



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년12월15일
(11) 등록번호 10-1809151
(24) 등록일자 2017년12월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/28 (2006.01) A61K 31/015 (2006.01)
A61K 31/045 (2006.01) A61P 19/10 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0091215
(22) 출원일자 2014년07월18일
심사청구일자 2014년07월18일
(65) 공개번호 10-2015-0010923
(43) 공개일자 2015년01월29일
(30) 우선권주장
1020130084905 2013년07월18일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
CN103330837 A
이진혁. 骨多孔症에 應用되는 數種의 藥物에 의한 Bone Morphogenesis Protein-2 發顯에 관한 研究. 2000. 대전대학교 대학원. 한의학과 석사학위 논문.*
Journal of Ethnopharmacology. 2011. Vol.137. pp.1089-1094.*
생약학회지. 2012. 제43권제4호, pp.286-290.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
(주)앗코스텍
서울특별시 서대문구 연세로 50, 114에이호(신촌동, 연세대학교공학원)
(72) 발명자
황재관
서울시 마포구 상암산로1길 57, 612동 1003호(상암동, 상암월드컵파크6단지)
김미보
서울특별시 서대문구 신촌동 연세대학교 제2공학관 b504호
송영우
서울특별시 서대문구 신촌동 연세대학교 제2공학관 b504호

전체 청구항 수 : 총 6 항

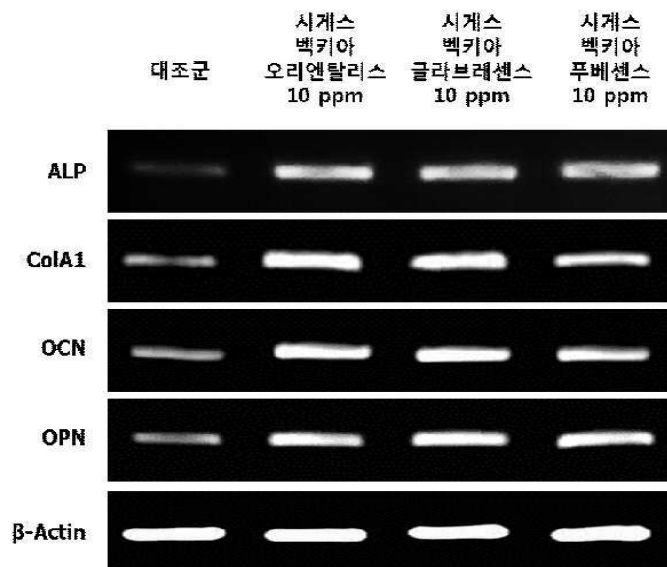
심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 키레놀 또는 희침 추출물을 포함하는 골다공증 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 키레놀(kirenol) 또는 이를 함유하는 시게스베키아 오리엔탈리스(Hui Chum, *Siegesbeckia* spp.) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 키레놀(kirenol), 또는 이를 함유하는 희침 추출물 또는 이의 분획물은 조골세포 분화를 촉진하고, 파골세포 생성을 억제함에 따라, 골다공증 예방, 개선 또는 치료에 우수한 효과가 있다. 또한, 본 발명은 천연물이므로 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있어, 의약품 또는 식품으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도7



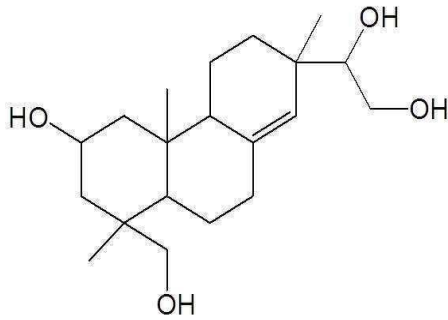
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물:

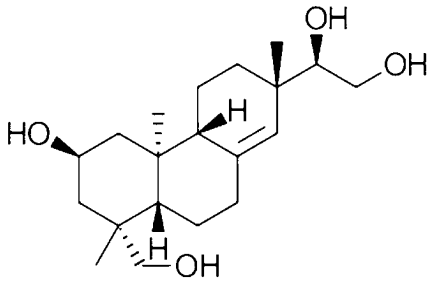
[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 키레놀인 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물:

[화학식 2]



