



2018년 4월 5일 (05.04.2018)

WIPO | PCT

(51) 국제특허분류:

A61K 31/12 (2006.01)

A23L 33/10 (2016.01)

A61K 36/11 (2006.01)

A23L 33/105 (2016.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2017/010822

(22) 국제출원일:

2017년 9월 28일 (28.09.2017)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2016-0126767 2016년 9월 30일 (30.09.2016) KR

10-2016-0142422 2016년 10월 28일 (28.10.2016) KR

(71) 출원인: 주식회사 코팜 (KORPHARM CO., LTD.) [KR/KR]; 10497 경기도 고양시 덕양구 화정로 65, 1515호 (화정동, 한화오벨리스크), Gyeonggi-do (KR). 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가), Seoul (KR).

(72) 발명자: 박길홍 (PARK, Gil Hong); 04427 서울특별시 용산구 이촌로 64길 15, 107동 302호, Seoul (KR). 손그

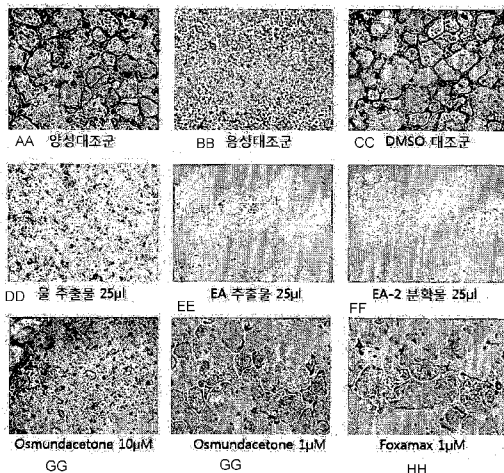
림 (SON, Geu Rim); 07587 서울특별시 강서구 공항대로 3S1-21, 101동 201호, Seoul (KR). 홍성수 (HONG, Seong Su); 18328 경기도 화성시 봉담읍 와우로34번길 30, 116동 1004호, Gyeonggi-do (KR). 최춘환 (CHOI, Chun Whan); 16910 경기도 용인시 기흥구 마북로 140, 102동 1102호, Gyeonggi-do (KR). 최윤혁 (CHOI, Yun Hyeok); 16519 경기도 수원시 영통구 중부대로 448번길 28, 207동 1902호, Gyeonggi-do (KR). 김우중 (KIM, Woo Jung); 16533 경기도 수원시 팔달구 권광로 276번길 9, 103동 1905호, Gyeonggi-do (KR). 김한경 (KIM, Han Kyeom); 08090 서울특별시 양천구 목동서로 400, 1014동 503호, Seoul (KR). 강재우 (KANG, Jae Woo); 04572 서울특별시 중구 청계천로 400, Seoul (KR). 이은정 (LEE, Eun Jung); 12093 경기도 남양주시(별내동, 별내하우스토리), Gyeonggi-do (KR). 박석인 (PARK, Serk In); 02873 서울특별시 성북구 낙산길 255, 102동 1304호, Seoul (KR). 이기호 (LEE, Kee Ho); 01374 서울특별시 도봉구 시루봉로 71, 106동 405호, Seoul (KR). 최민지 (CHOI, Min Ji); 11714 경기도 의정부시 평화로 153, 대희파인빌 1동 302호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 이희숙 (LEE, Hee Sook); 06141 서울시 강남구 테헤란로 33길 11, 9층 (역삼동, JS빌딩), Seoul (KR).

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING OSMUNDACETONE OR PHARMACEUTICALLY ACCEPTABLE SALT THEREOF FOR PREVENTING OR TREATING BONE DISEASE

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

[도 2]



AA ... Positive control group
BB ... Negative control group
CC ... DMSO control group
DD ... Water extract
EE ... EA extract
FF ... EA-2 fraction
GG ... Osmundacetone
HH ... Foxamax

(57) Abstract: The present invention relates to a composition comprising osmundacetone or a pharmaceutically acceptable salt thereof for preventing or treating bone diseases. More specifically, the present invention relates to: a composition comprising osmundacetone, a pharmaceutically acceptable salt thereof, or an osmunda japonica extract as an effective ingredient, for preventing or treating osteoporosis, rheumatoid arthritis, arthralgia, Paget disease, bone metastatic cancer, or fracture; a food composition for improvement; a use of a salt; and a treatment method. The composition according to the present invention shows a strong inhibitory activity against proliferation and differentiation of osteoclast which causes bone loss, and activation of differentiation of osteoblast, and thus can be usefully utilized in developing medicines for safe and effective treatment of bone diseases or functional foods for improving symptoms of bone diseases.

(57) 요약서: 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, 골전이암 또는 골절의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 개선용 식품용 조성물, 염의 용도 및 치료방법에 대한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 뼈 손실을 야기하는 파골세포에 대하여 강력한 증식 및 분화 억제 활성을 나타내고, 조골세포 분화를 활성화하는 효과를 나타내기 때문에, 안전하고 효과적인 골 질환 치료용 의약품 또는 증상개선용 기능성 식품을 개발하는데 유용하게 이용될 수 있다.



(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

【명세서】

【발명의 명칭】

오스문드아세톤 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 골 질환 예방 또는 치료용 조성물

【기술분야】

<1> 본 출원은 2016년 9월 30일에 출원된 대한민국 특허출원 제10-2016-0126767호 및 2016년 10월 28일에 출원된 대한민국 특허출원 제10-2016-0142422호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.

<2>

<3> 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, 예방 또는 치료용 제제의 제조에 사용하는 용도, 치료방법에 대한 것이다.

<4>

【배경기술】

<5> 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).

<6>

<7> 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.

<8>

<9> 골수 대식세포/단핵세포 세포주(macrophage/monocytes 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)

<10>

<11> 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 대사산물이 뼈 조직 대사에 미치는 영향에 대하여서도 많은 연구가 이루어졌다(Lee Sung-eun, 1999). Leukotriene-B4(LTB4)는 arachidonate의 대사 경로인 5-lipoxygenase pathway의 대사산물 중 하나이다(Ford-Hutchinson, A. W. *et al.*, 1980). Giant cell tumor에서 얻은 간질세포주(interstitial cell)인 C433은 5-lipoxygenase 대사산물을 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.

<12>

<13> 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 과민반응 환자, 임산부, 모유수유, 고칼슘혈증(hypercalcemia), 신부전, 부갑상선 기능항진증(hyperparathyroidism)과 파제트 병(Paget' disease) 등의 대사성 골 질환, 원인미상의 알칼리포스파타제 활성 증가(unexplained elevations of alkaline phosphatase), 방사선 치료 환자, 골수암 혹은 골 전이암 환자 등에게는 사용할 수 없기 때문에 적용 가능한 환자군이 크지 않다.

<14>

<15> 따라서 보다 효과가 강력하고 안전하며, 기존 치료제보다 저비용으로 생산가능한 골 관련 질환 치료제 개발이 시급히 요구되고 있다.

<16>

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

<17> 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.

<18>

<19> 따라서 본 발명의 목적은

<20> 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 제공

하는 것이다.

<21>

<22> 본 발명의 다른 목적은

<23> 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.

<24>

<25> 본 발명의 또 다른 목적은

<26> 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.

<27>

<28> 본 발명의 또 다른 목적은

<29> 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.

<30>

<31> 본 발명의 또 다른 목적은

<32> 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 치료용 제제의 제조에 사용되는 Osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공하는 것이다.

<33>

<34> 본 발명의 또 다른 목적은

<35> Osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 치료 방법을 제공하는 것이다.

<36>

<37> 본 발명의 또 다른 목적은

<38> 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루

어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 꿀 질환 예방 또는 치료용 제제의 제조에 사용하기 위한 고비(*Osmunda japonica*) 추출물의 용도를 제공하는 것이다.

<39>

<40> 본 발명의 또 다른 목적은

<41> 고비(*Osmunda japonica*) 추출물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 꿀 질환 치료 방법을 제공하는 것이다.

<42>

【기술적 해결방법】

<43> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

<44> Osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 꿀 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

<45>

<46> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

<47> Osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 유효성분으로 구성되는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 꿀 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

<48>

<49> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

<50> Osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 유효성분으로 필수적으로 구성되는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 꿀 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

<51>

<52> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

<53> Osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 꿀 질환 예방 또는 개선용 식품용 조성물을 제공한다.

한다.

<54>

<55> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

<56> Osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 유효성분으로 구성되는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 개선용 식품용 조성물을 제공한다.

<57>

<58> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

<59> Osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 유효성분으로 필수적으로 구성되는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 개선용 식품용 조성물을 제공한다.

<60>

<61> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

<62> 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.

<63>

<64> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

<65> 고비(*Osmunda japonica*) 추출물이 유효성분으로 구성되는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

<66>

<67> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

<68> 고비(*Osmunda japonica*) 추출물이 유효성분으로 필수적으로 구성되는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

<69>

<70> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

<71> 고비(*Osmunda japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느

하나 이상의 꿀 질환 예방 또는 개선용 식품용 조성물을 제공한다.

<72>

<73> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

<74> 고비(*Osmunda japonica*) 추출물이 유효성분으로 구성되는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 꿀 질환 예방 또는 개선용 식품용 조성물을 제공한다.

<75>

<76> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

<77> 고비(*Osmunda japonica*) 추출물이 유효성분으로 필수적으로 구성되는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 꿀 질환 예방 또는 개선용 식품용 조성물을 제공한다.

<78>

<79> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

<80> 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 꿀 질환 예방 또는 치료용 제제의 제조에 사용되는 *Osmundacetone* 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.

<81>

<82> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

<83> *Osmundacetone* 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 꿀 질환 치료 방법을 제공한다.

<84>

<85> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

<86> 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 꿀 질환 예방 또는 치료용 제제의 제조에 사용하기 위한 고비(*Osmunda japonica*) 추출물의 용도를 제공한다.

<87>

<88> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

<89> 고비(*Osmunda japonica*) 추출물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 꿀 질환 치료 방법을 제공한다.

다.

<90>

<91> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

<92>

<93> 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.

