1-12.
- [0163] Shiozawa Y, Pedersen EA, Havens AM, Jung Y, Mishra A, Joseph J, Kim JK, Patel LR, Ying C, Ziegler AM, Pienta MJ, Song J, Wang J, Loberg RD, Krebsbach PH, Pienta KJ, Taichman RS. Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow. *J Clin Invest*. 2011 Apr;121(4):12981312. PMCID: PMC3069764.
- [0164] Shiozawa Y, Taichman RS, Keller ET. Detection and isolation of human disseminated tumor cells in the murine bone marrow stem cell niche. *Methods Mol Biol*. Humana Press; 2013;1035:207215. PMID: 23959994.
- [0165] Singer FR. Paget's disease of bone. In: Jameson JL, De Groot LJ, de Krester DM, et al, eds. *Endocrinology: Adult and Pediatric*. 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2016:chap 72.
- [0166] Smith MR, Saad F, Coleman R, Shore N, Fizazi K, Tombal B, Miller K, Sieber P, Karsh L, DamiaR, Tammela TL, Egerdie B, Van Poppel H, Chin J, Morote J, GoF, Borkowski T, Ye Z, Kupic A, Dansey R, Goessl C. Denosumab and bone-metastasis-free survival in men with castration-resistant prostate cancer: results of a phase 3, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2012 Jan 7;379(9810):3946. PMCID: PMC3671878
- [0167] Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999;20:345-57.
- [0168] Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 2002;3:889-901.
- [0169] Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 2007;7:292-304
- [0170] Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 2002;3:889-901.

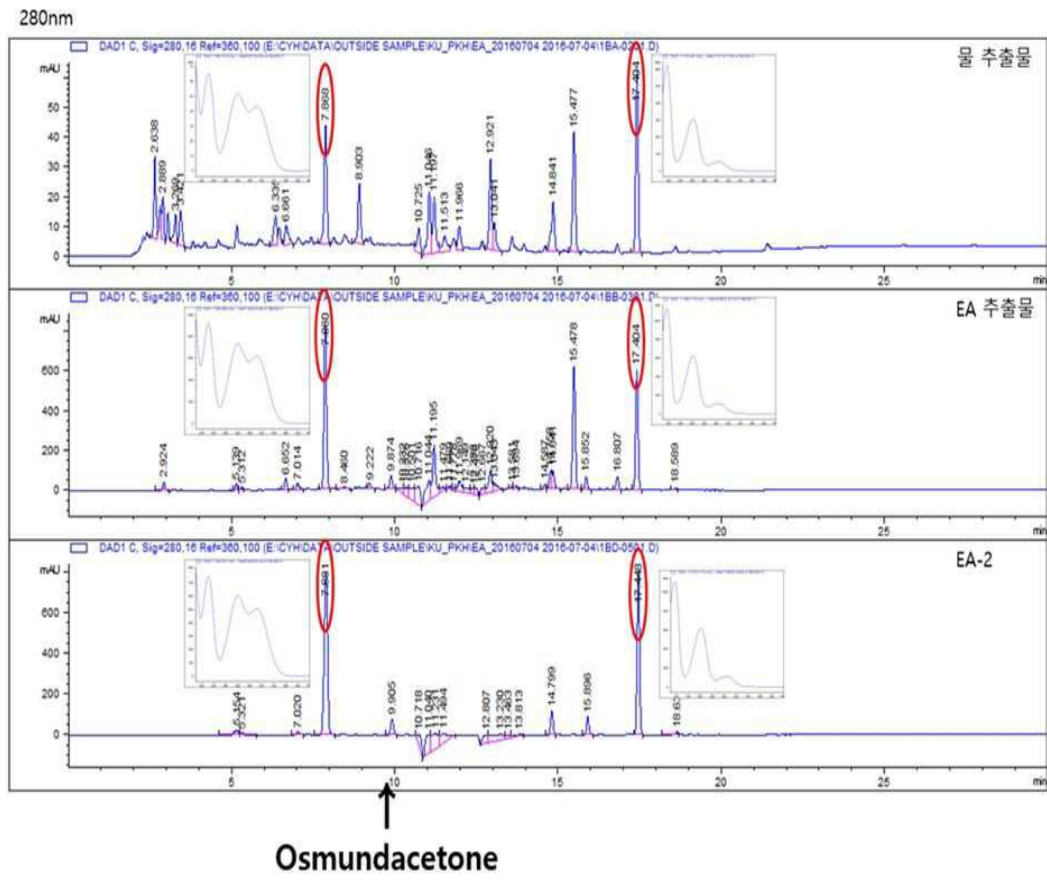
- [0171] Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. Nat Rev Genet 2003;4:638-49.
- [0172] Walsh MC, Choi Y. Biology of the TRANCE axis. Cytokine Growth Factor Rev 2003;14:251-63.
- [0173] Weilbaecher KN, Guise TA, McCauley LK. Cancer to bone: a fatal attraction. Nat Rev Cancer. 2011 Jun;11(6):411425. PMID: 21593787
- [0174] Wirth M, Tammela T, Cicalese V, Veiga FG, Delaere K, Miller K, Tubaro A, Schulze M, Debruyne F, Huland H, Patel A, Lecouvet F, Caris C, Witjes W. Prevention of Bone Metastases in Patients with High-risk Nonmetastatic Prostate Cancer Treated with Zoledronic Acid: Efficacy and Safety Results of the Zometa European Study (ZEUS). European Urology. European Association of Urology; 2014 Mar 11;:110.
- [0175] Wong BR, Besser D, Kim N, Arron JR, Vologodskaja M, Hanafusa H, et al. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. Mol Cell 1999;4:1041-9.
- [0176] Wong BR, Josien R, Lee SY, Vologodskaja M, Steinman RM, Choi Y. The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. J Biol Chem 1998;273: 28355-9.
- [0177]
- [0178] Zhuang J, Zhang J, Lwin ST, Edwards JR, Edwards CM. Osteoclasts in multiple myeloma are derived from Gr-1+ CD11b+ myeloid-derived suppressor cells. Shi S, editor. PLoS One. 2012.