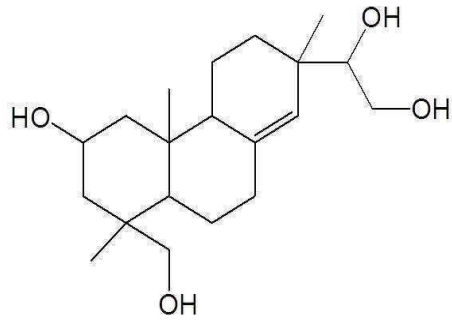
청구항 3

제1항에 있어서, 화학식 1로 표시되는 화합물은 시게스베키아 글라브레센스, 시게스베키아 푸베센스 및 시게스베키아 오리엔탈리스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 추출물 또는 이의 분획물로부터 분리된 것인 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 개선용 식품 조성물:

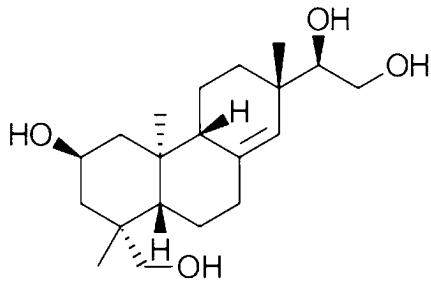
[화학식 1]



청구항 5

제4항에 있어서, 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 키레놀인 골다공증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[화학식 2]



청구항 6

제4항에 있어서, 화학식 1로 표시되는 화합물은 시게스베키아 글라브레센스, 시게스베키아 푸베센스 및 시게스베키아 오리엔탈리스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 추출물 또는 이의 분획물로부터 분리된 것인 골다공증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 키레놀(kirenol) 또는 희침(Sigesbeckia spp.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 골다공증(osteoporosis)은 다발성 골수증, 골관절염 등의 골 관련 질병들 중 가장 흔한 골격계 질환으로서, 일반적으로 골질의 증가 및 골 강도의 감소로 특징 된다. 정상적인 골의 기능을 위해서는 파골 세포(osteoclast)에 의한 골 흡수(bone resorption)와 조골 세포(osteoblast)에 의한 골 형성(bone formation)의 뼈의 항상성 작용에 의한 리모델링 과정(bone remodeling)이 필요하다(Nat. Rev. Endocrinol. 8: 212-227, 2011, J. Dent. Res. 91: 736-744, 2012).

[0003] 그러나, 파골 세포의 지나친 활성화나 조골 세포의 활성 저하는 리모델링 과정의 불균형을 초래하여, 골다공증과 같은 성인 골격계 질환을 유도한다. 이러한 불균형을 해소하기 위해서 일반적으로 파골 세포의 지나친 활성을 억제하거나, 조골 세포의 활성을 촉진시키거나, 또는 파골 세포의 활성을 억제하고 조골 세포의 활성을 촉진하는 방법이 사용되고 있으며, 이들은 골다공증의 치료에 대한 효과적인 치료적 접근 방법으로 여겨지고 있다(Nat. Rev. Rheumatol. 7: 631-638, 2011).

[0004] 조골 세포는 간엽줄기세포에서 기원하여 형성된다. 조골 세포의 분화에 의해 형성되는 칼슘 등을 포함한 무기질화는 뼈의 세기를 유지시켜줄 수 있을 뿐만 아니라, 신체 전체의 칼슘 및 호르몬 대사의 항상성에도 매우 중요한 기능을 하고 있다. 조골 세포의 분화에 의한 칼슘 형성은 비타민 D 및 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone) 등에 의해 조절되며, 세포 내에서 뼈 형태 형성단백질(bone morphogenetic protein; BMP), Wnt, MAP 키나아제, 칼시뉴린-칼모듈린 키나아제(calcineurin-calmodulin kinase), NF- κ B, AP-1 등의 다양한 신호 전달 체계의 상호 작용(cross-talk)에 의해 조골 세포의 분화에 관련된 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase;

ALP)가 초기 분화단계에서 합성된 후, 무기질화에 관련된 오스테오폰틴(osteopontin; OPN), 오스테오칼신(osteocalcin; OCN), 타입 I 콜라겐(Type I collagen; ColA1) 등이 합성됨으로써 조골 세포의 분화에 의한 골 형성이 이루어진다고 알려져 있다(Nat. Rev. Drug Discov. 11: 234-250, 2012).

[0005] Wnt/ β -카테닌 신호전달계는 이 신호전달계의 보조수용체(co-receptor)인 LRP5(low-density lipoprotein-receptor-related protein-5)가 골밀도 감소로 인해 나타나는 대표적인 유전질환인 OPPG (osteoporosis pseudoglioma syndrome)의 원인이 됨이 보고된 이래로 뼈 성장 및 골밀도 조절에 대한 관련성이 활발하게 연구되고 있으며, Wnt/ β -카테닌 신호전달계 활성화가 뼈 부피의 증가를 유도한다는 것이 알려져 있으며, 골다공증 치료에 있어 효과적이고 안전한 약물 치료 표적으로 각광받고 있다(Cell Signal. 20: 999-1009, 2008, Nat. Med. 19: 179-192, 2013, Sci. Transl. Med. 28: 36-42, 2010, Curr. Mol. Pharmacol. 4: 14-25 2011).

