(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0001964
(43) 공개일자 2025년01월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/05 (2006.01) *A23K 10/30* (2016.01)
A23L 33/105 (2024.08) *A61P 19/02* (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/05 (2013.01)
A23K 10/30 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2024-0100329(분할)
(22) 출원일자 2024년07월29일
심사청구일자 2024년07월29일
(62) 원출원 특허 10-2023-0084272
원출원일자 2023년06월29일
심사청구일자 2023년06월29일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 조선대길 126(서석동, 산학협력단)
(72) 발명자
김춘성
광주광역시 남구 서문대로678번길 7, 101동 1002호(진월동,대주아파트)
이슬아
전라남도 목포시 연산백련로1번길 69, 102동 404호 (연산동, 목포용해2지구모아엘가 에듀파크)
(74) 대리인
특허법인리체

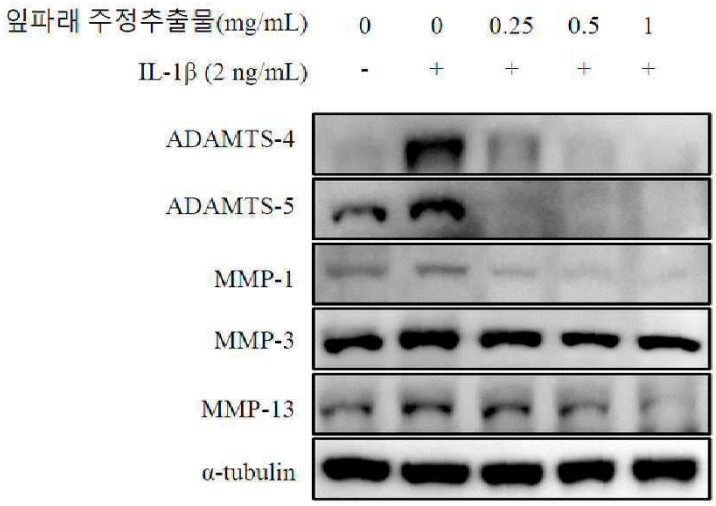
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 **잎파래 추출물을 포함하는 퇴행성 관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 잎파래 추출물을 포함하는 퇴행성 관절염의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 관절 건강 개선용 건강기능식품, 기능성 사료 첨가제 조성물 및 사료에 관한 것이다. 본 발명의 잎파래 추출물은 연골세포에 독성을 가지지 않으며, 연골세포의 보호 효과가 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2024.08)
A61P 19/02 (2018.01)
C12N 5/0655 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/306 (2013.01)
A23V 2250/202 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1525013956
과제번호 202106562
부처명 해양수산부
과제관리(전문)기관명 해양수산과학기술진흥원
연구사업명 빅데이터 기반 해양 바이러스 제어 및 마린바이오틱스 개발
연구과제명 해조류 기반 바이오 헬스케어 유효성 소재 실증 지원
기 여 율 1/1
과제수행기관명 조선대학교 산학협력단
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

잎파래 추출물을 포함하는, 시험관 내(in vitro)에서 ADAMTS-4, ADAMTS-5, MMP-1, MMP-3 및 MMP-13으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 연골 기질 분해 효소의 발현 억제용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 추출물은 C1 또는 C2 알코올을 포함하는 용매 추출물인, 연골 기질 분해 효소의 발현 억제용 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 용매에 상기 C1 또는 C2 알코올은 10부피% 내지 50부피% 포함되는, 연골 기질 분해 효소의 발현 억제용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 퇴행성 관절염 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0002] 본 발명은 관절 건강 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

[0003] 본 발명은 관절 건강 개선용 기능성 사료 첨가제 조성물 및 이를 포함하는 사료에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0004] 퇴행성 관절염은 뼈의 끝부분을 덮고 있어 뼈를 보호해주는 연골이 닳아서 없어지는 상태를 말한다. 그 원인으로는 노화, 유전적인 요소 및 환경적인 요소가 복합적으로 작용하며, 오랫동안 약한 연골을 무리하게 사용하거나 심한 운동으로 관절에 무리가 오면 발생한다. 퇴행성 관절염이 발병하면, 관절 주변에 염증이 생겨 통증과 변형이 발생한다.