산업상 이용가능성

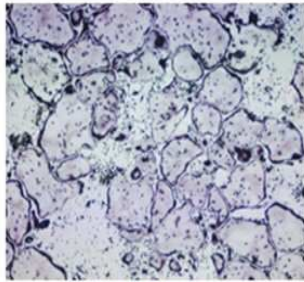
- [0179] 본 발명에 따른 조성물은 뼈 손실을 야기하는 파골세포에 대하여 강력한 증식 및 분화 억제 활성을 나타내기 때문에, 안전하고 효과적인 골다공증 치료제 또는 개선용 식품을 개발하는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면

도면1



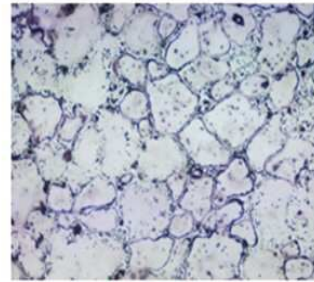
도면2



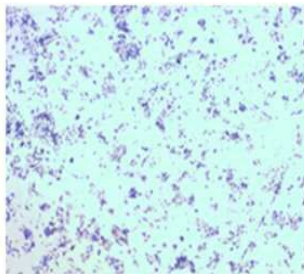
양성대조군



음성대조군



DMSO 대조군



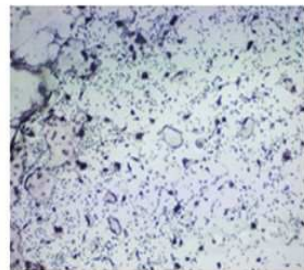
물 추출물 25µl



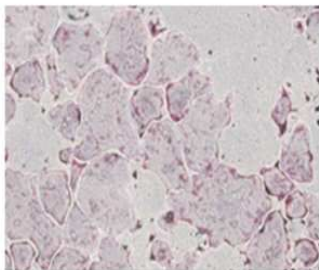
EA 추출물 25µl



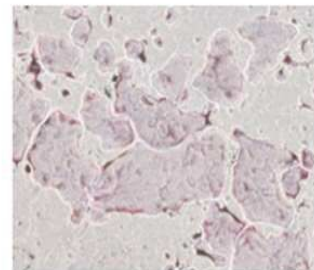
EA-2 분획물 25µl



Osmundacetone 10µM

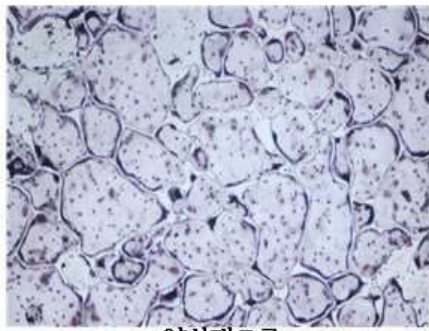


Osmundacetone 1µM



Foxamax 1µM

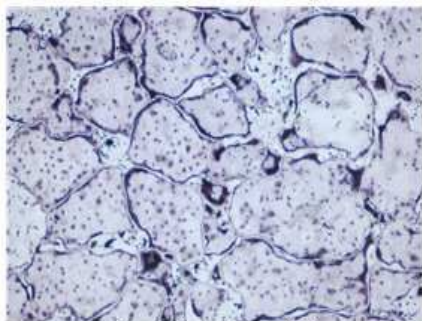
도면3



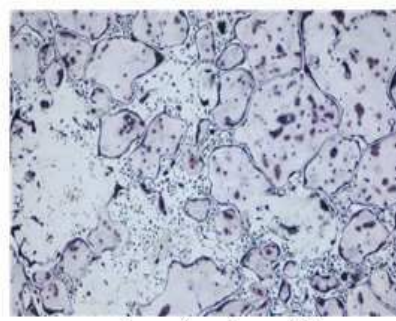
양성대조군



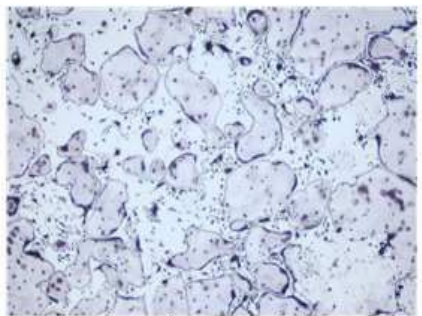
음성대조군



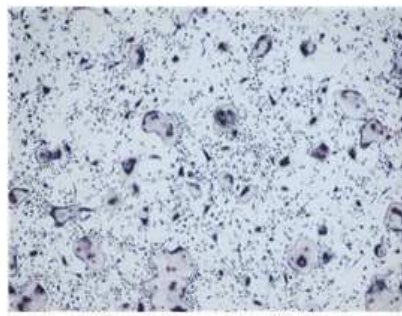
Osmundacetone 1 μ M



Osmundacetone 4 μ M



Osmundacetone 7 μ M



Osmundacetone 10 μ M