[0006] 현재까지 개발된 대표적인 골다공증 치료제는 파골세포(골 흡수에 관여하는 세포)의 기능을 약화시켜 뼈 손실을 막아주는 비스포스포네이트(Bisphosphonates) 제제가 주류를 이루며, 머크사(社)의 `포사맥스`, 프록터갬블사(社)의 `악토넬` 등이 있다. 하지만 이들 치료제는 뼈를 형성을 촉진하는 것이 아닌 분해 억제제로 지속적인 사용 시 뼈를 푸석푸석하게 하여 추가적인 골절을 유도 할 수 있기 때문에 근본적인 치료는 될 수 없는 상황으로 대체제가 절실한 실정이다(Datamonitor Research Reports, 2007). 따라서 본 발명자는 이러한 화학적 합성품이 아닌 식물 추출물과 같이 부작용은 적으면서 안전성이 높은 천연물을 이용한 골다공증 예방 및 치료 원료를 개발하고자 본 연구를 진행하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Cell Signal. 20: 999-1009, 2008
(비특허문헌 0002) Nat. Rev. Drug Discov. 11: 234-250, 2012

발명의 내용

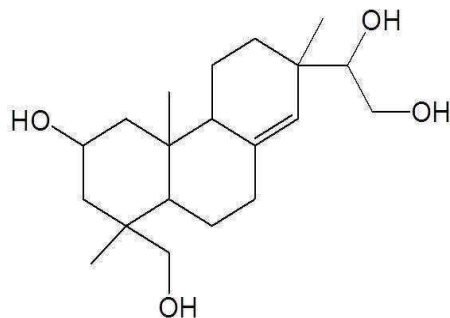
해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 골세포의 활성 촉진효과를 가지며 안전하게 적용될 수 있는 천연물질을 탐색하기 위하여 연구한 결과, 키레놀(kirenol) 또는 이를 함유하는 희침(Hui Chum, *Siegesbeckia* spp.) 추출물 또는 이의 분획물이 골다공증 예방, 개선 또는 치료 효과가 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위한 수단으로서, 본 발명은
[0010] 희침 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 골다공증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
[0011] 상기 과제를 해결하기 위한 또 다른 수단으로서, 본 발명은
[0012] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 골다공증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다:

[0013] [화학적식 1]



[0014]

발명의 효과

[0015]

본 발명에 따른 키레놀(kirenol), 또는 이를 함유하는 희침 추출물 또는 이의 분획물은 조골세포 분화를 촉진하고, 파골세포 생성을 억제함에 따라, 골다공증 예방, 개선 또는 치료에 우수한 효과가 있다. 또한, 본 발명은 천연물이므로 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있어, 의약품 또는 식품으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016]

도 1은 MC3T3-E1 조골세포에서 키레놀 처리에 의한 조골세포 분화 유전자(ALP, Col1A1 및 OPN)의 mRNA 발현량(왼쪽) 및 대조군 대비 상대적인 mRNA 발현량(오른쪽)을 측정한 결과를 보여준다.

도 2는 MC3T3-E1 조골세포에서 키레놀 처리에 의한 조골세포 초기분화 마커인 알칼라인 포스파아타제(alkaline phosphatase, ALP)의 활성을 측정한 결과를 보여준다.

도 3은 MC3T3-E1 조골세포에서 키레놀 처리에 의한 조골세포 무기질화(mineralization) 증진효과를 측정한 결과를 보여준다.

도 4는 MC3T3-E1 조골세포에서 키레놀 처리에 의한 파골세포 생성 억제 유전자(OPG(osteoprotegerin), RANKL(receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand))의 mRNA 발현량(왼쪽) 및 대조군 대비 상대적인 mRNA 발현량(오른쪽)을 측정한 결과를 보여준다.

도 5는 MC3T3-E1 조골세포에서 키레놀 처리에 의한 골형성 단백질(bone morphogenic protein, BMP) 신호전달계 유전자(BMP2, Runx2, 및 Osx)의 mRNA 발현량(왼쪽) 및 대조군 대비 상대적인 mRNA 발현량(오른쪽)을 측정한 결과를 보여준다.