[0005] 건강보험심사평가원의 국민관심질병 통계에 따르면, 2019년 퇴행성 관절염 환자 수는 404만 명으로 집계되었다. 이는 2015년 353만 명이었던 것에 비해 14% 증가한 것이며, 이 중 60대 이상이 82.3%를 차지하고 있다. 최근에는 비만, 과체중, 바르지 못한 자세 등으로 인해 젊은 층에서의 발병률도 증가하는 추세이다.

[0006] 퇴행성 관절염의 병리학적 증상은 윤활막 관절(synovial joints)에서 관절 연골 소실의 국소적인 부위를 특징으로 하며, 이는 뼈의 비대(hypertrophy) 및 관절 캡슐(joint capsule)의 비후(thickening)와 연관된다. 퇴행성 관절염의 원인은 세포와 사이토카인, 성장인자, 염증매개자, 메탈로프로티나아제(MMPs) 및 연골분해성(chondrodegenerative) 효소와 같은 수용성 매개자들과의 복합 상호작용을 포함하는 것으로 생각된다.

[0007] 퇴행성 관절염의 치료에 가장 널리 쓰이는 약물은 비스테로이드성 소염제이다. 다만, 이의 부작용으로 속 쓰림, 거북함, 설사 또는 변비의 형태로 위장관계 장애가 나타날 수 있으며, 장기 복용시 위궤양 및 출혈이 생길 수 있다.

[0008] 따라서 기존 퇴행성 관절염 치료 약물의 부작용 문제로 인하여 부작용 위험이 적은 약물 개발에 대한 수요가 높은 실정이다. 천연물 유래 약물이 상기한 부작용 문제에 대한 우려를 해소시킬 수 있는 유망한 후보로 여겨지고 있다.

[0009] 이에, 다양한 천연물 유래 소재들이 제시되고 있으나, 현재까지 퇴행성 관절염 개선용으로 개발된 소재들에 대해서 그 효능이 충분하지 못한 것으로 인식되고 있어, 여전히 향상된 효능의 천연물 유래 소재 개발이 요구되고

있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1571792호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 퇴행성 관절염의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0013] 본 발명은 관절 건강 개선용 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0014] 본 발명은 관절 건강 개선용 기능성 사료 첨가제 조성물 및 기능성 사료를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0015] 1. 잎파래 추출물을 포함하는 퇴행성 관절염의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0016] 2. 위 1에 있어서, 상기 추출물은 C1 내지 C2 알코올을 포함하는 용매 추출물인, 퇴행성 관절염의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0017] 3. 위 2에 있어서, 상기 용매에 상기 C1 내지 C2 알코올은 10부피% 내지 50부피% 포함되는, 퇴행성 관절염의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[0018] 4. 잎파래 추출물을 포함하는 관절 건강 개선용 건강기능식품.

[0019] 5. 위 4에 있어서, 상기 추출물은 C1 내지 C2 알코올을 포함하는 용매 추출물인, 관절 건강 개선용 건강기능식품.

[0020] 6. 잎파래 추출물을 포함하는 관절 건강 개선용 기능성 사료 첨가제 조성물.

[0021] 7. 위 6에 있어서, 상기 추출물은 C1 내지 C2 알코올을 포함하는 용매 추출물인, 관절 건강 개선용 기능성 사료 첨가제 조성물.

[0022] 8. 위 6 또는 7의 기능성 사료 첨가제 조성물을 포함하는 관절 건강 개선용 기능성 사료.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 약학 조성물, 건강기능식품, 기능성 사료 첨가제 조성물 및 사료는 연골세포에 항염증 효과가 있다.