<94>

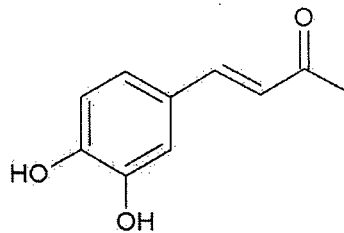
<95> 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 osmundacetone을 유효성분으로 포함하는 조성물일 수도 있고, 유효성분으로서 osmundacetone으로 구성되는 조성물일 수도 있으며, 또는 유효성분으로서 osmundacetone이 필수적으로 구성되는 조성물일 수도 있다.

<96>

<97> 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.

<98>

< Osmundacetone의 구조 >



<99>

<100> 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 증식 및 분화 억제 활성과 조골세포의 분화 활성화 능력을 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.

<101> 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).

<102>

<103> 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, 브롬산, 황산 및 인산을 포함한다.

<104>

<105> 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.

<106>

<107> 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.

<108>

<109> 고비과에 속하는 고비(*Osmunda japonica*)는 학명이 *Osmunda japonica* Thunb. 또는 *Osmunda nipponica* Makino이며, 라틴명으로는 Osmundae Rhizoma라고 한다. 영문으로 Japanese royal fern 또는 Japanese flowering fern으로도 불리는 식물로, 일본, 중국, 한국, 대만 등지의 동아시아와 러시아 등에 자생하는 식물이다. 고비의 어린잎이 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, 온열반진, 토혈, 비혈, 암치질로 인한 변혈, 적리, 대하증 등의 치료에 사용한다(중약대사전).

<110>

<111> 본 발명자들은 일실시에에서 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.

<112>

<113> 본 발명자들은 HPLC와 NMR을 이용하여 고비 추출물에서 파골세포 분화 억제 및 조골세포 분화 활성화 효과가 있는 성분을 분리 동정하였다. 고비의 열수 추출물과 에틸 아세테이트 추출물/분획물로부터 분리 동정된 단일 화합물이 osmundacetone이다. Osmundacetone은 뛰어난 파골세포 분화 억제 활성과 조골세포 활성화 활성을

가지고 있을 뿐만 아니라, 세포독성은 매우 낮아 안전한 것으로 나타났다.

<114>

<115> 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.

<116>

<117> 바람직하게는, 본 발명에서 상기 골 질환은 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 또는 골절일 수 있으며, 상기 각각의 질환과 파골세포와의 상관관계에 대해서는 본 명세서의 적용예를 참고한다.

<118>

<119> 본 명세서에서 '치료'란 치료되는 개체 또는 세포의 자연적 과정을 변경시키려는 임상적 기술을 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.

<120>

<121> 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, 골 질환의 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.

<122>

<123> 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 발

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

<124>

<125> 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다.

<126>

바람직하게 본 발명의 약학적 조성물의 전체 용량은 1일당 환자 체중 1kg 당 약 0.01 μ g 내지 10,000mg, 가장 바람직하게는 0.1 μ g 내지 500mg일 수 있다. 그러나 상기 약학적 조성물의 용량은 제제화 방법, 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설을 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 조성물의 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

<127>

<128> 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.

<129>

<130> 투여 경로로는 경구적 또는 비경구적으로 투여될 수 있다. 비경구적인 투여 방법으로는 이에 한정되지는 않으나 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여될 수 있다.

<131>

<132> 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 카르복시메틸셀룰로오즈 및 하이드록시프로필메틸셀룰로오즈 등을 포함하는 셀룰로오류, 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 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

<133>

<134> 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.

<135>

<136> 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.

<137>

<138> 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.

<139>

<140> 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

<141>

<142> 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS), 카보하이드레이트(예를 들어, 글루코스, 만노스, 슈크로스 또는 텍스트란), 항산화제, 정균제, 킬레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 아췌반트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제 및/또는 보존제를 추가로 포함할 수 있다.

<143>

<144> 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.

<145>

<146> 또한 본 발명은 osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효 성분으로 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.

<147>

<148> 본 발명자들이 규명한 osmundacetone의 상기 골 질환에 대한 예방 또는 개선의 효과는 본 명세서에서 전술한 바와 같다.

<149>

<150> 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.

<151>

<152> 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.

<153>

<154> 또한 기능성 식품으로는 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품 (예를 들어 과일 통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 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, 옻, 유제품(예를 들어 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동 식품, 각종 조미료(예를 들어 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 식품용 조성물을 첨가하여 제조할 수 있다.

<155>

<156> 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.

<157>

<158> 또한 본 발명은 고비(*Osmunda japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

<159>

<160> 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 억제하고 조골

세포 분화를 활성화하는 활성을 갖는 것으로 규명한 바 있다.

<161>

<162> 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.

<163>

<164> 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.

<165>

<166> 상기 추출 용매로는 물, 에탄올, 주정, 메탄올, 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol), 아세톤, 에테르, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산, 시클로헥산, 석유에테르(petroleum ether), 디에틸 에테르, 벤젠으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 용매를 사용할 수 있다.

<167>

<168> 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 제거하고 고형화하여 분말 형태로 제조할 수 있다.

<169>

<170> 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.

<171>

<172> 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.

<173>

<174> 또한 본 발명은 고비(*Osmunda japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 개선용 식품용 조성물을 제공한다.

<175>

<176> 상기 식품용 조성물을 제조하기 위한 고비 추출물에 대하여서는 전술한 바와 같다. 또한 상기 식품용 조성물의 예시 및 함유량에 대하여서도 전술한 바와 같다.

<177>

<178> 또한 본 발명은 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 치료용 제제의 제조에 사용되는 Osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.

<179>

<180> 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, 브롬산, 황산 및 인산을 포함한다.

<181>

<182> 본 발명의 치료용 제제의 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, 상기한 골 질환의 개선, 치료, 예방 효과를 나타내기에 충분한 양을 말

한다. 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.

<183>

<184> 상기 투여는 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다. 본 발명의 치료용 제제는 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 치료용 제제의 투여량은 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 바람직하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

<185> 상기 osmundacetone은 고비과(Osmundaceae) 식물에서 분리되는 것을 특징으로 하며, 분리하는 방법은 전술한 바와 같다.

<186>

<187> 또한 본 발명은 Osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 치료 방법을 제공한다.

<188>

<189> 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.

<190>

<191> 또한 본 발명은 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 치료용 제제의 제조에 사용하기 위한 고비(*Osmunda japonica*) 추출물의 용도를 제공한다.

<192>

<193> 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.

<194>

<195> 상기 추출 용매로는 물, 에탄올, 주정, 메탄올, 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol), 아세톤, 에테르, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산, 시클로헥산, 석유에테르(petroleum ether), 디에틸 에테르, 벤젠으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 용매를 사용할 수 있다.

<196>

<197> 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 제거하고 고형화하여 분말 형태로 제조할 수 있다.

<198>

<199> 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.

<200>

<201> 또한 고비(*Osmunda japonica*) 추출물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 치료 방법을 제공한다.

<202>

<203> 상기 고비 추출물의 유효량, 투여 경로와 투여량 등의 투여 방법 등에 대하여서는 전술한 바와 같다.

【발명의 효과】

<204> 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 세포독성이 매우 낮으면서도, 뼈 손실을 야기하는 파골세포에 대하여 강력한 증식 및 분화를 억제하는 효과를 보였으며, 동시에 조골세포 분화를 활성화하는 효과를 보였다.

<205>

【도면의 간단한 설명】

<206> 도 1은 고비에 포함된 파골세포 분화억제 활성 물질을 분리 동정하기 위한 고비의 물(열수) 또는 에틸 아세테이트(EA) 추출물의 HPLC 결과를 나타낸다(검출파장 280nm). EA-2는 7개 분획으로 분리된 EA 추출물 중 2번째 분획이다. Osmundacetone의 peak은 검정색 화살표로 표시하였다. 적색 타원형으로 표시한 peak들은 정제 과정에서 관찰되는 동일한 peak의 위치를 나타낸다.

<207> 도 2는 고비 추출물과 분획물, osmundacetone의 파골세포의 증식 및 분화억제 활성을 확인하기 위해 마우스 골수세포를 이용한 TRAP assay 결과를 나타낸다.

<208> 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.

<209> 도 4A는 osmundacetone과 공지된 약물인 Fosamax의 파골세포 분화 억제효과를 비교하기 위하여, 골수세포에 다양한 농도의 osmundacetone과 Fosamax를 처리하여 분화를 유도한 후, 이의 IC₅₀을 확인한 결과를 나타낸다. 도 4B는 파골세포와 조골세포 전구세포들을 공동배양하며 osmundacetone이 동시에 파골세포 분화는 억제하고 조골세포 분화는 활성화하는 능력을 확인한 결과를 나타낸다.

<210> 도 5는 osmundacetone의 조골세포의 OCN 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, osmundacetone을 처리한 후 웨스턴 블롯을 수행하여 OCN의 발현을 확인한 결과를 나타낸다.

<211> 도 6은 osmundacetone이 RUNX2의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, osmundacetone을 처리한 후 웨스턴 블롯을 수행하여 RUNX2의 발현을 확인한 결과를 나타낸다.

<212>

【발명의 실시를 위한 형태】

- <213> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- <214> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- <215>
- <216> <실시예 1> 실험방법
- <217> 1. ~~고비 추출물과 분획물 제조 및 화합물 분리 동정~~
- <218> 고비(*Osmundae Rhizoma* 또는 *Osmunda japonica*)를 열수, 에틸 아세테이트(ethyl acetate)의 순서로 추출한 후, 에틸 아세테이트 추출물(EA 추출물)을 HPLC로 7개의 분획으로 분리하였다.
- <219> 구체적으로, 고비 추출물은 강원도에서 채취한 고비 200~250g을 깨끗이 씻어 증숙용기(OSK-2002, 홍삼박사, Well sosana™, 대웅제약)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 분화억제 활성을 갖는 것으로 관찰되었다(도 1, <실시예 2> 참고).
- <220>
- <221> 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 화합물을 분리하기 위한 HPLC의 조건은 표 1에 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:
- <222> $^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, methanol- d_4) 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); $^{13}\text{C-NMR}$ (175 MHz, methanol- d_4)

8 201.7(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]⁺.

<223> 【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 μ l

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

<224>

<225>

<226> 2. 세포 배양

<227> MC3T3-E1 서브클론 4 뮤린 조골세포(Subclone 4 murine osteoblastic cells, #CRL-2593TM, ATCC)는 37°C, 5% CO₂ 조건으로 α -MEM(Minimum Essential Medium Eagle-Alpha Modification, #LM00853, WELGENE, Seoul, Korea) 배지를 이용하여 배양하였다.