도 6은 MC3T3-E1 조골세포에서 키레놀 처리에 의한 Wnt/ β -카테닌 신호전달계 유전자(LRP5, DVL2, β -카테닌, 및 CCND1)의 mRNA 발현량(왼쪽) 및 대조군 대비 상대적인 mRNA 발현량(오른쪽)을 측정한 결과를 보여준다.

도 7은 MC3T3-E1 조골세포에서 시게스벙키아 글라브레센스 에탄올 추출물, 시게스벙키아 푸베센스 에탄올 추출물, 시게스벙키아 오리엔탈리스 에탄올 추출물 처리에 의한 조골세포 분화 유전자(ALP, Col1A1, OCN 및 OPN)의 mRNA 발현량을 측정한 결과를 보여준다.

도 8은 MC3T3-E1 조골세포에서 시게스벙키아 글라브레센스 에탄올 추출물, 시게스벙키아 푸베센스 에탄올 추출물, 시게스벙키아 오리엔탈리스 에탄올 추출물 처리에 의한 파골세포 생성을 억제하는 유전자 (OPG 및 RANKL)의 mRNA 발현량을 측정한 결과를 보여준다.

도 9는 MC3T3-E1 조골세포에서 시게스벙키아 오리엔탈리스의 메탄올 추출물, 열수 추출물, 에틸아세테이트 추출물 처리에 의한 조골세포 분화 유전자(ALP 및 Col1A1)의 mRNA 발현량을 측정한 결과를 보여준다.

도 10은 MC3T3-E1 조골세포에서 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물 처리에 의한 조골세포 분화 유전자 (ALP, Col1A1, OCN 및 OPN)의 mRNA 발현량(왼쪽) 및 대조군 대비 상대적인 mRNA 발현량(오른쪽)을 측정한 결과를 보여준다.

도 11은 MC3T3-E1 조골세포에서 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물 처리에 의한 조골세포 초기분화 마커인 알칼라인 포스파아타제(alkaline phosphatase, ALP)의 활성을 측정한 결과를 보여준다.

도 12는 MC3T3-E1 조골세포에서 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물 처리에 의한 조골세포 무기질화(mineralization) 증진효과를 측정 한 결과를 보여준다.

도 13은 MC3T3-E1 조골세포에서 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물 처리에 의한 파골세포 생성을 억제하는 유전자(OPG 및 RANKL)의 mRNA 발현량(왼쪽) 및 대조군 대비 상대적인 mRNA 발현량(오른쪽)을 측정한 결과를 보여준다.

도 14는 MC3T3-E1 조골세포에서 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물 처리에 의한 골형성 단백질 신호전달계 유전자(BMP2, Runx2, 및 Osx)의 mRNA 발현량(왼쪽) 및 대조군 대비 상대적인 mRNA 발현량(오른쪽)을 측정한 결과를 보여준다.

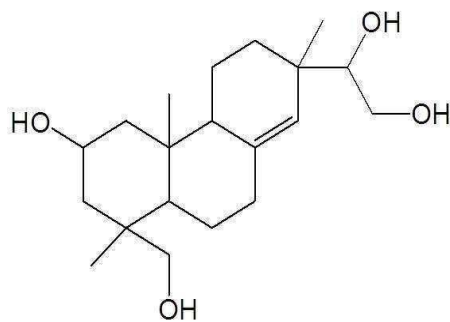
도 15는 MC3T3-E1 조골세포에서 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물 처리에 의한 Wnt/ β -카테닌 신호전달계 유전자(LRP5, DVL2, β -카테닌, 및 CCND1)의 mRNA 발현량(왼쪽) 및 대조군 대비 상대적인 mRNA 발현량(오른쪽)을 측정한 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0018] 본 발명은 회침 추출물 또는 이의 분획물, 또는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 골다공증 예방, 개선 또는 치료 용도; 회침 추출물 또는 이의 분획물, 또는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 골다공증 예방, 개선 또는 치료용 조성물; 또는 회침 추출물 또는 이의 분획물, 또는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 인간을 포함한 포유동물에 적용하는 것을 포함하는 골다공증 예방, 개선 또는 치료 방법을 제공한다.

[0019] [화학식 1]



[0020]

[0021] 본 명세서에서 '회침' 또는 '회령'은 국화과의 시게스벙키아속 식물(*Siegesbeckia* spp.)인 시게스벙키아 글라브레센스(*Siegesbeckia glabrescens* Mak.), 시게스벙키아 푸베센스(*Siegesbeckia pubescens* Mak.) 또는 시게스벙키아 오리엔탈리스(*Siegesbeckia orientalis* L.)의 지상부를 건조한 것을 의미한다. 시게스벙키아 글라브레센스는 진득찰, 시게스벙키아 푸베센스는 털진득찰, 시게스벙키아 오리엔탈리스는 제주진득찰 이라고도 한다.