[0024] 본 발명의 약학 조성물, 건강기능식품 및 기능성 사료 첨가제 조성물 및 사료는 연골기질분해효소들의 발현을 억제시키는 효과가 있으며, 연골보호효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 잎파래 추출물의 연골세포에 대한 독성효능 평가인 MTT assay 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 2는 잎파래 추출물의 연골세포에 대한 Nitric Oxide assay 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 잎파래 추출물의 연골세포에 대한 PGE2 assay 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 잎파래 추출물의 연골세포에 대한 보호 효과를 보여주는 것으로, 연골기질을 분해하는 이화효소들인 ADAMTS-4, ADAMTS-5, MMP-1, MMP-3 및 MMP-13 의 발현을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0029] 본 발명은 잎파래 추출물을 포함하는 퇴행성 관절염의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0030] 잎파래(*Enteromorpha linza*)는 한국 연안에 보편적으로 생육하고, 특히 부영양화되거나 하수가 유입되는 곳에도 잘 자라는, 녹조식물 갈파래과의 바닷말이다. 잎파래는 파도치는 조간대 암반에 군락을 이루며, 부드러운 질감과 암녹색의 엽체, 쐐기꼴 모양의 기부 형태 등에 의해 다른 갈파래종들과 쉽게 구분된다. 잎파래는 조그마한 기부에서 여러 개체가 모여서 나며, 길쭉하고 편평한 엽상체를 이룬다. 보통 길이는 10~20cm, 나비는 넓은 부분이 0.5~10cm이고, 표면에 주름을 갖고 있다.

[0031] 용어 "추출물(extract)"은 액체 혼합물 또는 고체 혼합물로부터 용매에 의해 분리된 물질을 의미한다.

[0032] 추출물은 용액, 농축물 또는 분말 상태일 수 있다.

[0033] 추출용매는 당업계에서 통상적으로 사용되는 추출용매라면 제한 없이 사용될 수 있다. 추출용매는 C1 내지 C2 알코올을 포함할 수 있다. 예를 들어, 추출용매는 물 및 C1 내지 C2 알코올의 혼합물일 수 있다.

[0034] 추출용매가 C1 내지 C2 알코올을 포함하는 경우, C1 내지 C2 알코올의 부피%는 잎파래 추출물을 제조하기에 적절한 정도로 통상의 기술자에 의해 적절히 선택될 수 있다. 예를 들어, C1 내지 C2 알코올의 부피%는 10부피% 내지 90부피%, 10부피% 내지 80부피%, 10부피% 내지 70부피%, 10부피% 내지 60부피%, 10부피% 내지 50부피%, 15부피% 내지 50부피%, 15부피% 내지 45부피%, 20부피% 내지 40부피%일 수 있다.

[0035] 추출방법은 당업계에서 통상적으로 사용되는 추출방법이라면 제한 없이 사용될 수 있다. 예를 들어, 열수 추출, 가열 추출, 초음파 추출, 냉침 추출, 증류 추출, 환류 냉각 추출 또는 이 중 둘 이상의 조합일 수 있다. 구체적인 예를 들면, 가열 추출일 수 있다.

[0036] 추출온도는 잎파래 추출물을 제조하기에 적절한 정도로 통상의 기술자에 의해 적절히 선택될 수 있다. 예를 들어 50℃ 내지 95℃, 60℃ 내지 95℃, 70℃ 내지 95℃, 80℃ 내지 95℃, 85℃ 내지 95℃에서 수행될 수 있다.

[0037] 추출시간은 잎파래 추출물을 제조하기에 적절한 정도로 통상의 기술자에 의해 적절히 선택될 수 있다. 예를 들어 0.5시간 내지 4시간, 1시간 내지 3.5시간, 1시간 내지 3시간, 1.5시간 내지 2.5시간 동안 수행될 수 있다.