<228> HaCaT 인간 상피 각질형성세포(human epidermal keratinocyte, #ATCC PCS-200-011)는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, #DMEM-HPA, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. NIH3T3 마우스 배아 섬유아세포(embryo fibroblast, #KCLB 21658), RAW264.7 murine macrophage(preosteoclast cell line, #KCLB 40071), HCT116 인간 결장암(#KCLB 10247), PC3 인간 전립선 샘암종 세포(prostate adenocarcinoma cell, #KCLB 21435), HT1080 인간 섬유육종세포(fibrosarcoma cell, #KCLB 1121) 및 B16F10 마우스 악성 흑색종세포(melanoma cell, #KCLB 80008)는 한국세포주은행

에서 구매하였고, DMEM 배지를 이용하여 37℃, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

<229> AGS 인간 위선암세포(stomach adenocarcinoma, #KCLB 21739), A549 인간 폐암종세포(lung carcinoma cell, #KCLB 10185), Caki-1 인간 신장암세포(kidney carcinoma cell, #KCLB 30046), T24 인간 방광암종세포(bladder carcinoma cell, #KCLB 30004), TC-1 P3 HPV-16E7-발현 마우스 폐상피세포, MHC class I(고려대학교 김태우 교수 제공)는 RPMI(Rosewell Park Memorial Institute) 1640(#RPMI-A, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany) 배지를 이용하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

<230> 인간 지방세포-유래 중간엽줄기세포(adipose-derived mesenchymal stem cells)인 ADMSCs(CEFO Bio, Seoul, Korea)는 CB-ADMSC-GM(CEFO Bio, Seoul, Korea) 배지를 이용하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

<231>

<232> 3. ~~과골세포의 일차배양(primary culture)~~

<233> 골수세포를 5-8 주령의 수컷 C57BL/6 마우스의 대퇴골 및 정강이뼈로부터 수집하였다. 뼈에서 근육을 제거한 후 차가운 인산완충식염수(PBS; # CAP08-050, GenDEPOT, Katy, TX, USA)에 보관하였다.

<234> 각 뼈의 양쪽 끝을 절단하고, 골수를 25G 바늘을 사용하여 차갑게 유지한 플러싱 배지(serum-free α -MEM, 2 mM 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid))로 플러시하였다(flushed).

<235> Labogene 1248R (Labogene, Lynge, Denmark)를 이용하여 3,000 rpm의 속도로 3 분간 원심분리하여 골수세포를 수집한 다음 세척용 배지에 재현탁하였다. 그런 후, 수집한 8 mL의 골수세포를 6 mL의 림프구 분리 배지(LSM; # 50494, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) 위에 겹쳐 놓았고 1,600 rpm의 속도로 20 분간 원심분리하여 단핵세포를 분리하였다.

<236> 단핵세포의 밴드는 미디어 인터페이스(media interface)에서 수집되었고, 완전한 α -MEM 배지(10% 소태아혈청(FBS; Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany) 및 1%(v/v)의 항생제(100 U/mL 페니실린 G(penicillin G) 및 100 mg/mL 스트렙토마이신(streptomycin) 포함)로 37℃, 5% CO₂의 조건에서 3일마다 배지를 갈아주며 배양하였다.

<237> 과골세포의 분화를 촉진하기 위해, 48-웰 플레이트에서 well 당 0.5 mL의 배지에서 1×10^5 세포를 과골세포 분화인자인 PeproTec(Seoul, Korea)에서 구매한

M-CSF(60 ng/mL)와 RANKL(150 ng/mL)의 존재 하에 배양하였다. 하나의 골수에서 유래한 대식세포/단핵세포는 공지된 바와 같이, 6일 후에 성숙 다핵 파골세포로 완전히 분화되었다(Gurt *et al.*, 2015).

<238>

<239> ~~4. 파골세포(osteoclast) 및 조골세포(osteoblast)의 공동배양~~

<240> 48 웰(well) 플레이트 웰 당 1×10^5 의 C57BL/6 쥐 골수 단핵세포(bone marrow mononuclear cell)를 상기와 같은 방법으로 준비하였고, 1.5×10^4 의 MC3T3-E1 무린 조골세포와 10% FBS 및 1% 항생제(100 U/mL 페니실린 G 및 100 mg/mL 스트렙토마이신)를 포함한 500 μ L α -MEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂의 조건으로, 3일 간격으로 배지를 교체하며 공동배양하였다.

<241> 양성 대조군 세포는 파골세포 분화인자(osteoclast differentiation factors)인 M-CSF(60ng/mL) 및 RANKL(150ng/mL)과 조골세포 분화인자인 아스코르브산(ascorbic acid, 50 μ g/mL) 및 10mM β 글리세로포스페이트(β glycerophosphate)와 함께 배양하였다.

<242> 음성 대조군 세포는 분화인자로 M-CSF만 첨가하여 배양하였다. Osmundacetone이 파골세포와 조골세포의 분화에 미치는 영향을 시험하기 위해, 세포를 플레이트에 분주한 후 1일째 osmundacetone을 10 μ M의 최종 농도로 양성대조군 세포에 투여하였다.

<243> Osmundacetone을 처리한 양성대조군은 분주 후 6-7일이 지나면 파골세포가 완전히 사라졌기 때문에 분주 8일 후부터 조골세포 분화인자만 투여한 상태에서 21일 까지 배양하였다.

<244>

<245> ~~5. 골 흡수 분석~~

<246> 인간 골 콜라겐의 *in vitro* 파골세포 매개 분해(osteoclast-mediated degradation)의 정량적 측정은 Osteolyse TM Assay Kit((Lonza Walkersville, Inc. Walkersville, MD, USA)를 사용하여 제조자의 지시에 따라 수행하였다

<247> 이 분석법은 파골세포의 흡수 열공(lacuna) 내로의 금속단백분해효소(matrix metalloproteinase) 방출을 직접적으로 측정할 수 있다(Delaisse *et al.*, 2003).

<248> 간략하게, 상기와 같이 준비한 2×10^4 마우스 골수세포를 형광물질-결합 인간 골 콜라겐(europium-conjugated collagen)이 코팅된 96-웰 Osteolyse TM 세포 배양 플레이트에 분주하였다.

- <249> M-CSF(60 ng/ mL)와 RANKL (150 ng /mL)의 존재 하에 각 well 당 0.1 mL의 완전한 α -MEM 안에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 6일 동안 배양하였다. 그 후 분주 3 일째에 배지를 교환하였다.
- <250> 성숙한 파골세포 기능에 대한 저해 능력을 측정하기 위해, 6일 째에 배지를 교체하며 osmundacetone을 TRAP 분석으로부터 얻은 IC₅₀ 농도로 첨가하였다.
- <251> 성숙한 파골세포에 osmundacetone을 3일간 처리한 후, 세포 배양액의 상등액 10 μ L를 취하여 Fluorophore-Releasing 시약이 담긴 두 번째 96-웰 분석 플레이트에 넣고, 분해된 콜라겐은 시간 결정 형광물질 형광 측정기(time-resolved fluorescence fluorimeter)인 Wallac Victor (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 이때, 400 μ 초의 초기 지연 후에 400 μ 초의 시간 간격 동안 340nm에서 여기(excitation) 및 615nm에서 방출(emission)을 이용하여 측정하였다.
- <252> 골 재흡수율(%)은 처리하지 않은 대조군 대비 osmundacetone의 존재에 따른 골 재흡수 양의 비율을 계산함으로써 얻었고, 세포 DNA에 의해 정상화하였다.
- <253>
- <254> **6. 웨스턴 블랏**
- <255> 분화과정에서 조골세포 분화 마커의 발현을 분석하기 위해, 3×10^5 MC3T3-E1 세포를 각 well당 아스코르브산(50 μ g/mL)과 10 mM β -글리세로포스페이트가 함유된 완전한 α -MEM 10 mL과 함께 100mm 배양 플레이트에 분주하였다. 이에 50 μ M의 Osmundacetone을 첨가 또는 미첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 21일 동안 배양하며 매 3-4 일마다 배지를 교환하였다.
- <256> 음성 대조군 세포는 분화인자 없이 배양하였고, 조골세포와 이의 배양액은 분주한 후, 7일, 14일 또는 21일에 수집하였다.
- <257> 상기 세포를 RIPA 버퍼를 이용하여 용해한 후, RUNX2(Runt-related transcription factor 2) 발현을 분석하였다. 더불어 OCN 분비를 분석하기 위해 배양액을 채취하고 세포 DNA로 정상화시켰다.
- <258> 단백질을 12.5 % 폴리비닐리덴트리스 젤(polyvinylidene-Tris gels)에서 SDS-PAGE로 분석하였고, PVDF(polyvinylidene difluoride) 막에 전기영동을 통해 이동시켰다.
- <259> 상기 막은 탈지유를 이용하여 블록하였고, anti-RUNX2(D1H7) 토끼 단클론항체(#8486, Cell Signaling Technology, MA, USA) 또는 anti-OCN(FL-95) 항체(#sc-30045, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA)를 이용하여 조사하였다. Anti-액틴 항

체(#M177-3, MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD., Nagoya, Aichi, Japan)는 내부 기준으로써 이용하였다.

<260> 블랏 상의 단백질 밴드는 강화된 화학발광 검출 키트(enhanced chemiluminescent detection kit) (#EBP-1073, PicoEPD Western Reagent, ELPIS-BIOTECH, Daejeon, Korea)를 이용하여 가시화하였다.

<261>

<262> 7. ALP 활성 측정

<263> ALP 활성은 Quantichrom ALP Assay Kit (Bioassay Systems, Hayward, CA, USA)을 이용하여, 제조사의 지침에 따라 조사하였다.

<264> 간략하게, 3×10^3 MC3T3-E1 세포를 각 well당 아스코르브산(50 μ g/mL) 및 10 mM β -글리세로포스페이트를 포함하는 100 μ L의 완전한 α -MEM과 함께 96웰 플레이트에서 배양하였다. 이때, osmundacetone(10 μ M 및 50 μ M)을 첨가 또는 미첨가하였고, 배지는 3~4일 간격으로 교체하였다.

<265> 배양 14일째, 세포 분획에서 ALP 활성으로 인한 비색 변화를 분광 광도계 플레이트 판독기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 405nm에서 측정하였다(Kim *et al.*, 2016). ALP 활성의 % 활성화는 실험 화합물을 처리한 세포의 ALP 활성과 처리하지 않은 대조군 세포의 ALP 활성을 비교하여 나타내었다.