[0022] 본 명세서에서 '회침 추출물' 또는 '회령 추출물'은 상호 교환적으로 사용되며, 회침(회령)을 추출하여 수득한 추출물을 의미한다. 회침 추출물의 제조방법은 당업계에 공지된 통상의 추출방법을 제한 없이 이용할 수 있고, 예를 들어, 회침 식물 또는 식물의 일부 (잎 또는 뿌리)로부터 물, 탄소수 1 내지 6의 유기용매 및 아임계 또는 초임계 유체로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출하여 수득할 수 있다.

[0023] 본 명세서에서 '분획물'은 다양한 구성성분을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획방법에 의하여 얻어진 결과물을 의미한다. 용매 분획, 실리카 겔 크로마토그래피(silica gel chromatography), prep-HPLC 등의 기술을 이용하여 활성물질이 농축된 특정 분획물을 제조할 수 있다.

[0024] 본 명세서에서, 용어 '예방'은 골다공증의 발명을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하며, '개선' 또는 '치료'는 골다공증의 증상을 경감, 완화, 또는 없애거나, 골다공증의 진행을 지연, 중단 또는 역전시키는 등, 골다공증과 관련하여 이롭게 변경시키는 모든 행위를 포함한다. '골다공증 예방, 개선 또는 치료용 조성물'은 약학 조성물 또는 식품 조성물을 포함한다.

[0025] 본 발명의 골다공증 예방, 개선 또는 치료용 조성물은, 회침 추출물 또는 이의 분획물 이외에, 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 예컨대, 골다공증에 효과가 있는 공지된 성분을 포함할 수 있다. 추가적인 성분을 포함하게 되면 본 발명의 조성물의 골다공증에 대한 예방, 개선 또는 치료

효과가 더욱 증진될 수 있을 것이다. 상기 성분 추가 시에는 복합 사용에 따른 피부 안전성, 제형화의 용이성, 유효성분들의 안정성을 고려할 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서, 상기 조성물은 당업계에서 공지된 골다공증 치료 성분으로서, 치자(*GardeniaeFructus*) 추출물, 문주란(*Crinumasiaticum*) 추출물, 누에 암번데기 분말, 사철썩 추출물, 율나무 (*Rhus verniciflua* Stokes) 추출물, 숙지황 추출물, 어성초 추출물, 두충 추출물, 우슬 추출물, 당귀 추출물, 구기자 추출물, 백복령 추출물, 백작약 추출물, 육계 추출물, 세신 추출물, 백지 추출물, 부자 추출물, 감초 추출물, 생강 추출물, 백출 추출물, 목단피 추출물, 감초 추출물, 박하 추출물 및 생강 추출물 등으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 성분을 추가로 포함할 수 있다. 추가의 성분은 전체 조성물 중량에 대하여 0.0001 중량% 이상 내지 10 중량% 이하로 포함될 수 있다. 예를 들어, 0.0001 중량% 이상 내지 1 중량% 이하, 0.0001중량% 이상 내지 0.1중량% 이하, 0.0001 중량% 이상 내지 0.001 중량% 이하, 0.001중량% 이상 내지 10중량% 이하, 0.001중량% 이상 내지 1중량% 이하, 0.001 중량% 이상 내지 0.1중량% 이하, 0.01 중량% 이상 내지 10중량% 이하, 0.01중량% 이상 내지 1 중량% 이하일 수 있다. 상기 함량 범위는 피부 안전성, 상기 화학식 1의 화합물의 제형화 시의 용이성 등의 요건에 따라 조절될 수 있을 것이다.

[0026] 본 발명은 희철 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방, 또는 치료용 약학 조성물 또는 골다공증 예방, 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0027] 한 구체예에서, 희점 추출물은 시게스벙키아 글라브레센스, 시게스벙키아 푸베센스 및 시게스벙키아 오리엔탈리스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 식물의 추출물일 수 있다. 예를 들어, 시게스벙키아 글라브레센스, 시게스벙키아 푸베센스 또는 시게스벙키아 오리엔탈리스의 건조된 잎과 줄기를 이용한 에탄올 추출물, 열수 추출물, 헥산 추출물, 에틸아세테이트 추출물, 초고압 추출물일 수 있다.