[0038] 본 명세서에서 "예방"이란 물질의 투여로 퇴행성 관절염 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0039] 본 명세서에서 "치료" 란 물질의 투여로 대사 질환의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본 발명의 약학 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

[0040] 본 발명의 조성물에는 약학적으로 허용 가능한 담체가 포함될 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 신체의 한 기관 또는 부분으로부터 신체의 다른 기관 또는 부분으로 활성 성분을 수송하는 역할을 하는 액체 또는 고체 충진제, 희석제, 부형제 또는 용매와 같은 약제학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 운반체(vehicle)을 의미한다. 본 발명의 약학 조성물은 잎파래 주정 추출물과 함께 추가로 약학적으로 허용되는 1종 이상의 담체를 첨가하여 약제로 제조될 수 있다. 상기에서 '약학적으로 허용 가능한'이란 생리학적으로 허용되고 인간 또는 동물에게 투여될 때, 통상적으로 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 말한다. 상기 담체로는 식염수, 완충 식염수, 물, 글리세롤 및 에탄올 등이 있으나 이에 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 적합한 제제가 모두 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구 투여될 수 있다.

[0042] 용어 "투여"는 적절한 방법으로 투여 대상에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 것을 의미한다.

[0043] 비경구적인 투여방법으로는 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044] 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 크림제, 로션제, 외용연고제, 오일제, 보습제, 겔제, 에어로졸 및 비강

흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다.

[0045] 상기 비경구 투여용 제제는 예를 들면 피부에 사용하는 파스일 수 있고, 패치, 첩부제(플라스타)와 습포제(카타플라스마) 등으로 제형화할 수 있다.

[0046] 경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 약학 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 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 카르복시메틸셀룰로즈 및 하이드록시 프로필메틸-셀룰로즈 등을 포함하는 셀룰로즈류, 젤라틴 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한 경우에 다라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 붕해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 본 발명의 약학 조성물은 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0047] 상기 제제의 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다. 특정 대상에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 대상의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명의 약학 조성물의 바람직한 투여량은 전술한 사항을 고려하여 결정할 수 있으며, 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0048] 본 발명의 약학 조성물은 퇴행성 관절염의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로 사용하거나, 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0049] 본 발명의 조성물이 적용될 수 있는 대상은 퇴행성 관절염이 발생할 수 있는 임의의 동물일 수 있으며, 상기 동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 개, 고양이, 토끼, 기니피그, 소, 돼지, 양, 말 등의 반려동물 또는 가축을 포함한다.

[0051] 본 발명은 잎파래 추출물을 포함하는 관절 건강의 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

[0052] 상기 건강기능식품은 관절 통증 개선, 관절 기능 개선, 관절 염증 부종의 감소, 연골 보호, 퇴행성 관절염의 예방 또는 개선 등 관절 건강에 도움이 된다.

[0053] 상기 추출물의 추출용매, 추출방법, 추출온도, 추출시간 및 이의 효과에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0054] 본 발명의 건강기능식품은 상기 추출물을 포함한 음료(알코올성 음료 포함), 과실 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지콘비프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등일 수 있다.

[0055] 또한, 본 발명의 건강기능식품은 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제, 액제 제형 등으로 제형화된 것일 수도 있다. 이들은 담체, 희석제, 부형제 및 첨가제 중 하나 이상을 더 포함하여 제형화될 수 있다.

[0056] 본 발명의 건강기능식품에 더 포함될 수 있는 첨가제로는, 천연 탄수화물, 향미제, 영양제, 비타민, 광물(전해질), 풍미제(합성 풍미제, 천연 풍미제 등), 착색제, 충진제(치즈, 초콜렛 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 산화 방지제, 글리세린, 알코올, 탄산화제 및 과육으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 성분을 사용할 수 있다.

[0057] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충진제(치즈, 초콜렛 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 건강기능식품은 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0058] 담체, 부형제, 희석제 및 첨가제의 구체적인 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 슈크로즈, 솔비톨, 만니톨, 에리스리

톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 미세결정성 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 물, 설탕시럽, 메틸 하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 활석, 스테아트산 마그네슘, 미네랄 오일 및 이들의 혼합물 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0059] 상술한 제형 내 유효성분으로서의 본 발명의 건강기능식품의 함량은 사용 형태 및 목적, 사용자 상태, 증상의 종류 및 경중 등에 의하여 적절하게 조절될 수 있으며, 고형분 중량 기준으로 0.001 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 50 중량%일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0061] 본 발명은 잎파래 추출물을 포함하는 관절 건강 개선용 기능성 사료 첨가제 조성물 및 이를 포함하는 기능성 사료에 관한 것이다.