<266>

<267> 8. TRAP assay 분석(과골세포의 증식 및 분화억제 활성 측정)

<268> 1) 골수세포 배양

<269> 6~8주령 수컷 C57BL/6 마우스의 정강이뼈(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 μ L에 부유하여 48well plate에 분주하고, triplicate으로 assay를 진행하였다. 과골세포의 전구세포인 단핵구세포를 분화촉진인자인 RANKL과 M-CSF로 처리하면 5~7일 내에 과골세포로 분화되었다.

<270> 2) 과골세포 분화 억제 측정

<271> 2-1) 시료 준비: 고비의 열수 추출물, EA 추출물 또는 분획물은 <실시예 1>의 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 70%까지 물로 희석하였다.

<272> 2-2) 시료 투여: 시료는 골수세포 배양 첫날부터 1:20(v/v; 배지 500 μ L당 시료 25 μ L)로 지속적으로 배지에 투여하고, 배지는 2~3일 간격으로 교체하였다.

<273> 2-3) 파골세포 분화 측정: 파골세포는 TRAP으로 염색된 TRAP-양성 다핵세포로 정의하였다. TRAP 염색 용액은 기질인 naphthol AS-MS phosphate(Sigma N-4875) 5mg과 발색시약인 Fast Red Violet LB salt 25mg을 약 0.5mL의 N,N-dimethylformamide에 녹인 후, 50mM tartaric acid를 포함하는 0.1N NaHCO₃ buffer solution(50mL)과 혼합하였다. 반응시약은 사용 전까지 냉장고에 보관하였다.

<274> 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.

<275> 현미경 시야에서 TRAP-양성세포 중, 2개 이상의 핵을 갖는 세포를 파골세포로 판정하고 세포의 수를 측정하였다. 고비 추출물의 파골세포 분화억제 효과는 대조군 대비 50% 억제 농도를 IC₅₀로 계산하였다.

<276>

<277> 9. TRAP assay 분석(파골세포의 증식 및 분화 억제 활성 IC₅₀ 도출)

<278> 1) 파골세포 분화 측정

<279> 1-1) 시료 준비: Osmundacetone을 Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific에서 구입하여 최소량의 DMSO(dimethylsulfoxide)에 용해하였다. Fosamax는 Cayman(Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하여 최소량의 무균 증류수에 용해하였다.

<280> 1-2) 시료 투여: Osmundacetone과 Fosamax는 골수세포 배양 첫날부터 1:20(v/v; 배지 500 μ L당 시료 25 μ L)으로 최종농도 각각 1, 4, 7, 10 μ M이 되도록 지속적으로 배지에 투여하고, 배지는 2~3일 간격으로 교체하였다.

<281> 1-3) 파골세포 분화 측정: <실시예 1>의 8.의 방법으로 수행하였다.

<282> 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.

<283>

<284> 10. 세포독성 확인

<285> <실시예 1>의 1.에서 제조한 고비에서 분리된 화합물은 MTT assay를 이용하

여 세포독성을 확인하였다.

<286> MTT assay 방법은 다음과 같다.

<287> 세포들을 1×10^3 cells/well의 농도로 10% FBS(fetal bovine serum)가 첨가된 DMEM를 포함하는 96 well plate에서 5% CO₂, 37℃에서 배양한 후, osmundacetone을 세포배지에 첨가하고 24시간 배양하였다. 그 후 MTT(0.5mg/ml PBS) 100 μ L를 투여한 후, 2시간 배양하였다. 그 후 각 well에서 배지를 제거하고 100 μ L의 DMSO를 가하였다. 10분간 배양 후 마이크로플레이트 리더(microplate reader; SPCTRA MAX 340PC, Molecular Devices, USA)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 생존한 세포의 수를 나타내는 지표로서 하단의 식으로 계산되며, 3회의 실험으로 재현성을 확인하였다.

<288> 세포 증식율(%)=OD550(sample)/OD550(control)

<289>

<290> <실시예 2> 실험결과

<291> 1. 파골세포의 증식 및 분화억제 활성 확인

<292> 상기 <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.

<293>

<294> 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 μ M)으로 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 μ M농도에서 골수의 단핵구 세포가 증식하고 융합하여 다핵 세포인 파골세포로 분화하는 과정이 95% 이상 거의 완전히 억제된 것으로 나타났다. Osmundacetone 1 μ M을 처리한 군에서는 거대한 파골세포가 형성되었으나 양성대조군에 비하여 그 수가 적었다. Fosamax 1 μ M을 처리한 군 역시 거대한 파골세포가 형성되었으나 양성대조군에 비하여 수가 적었으며 osmundacetone 1 μ M 처리군과 파골세포 밀도가 유사하였다.

<295> 더불어 파골세포의 증식 및 분화 억제 활성 IC_{50} 를 도출하였다. 그 결과 도 3에서 확인할 수 있듯이, osmundacetone(Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific)을 $10 \mu M$ 농도로 처리한 경우에는 골수의 단핵구 세포가 증식하고 융합하여 다핵 세포인 파골세포로 분화하는 과정이 거의 완전히 억제되었으며 $7 \mu M$ 농도로 처리한 경우에는 약 3-40% 억제된 것으로 나타났다($IC_{50} \sim 8 \mu M$). 공지된 골다공증 치료제로서 positive control로 사용된 Fosamax(alendronate)의 IC_{50} 는 $\sim 4 \mu M$ 이었다(도 4A).

<296> Osmundacetone이 완전히 분화된 성숙한 파골세포의 골 흡수 기능을 억제하는 지 확인하기 위해, 상기 IC_{50} 농도인 $8 \mu M$ 의 osmundacetone 존재 하에서 성숙한 파골세포를 이용한 골 흡수 분석을 수행하였다.

<297> Osmundacetone은 <실시예 1> 5. 방법에 근거하여 IC_{50} 농도에서 성숙한 파골세포의 골 흡수 기능을 처리되지 않은 파골세포의 58.7 ± 13 %까지 억제하였다.

<298>

<299> 2. Osmundacetone의 조골세포의 활성화 및 파골세포 분화 억제효과 확인

<300> Osmundacetone이 파골세포의 분화를 억제함과 동시에 조골세포 분화를 활성화하는 능력을 가지고 있는지 조사하기 위해, C57BL/6 마우스로부터 수집한 단핵세포(bone marrow mononuclear cell)와 조골세포 전구세포인 MC3T3-E1을 48웰(well) 플레이트 웰 당 1×10^5 의 골수세포와 3×10^3 MC3T3-E1 세포 농도로 공동배양하였다. 공동배양한 골수세포와 조골세포 전구세포 중 골수세포의 단핵세포/대식세포 계통 세포는 M-CSF와 RANKL 존재 하에 6-7 일 이내에 성숙한 다핵 파골세포로 분화되었다.

<301> Osmundacetone $10 \mu M$ 을 투여한 경우에는 파골세포의 증식 및 분화를 완전히 억제하였다(도 4B, Os). 반면 조골세포는 증식과 분화를 지속하였다. Osmundacetone $10 \mu M$ 을 투여한 경우 공동배양 7, 14, 21일째 ALP 활성의 %활성화는 투여 안 한 경우와 비교하여 각각 104%, 111%, 95%로서 osmundacetone $10 \mu M$ 투여 후 단독배양한 조골세포의 ALP 활성화와 비교하여 큰 차이가 없었다.

<302> Osmundacetone은 조골세포의 존재 및 부재 하에 파골세포의 분화에 대해 유사한 저해 활성을 나타내었다. Osmundacetone $10 \mu M$ 을 투여한 후 6일째에 성숙한 파골세포는 완전히 사라진 반면, 조골세포는 지속적으로 증식하는 것으로 나타났다. 따라서 전파골세포(preosteoclasts)와 전조골세포(preosteoblast)의 공동배양에서 나타난 바와 같이, osmundacetone은 공존하는 조골세포의 활성 및 증식에는 억제활성을 보이지 않았다.

<303> 이러한 결과를 바탕으로, osmundacetone은 동시에 파골세포 분화는 억제하고 조골세포 분화는 활성화하는 능력을 가진 것을 확인했다.

<304> 대조적으로, Osmundacetone이 존재하지 않는 경우, 전파골세포 및 전조골세포 공동배양 7 일 후, 파골세포 및 조골세포 분화인자의 존재 하에서 파골세포와 조골세포가 모두 증식 및 분화를 계속하였다.(도 4B, 양성대조군).

<305> 그러나 분화된 파골세포의 크기는 조골세포 부재 하에 성장한 것들과 비교하여 다소 작았는데, 이는 파골세포와 조골세포의 공존 때문에 증가된 세포 밀도에 기인한 것일 수 있다.

<306> 음성 대조군 배양에서 증식한 세포는 M-CSF만을 분화인자로 이용하였기 때문에 대식세포/단핵세포 계통 세포로 구성될 가능성이 가장 높았다(도 4B, 음성대조군).

<307> 종합적으로, 이를 통해 osmundacetone은 독립적으로 동시에 파골세포 분화는 억제하고 조골세포 분화는 활성화하는 능력이 있음을 보여 주었다.

<308>

<309> 3. Osmundacetone의 조골세포에 의한 ALP와 OCN 생성 증가 효과 확인

<310> Osmundacetone의 골 생성 유도 능력을 평가하기 위해, 조골세포 분화의 초기/중간 단계 마커인 ALP(alkaline phosphatase)의 활성을 증가시키는지 여부를 확인했다.

<311> 【표 2】

<312> MC3T3-E1에서 osmundacetone의 ALP 활성화의 활성%

Compounds	% Activation of ALP activity	
	10 μ M	50 μ M
Osmundacetone	115 $\pm$ 9.4	279 $\pm$ 61*
Parathyroid hormone-related peptide (1 μ M)	138 $\pm$ 19	

<313>

<314> 상기 값은 3번의 독립적인 실험의 mean $\pm$ s.d.이다. 상기 *는 P<0.05를 나타낸다. 부갑상선 호르몬 관련 펩타이드(Parathyroid hormone-related peptide)를 양성대조군으로 사용하였다.