[0028] 한 구체예에서, 회침 추출물은 물, 탄소수 1 내지 6의 유기용매, 아임계 유체 및 초임계 유체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 용매로 회침을 추출하여 수득할 수 있다. 예를 들어, 회침 식물을 100 MPa 이상의 초고압 조건 하에서 추출하여 수득할 수도 있다. 필요한 경우에는 당업계에 공지된 방법에 따라 여과 및 농축 단계를 추가적으로 포함하여 제조할 수 있다.

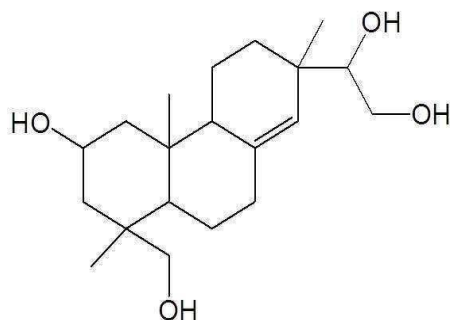
[0029] 한 구체예에서, 탄소수 1 내지 6의 유기용매는 탄소수 1 내지 6의 알코올(alc0hol), 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌 클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane), 시클로헥산(cyclohexane) 및 석유에테르(petroleum ether)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명의 회점 추출물은 건조시킨 회점을 식품가공에 적합한 정제수, 에탄올 및 아임계수 또는 초임계 이산화탄소를 이용하여 추출, 정제하여 얻을 수 있거나, 초고압 추출 장치를 이용하여 추출, 정제하여 얻을 수 있으며, 또는 회점 식물을 직접 압착하여 얻은 오일로부터 분리 정제하여 얻을 수 있다. 예를 들어, 100 MPa 이상의 초고압 조건 하에서 회점을 추출하여 추출물을 수득할 수 있다.

[0031] 한 구체예에서, 희침 추출물 또는 이의 분획물은 키레놀을 유효성분으로 함유할 수 있다.

[0032] 본 발명은 또한, 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방, 또는 치료용 약학 조성물 또는 골다공증 예방, 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다:

[0033] [화학식 1]

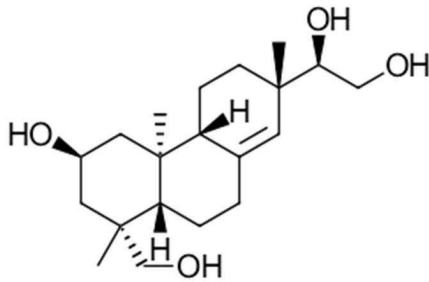


[0034]

[0035] 상기 화학식 1의 화합물은 가능한 모든 이성질체를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 하기 화학식 2의 화합물을 포

함할 수 있다.

[0036] [화학식 2]



[0037]

[0038] 상기 화학식 2의 화합물은 일명 키레놀(kirenol)이라 한다.

[0039] 키레놀(kirenol)은 시게스베키아 오리엔탈리스(*Siegesbeckia orientalis* L.), 시게스베키아 푸베센스(*Siegesbeckia pubescens* Mak.), 시게스베키아 글라브레센스(*Siegesbeckia glabrescens* Mak.)에 함유되어 있는 물질로 제주도 및 남부지방에 서식하는 시게스베키아 속(*Siegesbeckia* spp.) 식물의 유효성분이다. 키레놀 또는 회침 추출물은 항염효과 및 진통효과(J. Ethnopharmacol. 137: 1089-1094, 2011), 항균효과(Pharmacogn. Mag. 8: 149-155, 2012), 관절염효과(Phytomedicine 19: 882-889, 2012)를 갖는 것으로 보고되었으나, 본 발명의 이전에는 골다공증 예방 및 치료효과에 관해서는 알려진 바 없었다.

[0040] 키레놀은 건조시킨 회침을 식품가공에 적합한 정제수, 에탄올 및 아임계수 또는 초임계 이산화탄소를 이용하여 추출, 정제하거나, 초고압 추출 장치를 이용하여 추출, 정제하여 얻을 수 있으며, 또는 회침을 직접 압착하여 얻은 오일로부터 분리 정제하여 얻을 수 있다. 회침 추출물로부터 키레놀의 분리 및 정제는 실리카겔(silica gel)이나 활성 알루미나(alumina)등의 각종 흡성수지를 충전한 컬럼 크로마토그래피 및 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 등을 단독으로 혹은 병행하여 사용할 수 있으나, 키레놀의 추출 및 분리정제 방법이 반드시 상기 방법에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 또한, 상기 화학식 1의 화합물 또는 상기 화학식 2의 화합물은 식물 추출물로부터 분리 또는 합성하여 이용하거나, 시판되고 있는 화합물을 이용할 수 있다.