[0062] 상기 첨가제는 관절 통증 개선, 관절 기능 개선, 관절 염증 부종의 감소, 연골 보호, 퇴행성 관절염의 예방 또는 개선 등 관절 건강에 도움이 된다.

[0063] 상기 추출물의 추출용매, 추출방법, 추출온도, 추출시간 및 이의 효과에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0064] 상기 사료는 임의의 동물을 대상으로 할 수 있으며, 상기 동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 개, 고양이, 토끼, 기니피그, 소, 돼지, 양, 말 등의 반려동물 또는 가축을 포함한다.

[0065] 필요에 따라, 본 발명의 사료 첨가제 조성물은 상기 잎파래 추출물 외에 추출물의 효과 증진을 위한 다양한 다른 종류의 추출물을 추가로 포함할 수 있다.

[0066] 본 발명의 사료 첨가제 조성물은 또한, 곡물, 예를 들면 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀; 식물성 단백질 사료, 예를 들면 평지, 콩, 및 해바라기를 주성분으로 하는 사료; 동물성 단백질 사료, 예를 들면 혈분, 육분, 골분 및 생선분; 당분 및 유제품, 예를 들면 각종 분유 및 유장 분말로 이루어지는 건조 성분 등을 더 포함할 수 있으며, 이외에도 영양 보충제, 소화 및 흡수 향상제, 성장 촉진제 등을 더 포함할 수 있다.

[0067] 상기 사료 첨가제 조성물은 당업자의 목적에 따라 사료에 대하여 0.001 내지 20, 0.01 내지 20, 0.1 내지 20, 또는 1 내지 20 중량%로 포함되는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0068] 상기 사료는 당 분야에 공지된 사료에 상기 사료 첨가제 조성물을 첨가한 것일 수 있다. 예를 들면 곡물 (예를 들면, 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀), 식물성 단백질 사료 (예를 들면, 평지, 콩, 및 해바라기를 주성분으로 하는 사료), 동물성 단백질 사료 (예를 들면, 혈분, 육분, 골분 및 생선분) 등의 사료에 상기 첨가제를 첨가한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0069] 상기 사료는 통상의 사료 형태로 제제화될 수 있으며, 통상의 사료 성분을 함께 포함할 수 있다. 상기 사료는 일반 사료, 계절용 사료, 생간식 사료, 또는 간식 사료 형태일 수 있다. 상기 사료의 형상으로서는 분체, 과립, 펠릿, 현탁액 등의 적당한 상태일 수 있다.

[0070] 사료는 동물의 식이 욕구를 충족시키는데 통상적으로 사용되는 임의의 단백질-함유 유기 곡분을 포함할 수 있다. 이러한 단백질-함유 곡분은 통상적으로 옥수수, 콩 곡분, 또는 옥수수/콩 곡분 믹스로 주로 구성될 수 있다.

[0072] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0074] **제조예**

[0075] 원물 대비 20배수의 30%주정을 첨가한 후, 90℃에서 2시간 동안 환류추출 수행 후 여과지로 용질과 용매를 분리하였다. 이후 회전감압농축기로 용매를 증발시키고 동결건조하여 잎파래 추출물을 제조하였다. 상기 방법으로 제조된 잎파래 추출물을 아래 실험들에 사용하였다.

[0077] **실시예.**

[0078] **1. 잎파래 주정 추출물의 연골세포 독성효능 평가(MTT assay)**

[0079] 생후 5일경 랫트의 무릎 관절에서 연골세포(rat chondrocytes; RC)를 채취하여 초대배양하였다. 12-well plate에 연골세포를 1×10^6 cell/mL로 시딩하였다. 하룻밤 지난 후 잎파래 주정 추출물을 각 plate에 0, 0.25. 0.5, 1, 2 mg/mL로 처리하여 24간 동안 반응시켰다. 각 plate에 MTT 용액(5 mg/mL)을 mL당 100 μL씩 첨가 후 4시간 동안 추가 반응시켰다. 그 후, 형성된 formazan을 DMSO에 넣어 용해한 후 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 하기 수학식 1로 계산하였다.