<315>

<316> 상기 표 1에 나타난 바와 같이, osmundacetone을 처리한 조골세포 유사 MC3T3-E1 세포에서의 ALP 생산은 미처리된 대조군 세포의 ALP 생산에 비해 유의하게 증가되었다.

<317> Osmundacetone은 기존 공지된 문헌(Lyu *et al.*, 2008)의 결과에 기재된 바와 유사하게, 50 μ M의 농도에서 ALP 생산을 279 ± 61 % 자극하였다($P < 0.05$).

<318> 더불어 osmundacetone은 공존하는 파골세포의 분화 억제에 관계없이 MC3T3-E1 세포에 의한 ALP 생성을 증가시키는 경향을 보였다. 조골세포와 파골세포 전구체는 10 μ M osmundacetone 및 파골세포 및 조골세포에 대한 분화인자와 공동 배양하였을 때, 6일째에서 성숙한 파골세포가 완전히 사라지는 결과를 보였다(도 4B, 0s).

<319> 그 후 osmundacetone으로 처리한 세포는 조골세포 분화인자의 존재 하에서 계속 성장하였다.

<320> 조골세포 및 파골세포 전구세포의 공동배양 후 7일, 14일 및 21일째에, osmundacetone이 처리된 세포의 ALP 활성의 % 활성화는 처리되지 않은 대조군 세포에 비해 각각 104 %, 111 % 및 95 %이었고, 이는 공존하는 파골세포가 없을 때 얻은 % 활성화 값과 거의 유사하였다(표 1).

<321> 따라서 osmundacetone은 조골세포 분화를 촉진하고, 이와 동시에 파골세포 분화를 억제하는 능력을 유지한다는 것을 보여 주었다.

<322> 주요 비-콜라겐 매트릭스 단백질(noncollagenous matrix protein)인 OCN은 광물화(mineralization) 시점 또는 그에 근접한 시점에서만, 즉 MC3T3-E1 세포의 분화 유도 후 21일 경에 발현이 가장 증가하는 것으로 보고되었다(Young *et al.*, 1992).

<323> 조골세포에 의한 OCN 생산에 대한 osmundacetone의 효과를 조사하기 위해 MC3T3-E1 세포를 50 μ M osmundacetone 존재 하에 배양하였다.

<324> 웨스턴 분석에 따르면, osmundacetone 투여 후 14일과 21일에 조골세포에 의한 OCN 생성이 처리되지 않은 양성 대조군 세포와 비교하여 각각 2.9와 1.2 배 증가한 것으로 나타났다(도 5A, 0s).

<325> 이를 통해 osmundacetone은 조골세포에 의한 OCN 생산의 현저한 증가를 초기에 유도하는 것을 확인하였다.

<326> 전조골세포와 전파골세포의 공동배양에서도, osmundacetone은 OCN의 생산을 초기에 증가시키면서, 파골세포의 분화를 억제하는 능력은 유지했다(도 5B, 0s).

<327> Osmundacetone을 투여하지 않은 공동배양 환경에서, 조골세포와 파골세포 분화인자의 존재 하에 성장한 양성 대조군 조골세포는, 7일부터 분주한 후 21일까지 osmundacetone이 처리된 공동배양 환경의 조골세포와 유사한 수준까지 OCN 생산을 초기에 유도하여 증가시키는 것을 보여주었다(도 5B, P.C). 이는 파골세포와의 상호작용에 의하여 OCN 생산의 증가가 초기에 유도된 것으로 사료된다.

<328>

<329> 흥미롭게도, 조골세포 분화인자 없이 성장한 음성 대조군 전조골세포는 파골세포 없이 성장한 조골세포의 경우와 비교하여, 14 일과 21일에 파골세포가 존재한 양성 대조군 세포의 수준까지 OCN 생산의 현저한 증가를 보였다.

<330> 이러한 결과는, 조골세포 분화인자가 없는 경우, 골수 단핵세포 또는 성숙한 파골세포와의 상호작용이 조골세포에서의 OCN 생성의 증가에 기여할 가능성을 시사하였다.

<331> 따라서 osmundacetone은 파골세포 분화를 억제하면서 조골세포에서 ALP와 OCN의 발현을 증가시키는 능력을 유지하는 것을 확인하였다.

<332>

<333> 4. Osmundacetone의 RUNX2 발현 증가 효과

<334> 다음으로 osmundacetone이 조골세포의 조기 분화 마커인 RUNX2의 발현을 증가시키는지 확인하였다. 상기 RUNX2는 조골세포에서 ALP와 OCN의 전사를 자극하여 골 형성을 증가시키는 전사인자로 알려져 있다(Phimphlai *et al.*, 2006).

<335> Osmundacetone을 투여한 MC3T3-E1 세포의 RUNX2의 발현은, 처리되지 않은 양성 대조군과 비교하였을 때, 투여 후 7일, 14일 및 21일째에 각각 1.1, 1.1 및 2.1 배 증가하였다(도 6).

<336> Osmundacetone이 처리된 조골세포에서 RUNX2 발현은 분주 후 21 일까지 현저하게 감소하지 않은 반면, 처리되지 않은 조골세포에서 RUNX2 발현은 21일째에 14 일 최대 발현량의 거의 절반으로 감소했다.

<337> 이를 통해, osmundacetone은 조골세포에서 RUNX2 발현 기간을 연장시킬 수 있는 능력을 가지고 있음을 확인하였다.

<338>

<339> 5. Osmundacetone의 암세포-특이적 세포독성

<340> Osmundacetone은 정상세포(non-cancer cells)에 비해 암세포에 대해 높은 선택성 지수값을 갖는 특이적 독성을 보였다.

<341> IC₅₀이 100 μ M 미만인 화합물은 세포 사멸/항 증식 활성 측면에서 활성으로

간주 될 수 있다(Boyd, 2003).

<342> 이에 따라, 하기 표 3을 참고하면, osmundacetone은 정상세포주에 대해 세포 독성을 나타내지 않았다.

값은 3 번의 독립적인 실험에 대한 평균 $\pm$ 표준 편차(average $\pm$ standard deviation)이다. Fosamax는 참고(reference) 화합물로 사용하였다.

<348> 본 실험에 사용한 세포는 하기와 같다.

<349> HaCaT, 인간 표피 각질형성세포(Human epidermal keratinocyte); ADMSC, 인간 지방세포-유래 중간엽 줄기세포(Human Adipose-derived mesenchymal stem cell(CEFO, Korea)); RAW264.7, 마우스 대식세포 세포주(Mouse macrophage cell line (preosteoclast)); NIH3T3, 마우스 배아 섬유아세포(Mouse embryo fibroblast); AGS, 인간 위 선암(Human stomach adenocarcinoma); A549, 인간 폐암(Human lung carcinoma); HepG2, 인간 간 간모세포종(Human liver hepatoblastoma); HCT116, 인간 결장암(Human colon carcinoma); PC3, 인간 전립선 샘암종(Human prostate adenocarcinoma); Caki-1, 인간 신장암종(Human kidney carcinoma); T24, 인간 방광암(Human bladder carcinoma); HT1080, 인간 섬유육종(Human fibrosarcoma); B16F10, 마우스 흑색종(Mouse melanoma); TC-1 P3, HPV-16E7-발현하는 마우스 폐 상피세포(HPV-16 E7-expressing mouse lung epithelial cell(- MHC class I))

<350>

<351> 특히, MTT 분석에 따르면, osmundacetone은 ADMSC 인간 지방세포 유래 중간엽 줄기세포, HaCaT 인간 표피 각질세포 및 NIH3T3 마우스 배아 섬유아세포에 대해 각각 $2,760 \pm 220$, 3510 ± 110 및 $> 5,000 \mu\text{M}$ 의 IC_{50} 값을 갖는 미미한 세포 독성을 나타냈다.

<352> 한편, osmundacetone은 RAW264.7 마우스 대식세포 세포주에 대해 $507 \pm 98 \mu\text{M}$ 의 LD_{50} 으로, 상대적으로 유의한 세포독성을 나타내었다. 따라서 osmundacetone이 고농도에서 일부 암세포의 생존력을 억제할 수 있는 가능성을 제시하였다.

<353> 흥미롭게도 MTT 분석에 따르면 osmundacetone은 AGS 인간 위암(stomach adenocarcinoma), PC3 사람 전립선 선암(prostate adenocarcinoma) 및 B16F10 마우스 흑색종(melanoma)을 포함한 암 세포주에 대해 59.9 ± 6.1 , 65.5 ± 8.7 및 $75.8 \pm 9.2 \mu\text{M}$ 의 낮은 LD_{50} 을 나타내 중등도의 세포독성 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

<354>

<355> 특히, 인간 정상세포주(HaCaT, ADMSC)와 비교하여 인간 암 세포주 (AGS, PC)를 사멸시키는 데 있어서 osmundacetone의 세포 독성의 암 선택도 지수가 45 내지

60으로 매우 높았다.

<356>

<357> 결론적으로 파골세포 분화 억제에 대한 osmundacetone의 IC₅₀는 8 μ M, 조골세포를 280% 활성화시키는 농도는 50 μ M, 및 몇 암세포주에 대한 LD₅₀ 값 50 내지 70 μ M에 비하여, 정상세포주에 대한 LD₅₀는 2,500 내지 5,000 μ M 범위를 나타내므로, 이를 기반으로 osmundacetone을 치료제로 사용하는 경우 큰 안전성을 갖는 것을 확인하였다.

<358>

<359> <적용예 1>

<360> 골다공증

<361> 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).

<362> 따라서, 본 발명의 osmundacetone은 파골세포의 증식 및 분화를 억제하는 효과와 동시에 조골세포를 활성화하는 효과를 나타내기 때문에, 골다공증 예방 또는 치료효과를 나타낼 수 있다.

<363>

<364> <적용예 2>

<365> 류마티스 관절염

<366> 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 면역억제제는 파골세포 분화를 촉진하게 되고, 파골세포에 의한 과도한 골 흡수는 류마티스 관절염을 악화시키게 된다. 결국, 류마티스 관절염 환자에서 파골세포 분화억제는 자가면역기전 자체의 이상을 교정하지는 못 해도 그 결과 유발된 관절염과 통증 등 골격계 증상은 치료할 수 있다.

<367> 따라서, 본 발명의 osmundacetone은 파골세포의 증식 및 분화를 억제하는 효과를 나타내기 때문에, 류마티스 관절염의 예방 또는 치료효과를 나타낼 수 있다.