[0042] 한 구체예에서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 화학식 2로 표시되는 화합물은 회침 추출물 또는 이의 분획물로부터 분리된 것일 수 있다.

[0043] 본 발명의 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물은 키레놀의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 용어 '약제학적으로 허용 가능한'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 말하며, 상기 염으로는 약제학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하다.

[0044] 상기 키레놀의 약제학적으로 허용 가능한 염은 유기산 또는 무기산을 이용하여 형성된 산 부가염일 수 있으며, 상기 유기산은 예를 들면 포름산, 아세트산, 프로피온산, 락트산, 부티르산, 이소부티르산, 트리플루오로아세트산, 말산, 말레산, 말론산, 푸마르산, 숙신산, 숙신산 모노아미드, 글루탐산, 타르타르산, 옥살산, 시트르산, 글리콜산, 글루쿠론산, 아스코르브산, 벤조산, 프탈산, 살리실산, 안트라닐산, 디클로로아세트산, 아미노옥시 아세트산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 또는 메탄술폰산을 포함한다. 무기산은 예를 들면 염산, 브롬산, 황산, 인산, 질산, 탄산 또는 붕산을 포함한다. 산 부가염은 바람직하게는 염산염 또는 아세트산염 형태일 수 있으며, 보다 바람직하게는 염산염 형태일 수 있다.

[0045] 상기 언급된 산 부가염은 a) 키레놀 및 산을 직접 혼합하거나, b) 이들 중 한 가지를 용매 또는 함수 용매 중에 용해시키고 혼합시키거나, 또는 c) 키레놀을 용매 또는 수화 용매 중의 산에 위치시키고 이들을 혼합하는 일반적인 염 제조방법으로 제조된다.

[0046] 위와는 별도로 추가적으로 염이 가능한 형태는 가바염, 가바펜틴염, 프레가발린염, 니코틴산염, 아디페이트염,

헤미말론산염, 시스테인염, 아세틸시스테인염, 메티오닌염, 아르기닌염, 라이신염, 오르니틴염 또는 아스파르트산염 등이 있다.

- [0047] 또한, 본 발명의 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다.
- [0048] 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 또한 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등을 포함할 수 있다. 또한, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 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).
- [0049] 본 발명의 약학 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들어, 경구 또는 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구적인 투여방법으로는 이에 제한되는 것은 아니나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 약학 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화할 수 있다. 제형화할 경우에는 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS), 카보하이드레이트(예를 들어, 글루코스, 만노스, 수크로스, 또는 텍스트란 등), 항산화제, 정균제, 킬레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 충전제, 증량제, 결합제, 아췌반트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제, 습윤제, 봉해제 또는 계면활성제, 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [0051] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 액제, 젤제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 또는 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 약학 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분(옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분 등 포함), 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose), 텍스트로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 예컨대, 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다.
- [0052] 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물 또는 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 또는 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0053] 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 봉해제로 첨가할 수 있으며, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0054] 비경구적으로 투여하는 경우 본 발명의 약학 조성물은 적합한 비경구용 담체와 함께 주사제, 경피 투여제 및 비강 흡입제의 형태로 당 업계에 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% 텍스트로오스와 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.
- [0055] 경피 투여제의 경우 연고제, 크림제, 로션제, 젤제, 외용액제, 파스타제, 리니먼트제, 에어로졸제 등의 형태가 포함된다. 상기에서 '경피 투여'는 약학적 조성물을 국소적으로 피부에 투여하여 약학적 조성물에 함유된 유효한 양의 활성성분이 피부 내로 전달되는 것을 의미한다.
- [0056] 흡입 투여제의 경우, 본 발명에 따라 사용되는 화합물은 적합한 충전제, 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 캡

술 및 카트리지는 화합물, 및 락토즈 또는 전분과 같은 적합한 분말 기재의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화할 수 있다. 비경구 투여용 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042, Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기재되어 있다.

[0057] 본 발명의 약학 조성물은 키레놀 또는, 희침 추출물 또는 이의 분획물을 유효량으로 포함할 때 바람직한 골다공증 예방, 개선 또는 치료 효과를 제공할 수 있다. 본 명세서에서, '유효량'이라 함은 음성 대조군에 비해 그 이상의 반응을 나타내는 양을 말하며 바람직하게는 골다공증을 예방, 개선 또는 치료하기에 충분한 양을 말한다. 본 발명의 약학적 조성물에 키레놀 또는 이를 함유하는 희침 추출물이 0.01 내지 99.99% 포함될 수 있으며, 잔량은 약학적으로 허용 가능한 담체가 차지할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 키레놀 또는 희침 추출물 또는 이의 분획물의 유효량은 조성물이 제품화되는 형태 등에 따라 달라질 것이다.