[0080] [수학식 1]

[0081] $$\text{Cell viability}(\%) = \frac{Means\ Abs.of\ the\ sample - Means\ Abs.of\ the\ blank}{Means\ Abs.of\ the\ control - Means\ Abs.of\ the\ control} \times 100$$

[0083] 실험 결과, 잎파래 주정 추출물이 연골세포에 독성이 없음을 확인할 수 있었다(도 1).

[0085] **2. 잎파래 주정 추출물의 연골세포 항염증 효과 평가(Nitric oxide assay)**

[0086] 연골세포를 12-well plate에 1×10^6 cell/mL로 시딩하였다. 하룻밤 지난 후 잎파래 주정 추출물을 각 plate에 0, 0.25. 0.5, 1, 2 mg/mL로 1시간 전처리한 후, IL-1β 10 ng/mL를 처리하여 24시간 동안 반응시켰다. 반응액 제거 후, media 100 μL와 Griess reagent 100 μL를 혼합하여 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다. $NaNO_3$로 표준검량선 작성 후, 배양액 내에 축적된 질산염 농도를 측정하였다(도 2).

[0087] 축적된 질산염 양이 적을수록 염증이 억제되었다고 간주되며, 실험 결과 잎파래 주정 추출물이 연골세포에 항염증효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0089] **3. 잎파래 주정 추출물의 항염증 효과 평가(PGE_2 assay)**

[0090] 연골세포를 12-well plate에 1×10^6 cell/mL로 시딩하였다. 하룻밤 지난 후 옥덩굴 주정 추출물을 각 plate에 0, 0.25, 0.5. 1 mg/mL로 1시간 전처리한 후, IL-1β 10 ng/mL를 처리하여 24간 동안 반응시켰다. media를 수확하여 PGE_2 elisa kit를 이용하여 분석하였다(도 3).

[0091] PGE_2(Prostaglandin E_2)는 염증반응을 유도하는 중요한 인자로, 실험 결과 옥덩굴 주정 추출물이 PGE_2 활성을 억제하여 연골세포에 항염증효과가 있음을 확인할 수 있었다.

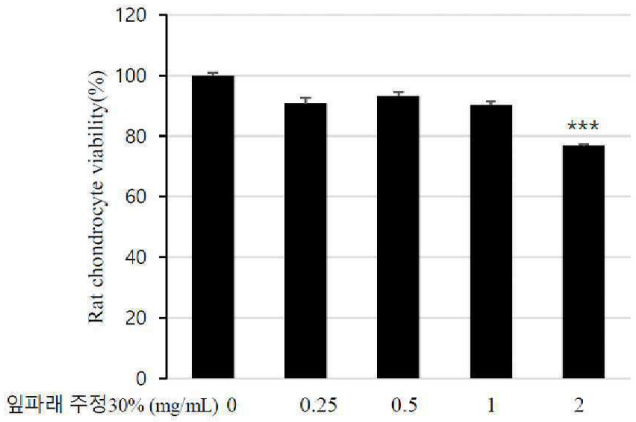
[0093] **4. 잎파래 주정 추출물의 연골 보호 효과 확인(Anti-catabolic activity)**

[0094] 연골세포를 12-well plate에 1×10^6 cell/mL로 시딩하였다. 하룻밤 지난 후 잎파래 주정 추출물을 각 plate에 0, 0.25. 0.5, 1 mg/mL로 1시간 전처리한 후, IL-1β 10 ng/mL를 처리하여 24간 동안 반응시켰다. 반응액 제거 후, protein extraction buffer를 이용하여 전체 단백질을 추출 및 정량하였다. 동량의 단백질로 웨스턴 블롯을 수행한 후 각각 일차 항체를 부착하여 그 발현을 분석하였다(도 4).