<368>

<369> <적용예 3>

<370> 파제트 병(Osteitis deformans)

<371> 파제트 병(Osteitis deformans) 역시 파골세포의 비정상적 골 흡수가 유발한다(Singer FR, 2016). 그러면 조골세포의 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 Fosamax는 부작용으로 일부 환자에서 장기 복용이 제한적이다. 통증이 심하면 Acetaminophen(Tylenol)이나 nonsteroidal anti-inflammatory drugs(NSAIDs)를 사용한다.

<372> 따라서, 본 발명의 osmundacetone은 파골세포의 증식 및 분화를 억제하는 효과를 나타내기 때문에, 파제트 병의 예방 또는 치료효과를 나타낼 수 있다.

<373>

<374> <적용예 4>

<375> 골 전이암

<376> 파골세포는 또한 고형암(solid tumor)의 골 전이를 촉진한다. 뼈는 암의 전

이가 가장 호발하는 부위이다. 뼈에 암이 전이되면 극심한 통증과 함께 뼈가 부서져서 완치 가능성이 현저히 낮아진다(Weilbaeher 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 고형암의 전이가 골 전이인데 혈액 줄기세포 증식 장소를 거점으로 혈액 줄기세포를 몰아내고 증식하다가 다시 혈액으로 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 전이 암의 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).

<377> 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 acid를 조골세포를 활성화하는 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.

<378> 따라서, 본 발명의 osmundacetone은 파골세포의 증식 및 분화를 억제하는 효과를 나타내며 동시에 조골세포 활성화 효과가 있기 때문에, 골 전이암의 예방 또

는 치료효과를 나타낼 수 있다.

<379>

<380> [참고문헌]

<381> 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.

<382>

<383> 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.

<384>

<385> Bonewald, L.F. et al., Effects of synthetic peptido-leukotrienes on bone resorption in vitro. *J. Bone Miner. Res.*, 11, 521-529, 1996.

<386>

<387> 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):459-470. PMID: PMC2946627

<388>

<389> 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):1484-1494.

<390>

<391> 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.

<392>

<393> 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.

<394>

<395> 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. PMCID: PMC3771418

<396>

<397> Ford-Hutchinson, A.W., et al., Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. Nature (London), 286, 264-265, 1980.

<398>

<399> Kim JH and Kim N. Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. Chonnam Med J 2016; 52:12-17.

<400>

<401> 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.

<402>

<403> 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.

<404>

<405> 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.

<406>

<407> 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.

<408>

<409> 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

<410>

<411> 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.

<412>

<413> Lum L, Wong BR, Josien R, Becherer JD, Erdjument-Bromage H, SchloJ, et al. Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-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.

<414>

<415> 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 $\alpha 4\beta 1$ -positive osteoclast progenitors. *Cancer Cell*. 2011 Dec 13;20(6):701714. PMID: PMC3241854

<416>

<417> 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.

<418>

<419> 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.

<420>

<421> 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

<422>

<423> 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.

<424>

<425> 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.

<426>

<427> Pitcher LA, van Oers NS. T-cell receptor signal transmission: who gives an ITAM- *Trends Immunol* 2003;24:554-60.

<428>

<429> 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.

<430>

<431> 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):1727-1736. PMID: 15637291

<432>

<433> Sherr CJ. Colony-stimulating factor-1 receptor. *Blood* 1990;75: 1-12.

<434>

<435> 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):1298-1312. PMCID: PMC3069764.

<436>

<437> 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;1035:207-215. PMID: 23959994.

<438>

<439> 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.

<440>

<441> Smith MR, Saad F, Coleman R, Shore N, Fizazi K, Tombal B, Miller K, Sieber P, Karsh L, Damia R, 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. PMID: PMC3671878

<442>

<443> 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.

<444>

<445> 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.

<446>

<447> Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. Nat Rev Immunol 2007;7:292-304

<448>

<449> 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.

<450>

Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. Nat Rev Genet 2003;4:638-49.

<451>

<452> Walsh MC, Choi Y. Biology of the TRANCE axis. Cytokine Growth Factor Rev 2003;14:251-63.

<453>

<454> Weilbaecher KN, Guise TA, McCauley LK. Cancer to bone: a fatal attraction. Nat Rev Cancer. 2011 Jun;11(6):411-425. PMID: 21593787

<455>

<456> 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.

<457>

<458> Wong BR, Besser D, Kim N, Arron JR, Vologodskaia 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.

<459>

<460> Wong BR, Josien R, Lee SY, Vologodskaia 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.

<461>

<462> 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.

<463>

【산업상 이용가능성】

<464> 본 발명에 따른 조성물은 뼈 손실을 야기하는 파골세포에 대하여 강력한 증식 및 분화 억제 활성을 나타내고 동시에 조골세포를 활성화하기 때문에, 안전하고 효과적인 골다공증 치료제 또는 개선용 식품을 개발하는데 유용하게 이용될 수 있다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

- <1> Osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골 절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

<2>

【청구항 2】

- <3> 제1항에 있어서, 상기 osmudacetone은 고비과(Osmundaceae) 식물에서 분리되는 것을 특징으로 하는 조성물.

<4>

【청구항 3】

- <5> 제2항에 있어서, 상기 고비과 식물은 고비(*Osmunda japonica*)인 것을 특징으로 하는 조성물.

<6>

【청구항 4】

- <7> Osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골 절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 개선용 식품 조성물.

<8>

【청구항 5】

- <9> 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.

<10>

【청구항 6】

- <11> 제5항에 있어서, 상기 추출물은 물, 에탄올, 주정, 메탄올, 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol), 아세톤, 에테르, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산, 시클로헥산, 석유 에테르(petroleum ether), 디에틸에테르, 벤젠으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출된 것을 특징으로 하는 조성물.

<12>

【청구항 7】

- <13> 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.

<14>

【청구항 8】

<15> 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 치료용 제제의 제조에 사용되는 osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도.

<16>

【청구항 9】

<17> 제8항에 있어서, 상기 osmundacetone은 고비과(Osmundaceae) 식물에서 분리되는 것을 특징으로 하는 염의 용도.

<18>

【청구항 10】

<19> Osmundacetone 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 치료 방법.

<20>

【청구항 11】

<21> 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 예방 또는 치료용 제제의 제조에 사용하기 위한 고비(*Osmunda japonica*) 추출물의 용도.

<22>

【청구항 12】

<23> 제11항에 있어서, 상기 추출물은 물, 에탄올, 주정, 메탄올, 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol), 아세톤, 에테르, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산, 시클로헥산, 석유에테르(petroleum ether), 디에틸에테르, 벤젠으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출된 것을 특징으로 하는 용도.

<24>

【청구항 13】

<25> 고비(*Osmunda japonica*) 추출물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 골다공증, 류마티스 관절염, 관절통, 파제트 병, 골 전이암 및 골절로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 골 질환 치료 방법.

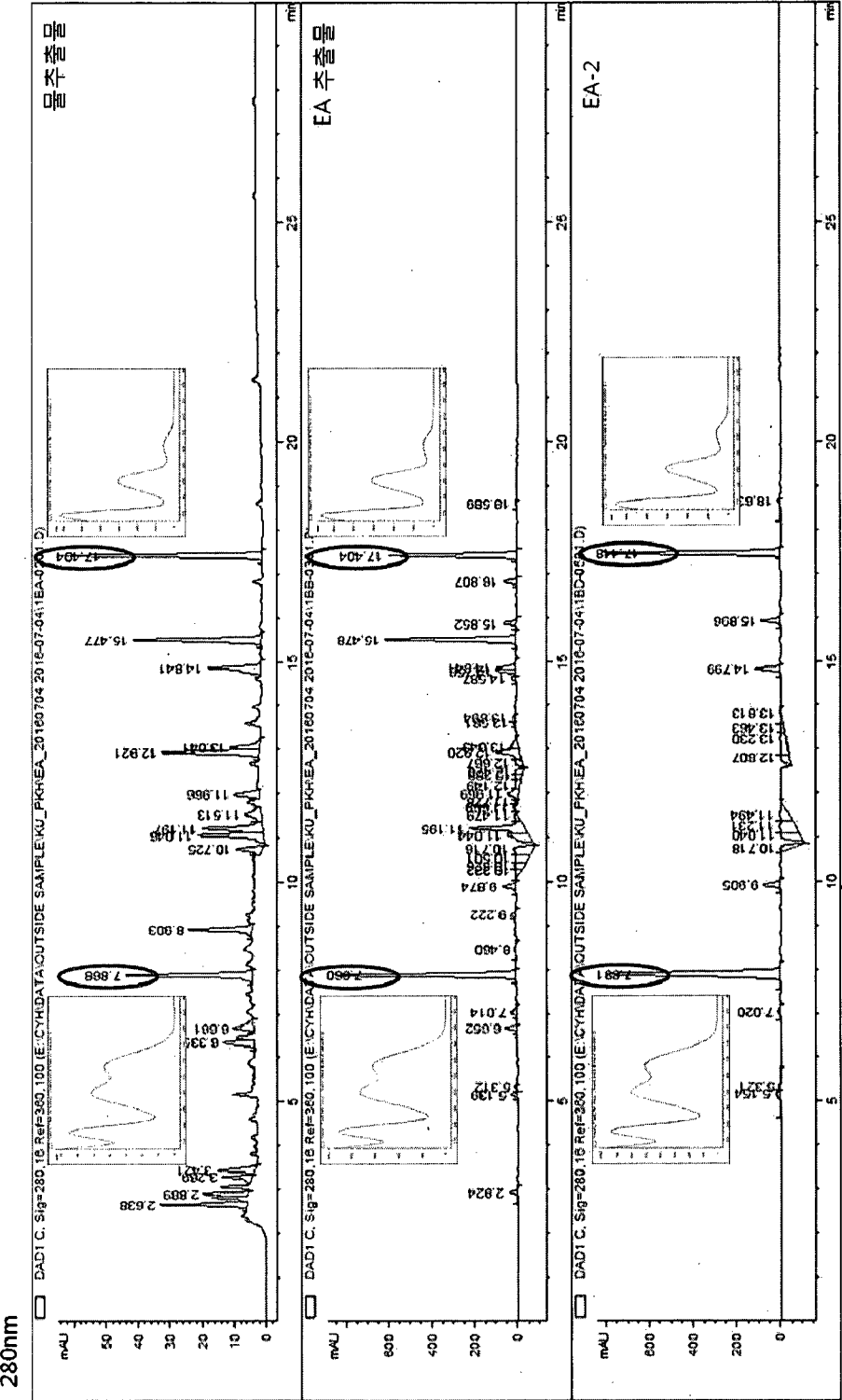
<26>

【청구항 14】

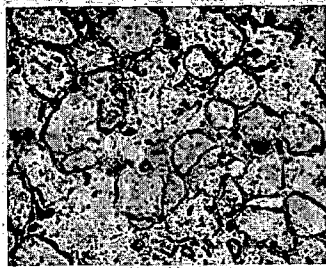
<27> 제13항에 있어서, 상기 추출물은 물, 에탄올, 주정, 메탄올, 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol), 아세톤, 에테르, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산, 시클로헥산, 석유에테르(petroleum ether), 디에틸에테르, 벤젠으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출된 것을 특징으로 하는 치료 방법.

【도면】

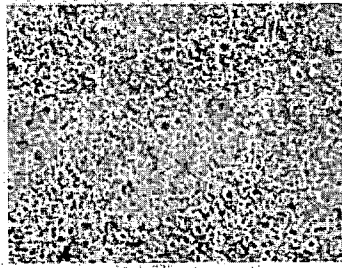
【도 1】



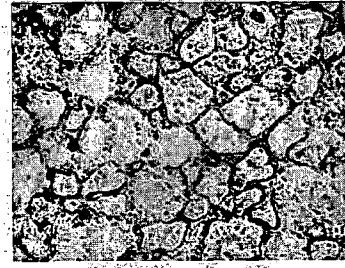
【도 2】



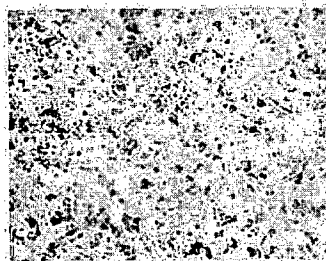
양성대조군



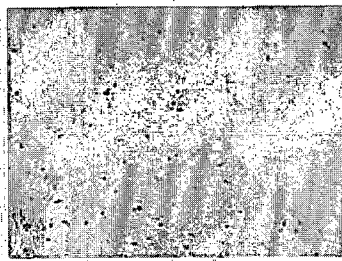
음성대조군



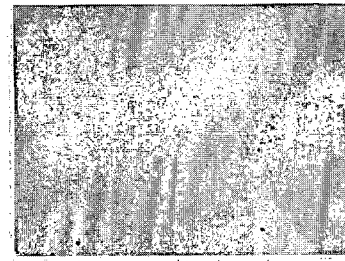
DMSO 대조군



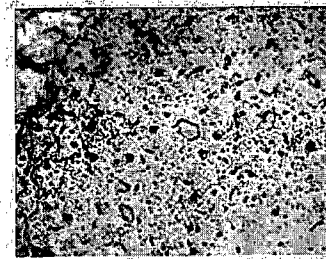
물 추출물 25µl



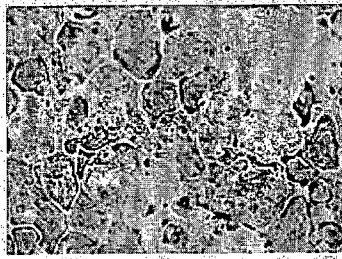
EA 추출물 25µl



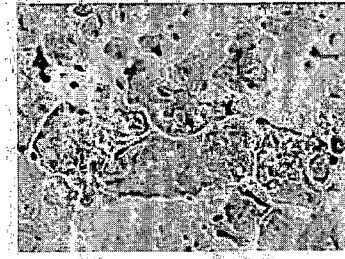
EA-2 분획물 25µl



Osmundacetone 10µM

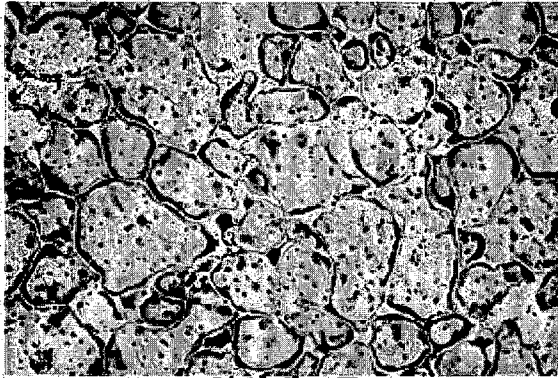


Osmundacetone 1µM

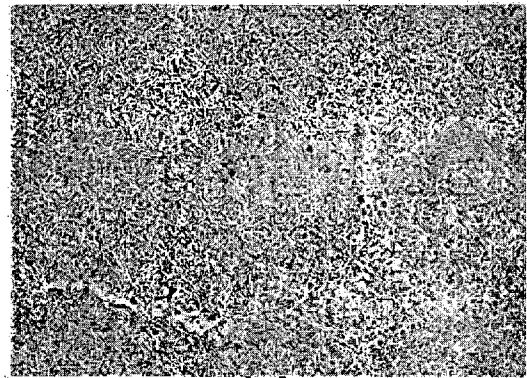


Foxamax 1µM

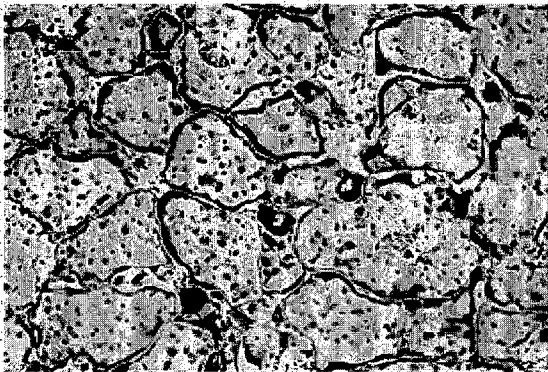
【도 3】



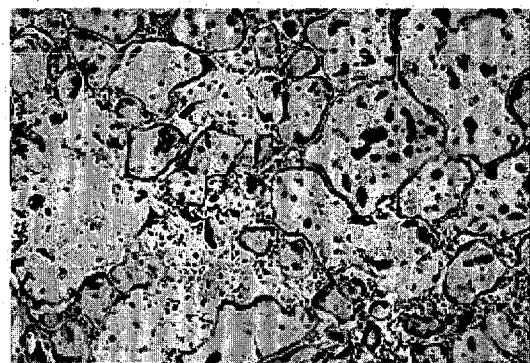
양성대조군



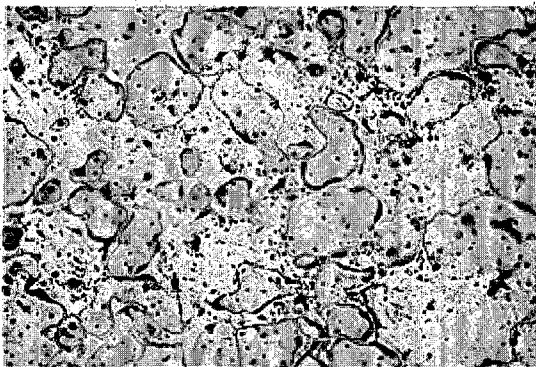
음성대조군



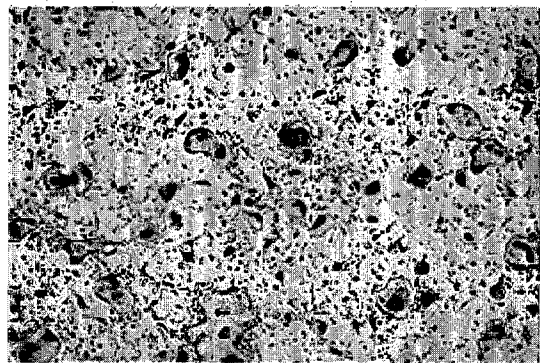
Osmundacetone 1 μ M



Osmundacetone 4 μ M

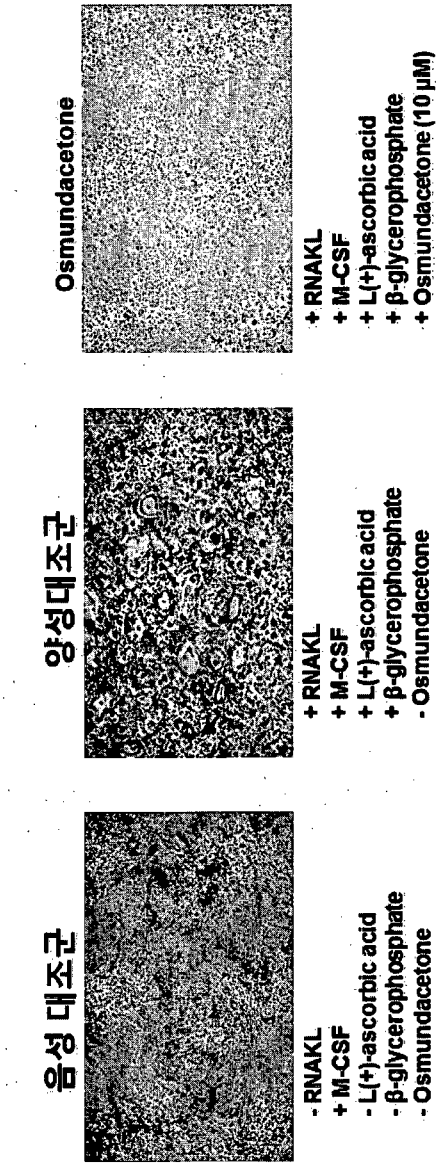
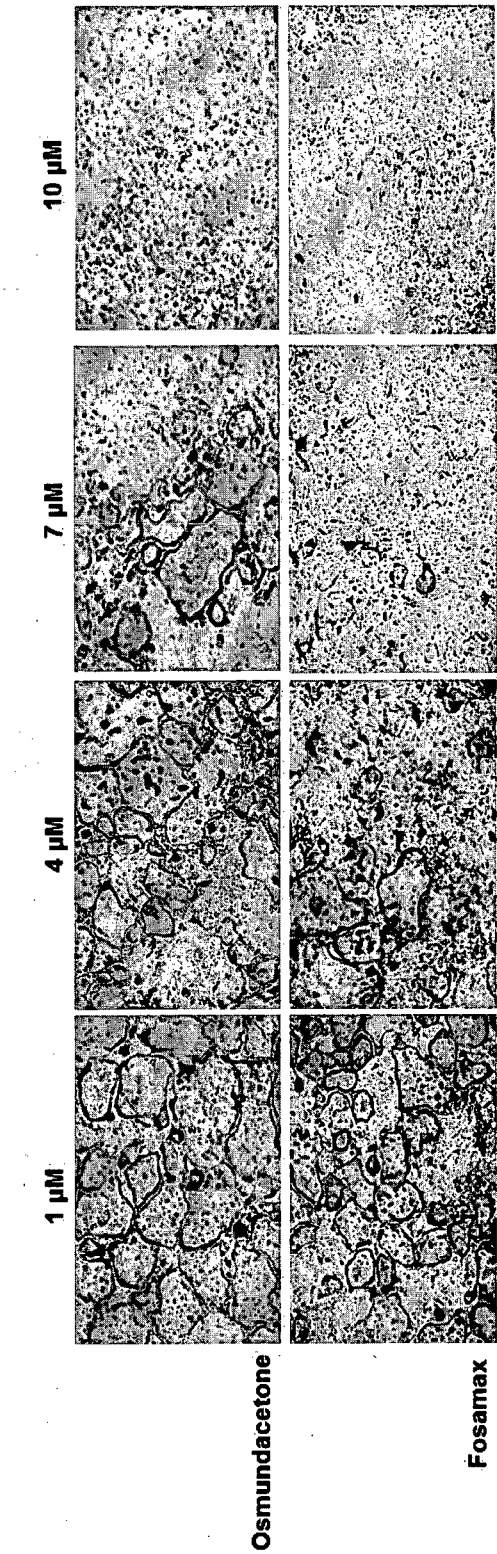