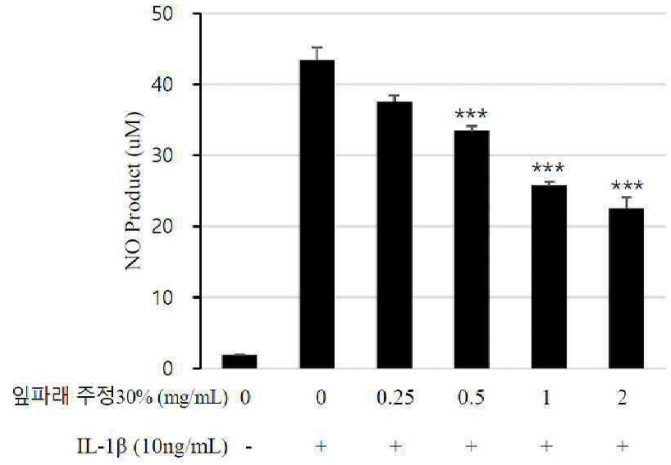
[0095] 연골기질을 분해하는 이화효소들의 발현이 적을수록 연골기질의 분해가 억제되어 연골 보호 효과가 있다고 간주되며, 실험 결과 잎파래 주정 추출물이 연골기질을 분해하는 대표적인 이화효소(ADAMTS-4, 5, MMP-1, 3, 13)들의 발현을 억제시킴으로써 연골 보호 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.

도면

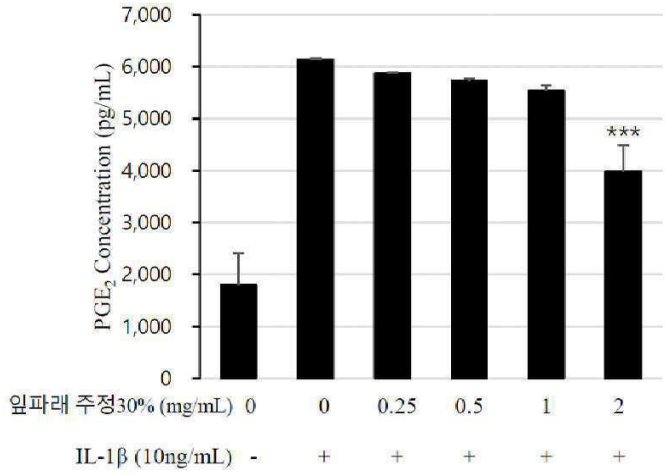
도면1



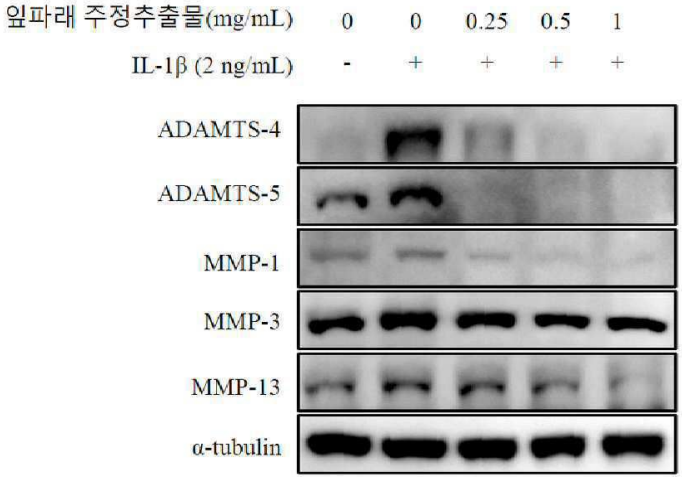
도면2



도면3



도면4


잎파래 주정추출물(mg/mL) 0 0 0.25 0.5 1
IL-1β (2 ng/mL) - + + + +
ADAMTS-4
ADAMTS-5
MMP-1
MMP-3
MMP-13
α-tubulin