Osmundacetone 7 μ M



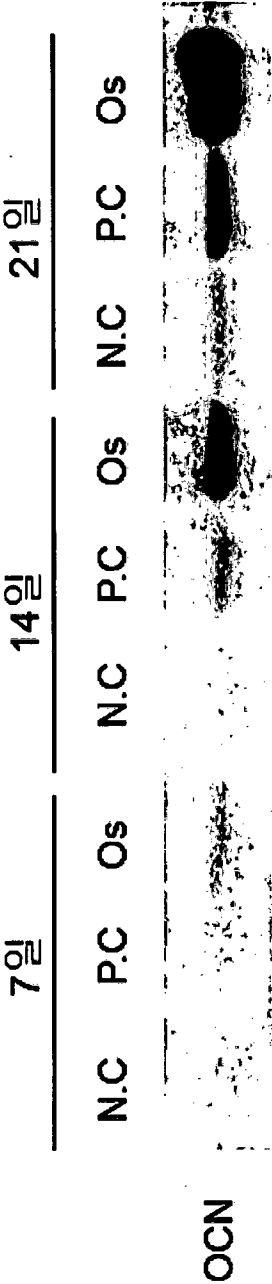
Osmundacetone 10 μ M

【도 4】

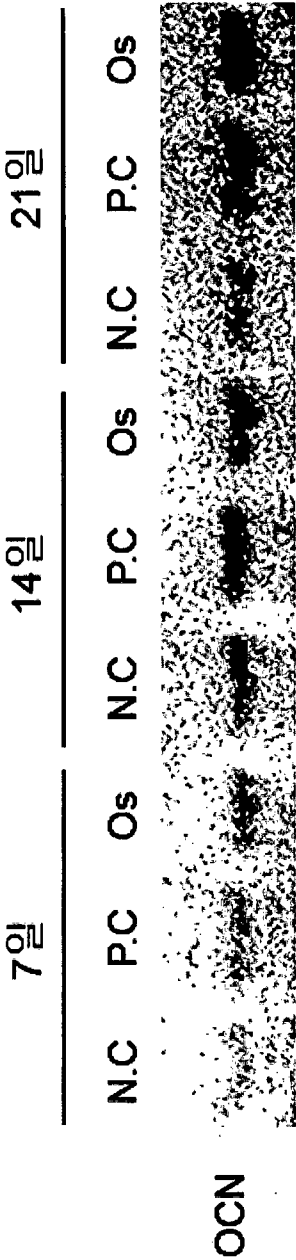


【도 5】

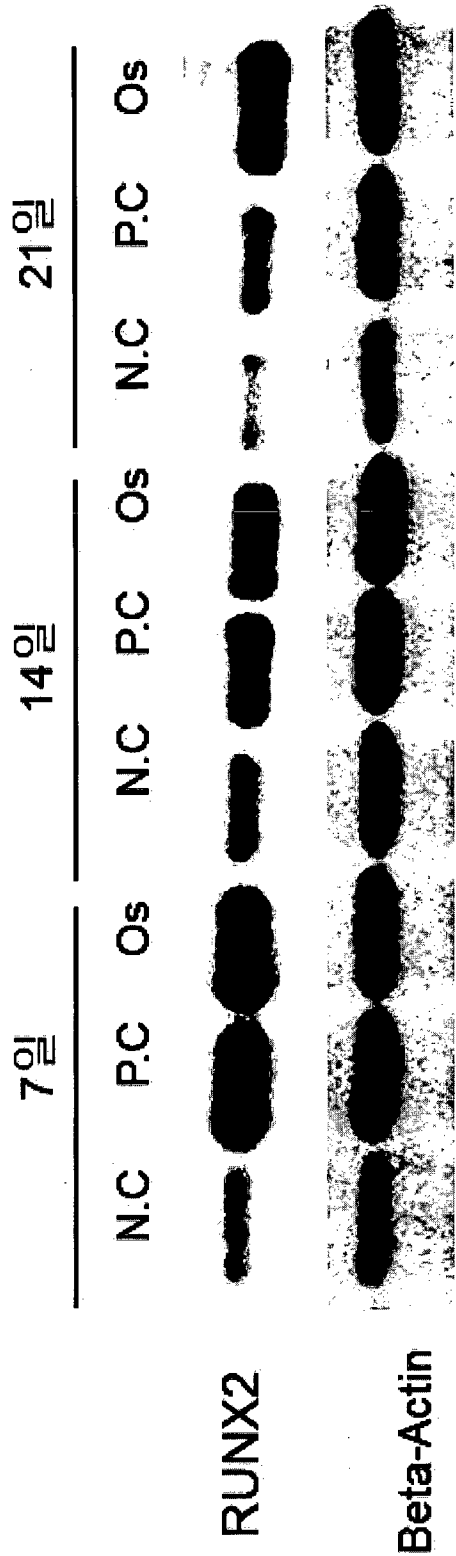
A



B



【표 6】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/010822

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/12(2006.01)i, A61K 36/11(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A23L 33/105(2016.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/12; A61K 36/9068; A61P 29/00; A61P 19/02; A61K 36/37; A61K 36/8945; A61K 36/11; A23L 33/10; A23L 33/105

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: osmundacetone, Osmunda japonica, extract, bone disease

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LYU, H.-N. et al., "Phenolic Compounds from the Fruit Body of <i>Phellinus Linteus</i> Increase Alkaline Phosphatase (ALP) Activity of Human Osteoblast-like Cells", Food Science and Biotechnology, December 2008, vol. 17, no. 6, pages 1214-1220 See abstract; and figure 1, chemical formula 3.	1,4,8
Y		2,3,5-7,9,11,12
Y	ZHANG, D. et al., "Isolation and Determination of Osmundacetone in <i>Osmundae Rhizoma</i> ", Chinese Pharmaceutical Journal, November 2010, vol. 45, no. 21, pages 1612-1614 See abstract; and page 1613, left column, METHODS and RESULTS.	2,3,5-7,9,11,12
A	CN 103623383 A (LIU, W.) 12 March 2014 See the entire document.	1-9,11,12
A	CN 104083582 A (ZHU, Y.) 08 October 2014 See the entire document.	1-9,11,12
A	KR 10-2011-0036317 A (JEJU TECHNOPARK) 07 April 2011 See the entire document.	1-9,11,12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 JANUARY 2018 (17.01.2018)

Date of mailing of the international search report

17 JANUARY 2018 (17.01.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/010822

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **10, 13, 14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 10, 13, and 14 pertain to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/010822

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN 103623383 A	12/03/2014	CN 103623383 B	28/10/2015
CN 104083582 A	08/10/2014	NONE	
KR 10-2011-0036317 A	07/04/2011	KR 10-1630801 B1	17/06/2016

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/12(2006.01)i, A61K 36/11(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A23L 33/105(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/12; A61K 36/9068; A61P 29/00; A61P 19/02; A61K 36/37; A61K 36/8945; A61K 36/11; A23L 33/10; A23L 33/105

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: osmundacetone, 고비, 추출물, 꿀 절환

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	LYU, H.-N. 등, "Phenolic Compounds from the Fruit Body of Phellinus linteus Increase Alkaline Phosphatase (ALP) Activity of Human Osteoblast-like Cells", Food Science and Biotechnology, 2008.12, 17권, 제6호, 페이지 1214-1220 초록; 및 도면 1, 화학식 3 참조.	1,4,8
Y		2,3,5-7,9,11,12
Y	ZHANG, D. 등, "Isolation and Determination of Osmundacetone in Osmundae Rhizoma", Chinese Pharmaceutical Journal, 2010. 11, 45권, 제21호, 페이지 1612-1614 초록; 및 페이지 1613, 좌결립, 실험방법 및 결과 참조.	2,3,5-7,9,11,12
A	CN 103623383 A (LIU, W.) 2014.03.12 전문 참조.	1-9,11,12
A	CN 104083582 A (ZHU, Y.) 2014.10.08 전문 참조.	1-9,11,12
A	KR 10-2011-0036317 A (재단법인 제주테크노파크) 2011.04.07 전문 참조.	1-9,11,12

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 01월 17일 (17.01.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 01월 17일 (17.01.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

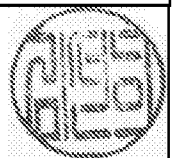
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김선희

전화번호 +82-42-481-5405



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 10, 13, 14
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제10항, 제13항 및 제14항은 사람의 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것이므로, PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사 기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 103623383 A	2014/03/12	CN 103623383 B	2015/10/28
CN 104083582 A	2014/10/08	없음	
KR 10-2011-0036317 A	2011/04/07	KR 10-1630801 B1	2016/06/17