[0058] 본 발명의 약학적 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 약학 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 예를 들어, 키레놀 또는 이를 함유하는 희침 추출물을 하루에 체중 1 kg 당 바람직하게 0.001 내지 100 mg, 더 바람직하게는 0.01 내지 10 mg의 양으로 투여되도록 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 그러나 상기 키레놀 또는 이를 함유하는 희침 추출물의 용량은 약학적 조성물의 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 상기 키레놀 또는 이를 함유하는 희침 추출물을 골다공증 예방 또는 치료를 위한 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

[0059] 본 발명의 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 또는 생물학적 반응조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0060] 본 발명의 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물은 또한 키레놀 또는, 희침 추출물 또는 이의 분획물을 유효 성분으로 포함하는 외용제의 제형으로 제공할 수 있다.

[0061] 본 발명의 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 피부외용제로 사용하는 경우, 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 유화제, 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 활성제, 친유성 활성제 또는 지질 소나 등 피부 외용제에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 피부 과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 또한 상기 성분들은 피부 과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.

[0062] 본 발명의 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물이 피부 외용제로 제공될 경우, 이에 제한되는 것은 아니나, 연고, 패취, 겔, 크림 또는 분무제 등의 제형일 수 있다.

[0063] 본 발명의 골다공증 예방 또는 개선용 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food), 식품 첨가제(food additives) 및 사료 등의 모든 형태를 포함하며, 인간 또는 가축을 비롯한 동물을 취식대상으로 한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당 업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.

[0064] 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다. 일반 식품으로는 이에 한정되지 않지만 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지 콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게이트, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 젓, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물 유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 상기 키레놀 또는 이를 함유하는 희침 추출물을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 영양보조제로는 이에 한정되지 않지만 캡슐, 타블렛, 환 등에 상기 키레놀 또는 이를 함유하는 희침 추출물을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 건강기능식품으로는 이에 한정되지 않지만 예를 들면, 상기 키레놀 또는 이를 함유하는 희침 추출물 자체를 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용(건강음료)할 수 있도록 액상화, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있

다. 또한, 상기 키레놀 또는 이를 함유하는 희점 추출물을 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다. 또한, 상기 키레놀 또는 이를 함유하는 희점 추출물과 골다공증에 효과가 있다고 알려진 공지의 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다.

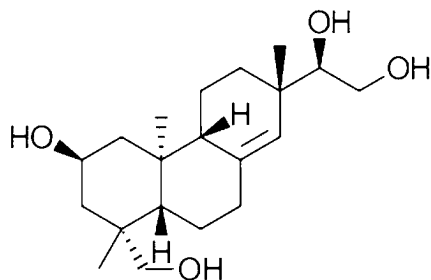
[0065] 본 발명의 골다공증 예방 또는 개선용 식품 조성물이 건강음료 조성물로 이용되는 경우, 상기 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 수크로스와 같은 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로 텍스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

[0066] 키레놀 또는 이를 함유하는 희점 추출물은 골다공증 예방 또는 개선용 식품 조성물의 유효성분으로 함유될 수 있는데, 그 양은 골다공증 예방, 개선 효과를 얻기에 유효한 양으로 특별히 한정되는 것은 아니나, 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%인 것이 바람직하다. 본 발명의 식품 조성물은 키레놀 또는 이를 함유하는 수크로스 추출물과 함께 골다공증에 효과가 있는 것으로 알려진 다른 활성 성분과 함께 혼합하여 제조될 수 있다.

[0067] 상기 외에 본 발명의 건강식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0068] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0069] **참조예 1: 키레놀(kirenol)물질 정보**



[0070]

[0071] 명칭: Kirenol; Kirel; (1R,3S,4aS,4bS,7S,10aS)-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,9,10,10a-Dodecahydro-3-hydroxy-7-[(R)-1,2-dihydroxyethyl]-1,4a,7-trimethylphenanthrene-1-methanol

[0072] CAS No.: 52659-56-0

[0073] **[실시예 1] 시게스베키아 글라브레센스 추출물의 제조**

[0074] [실시예 1-1] 시게스베키아 글라브레센스 에탄올 추출물의 제조

[0075] 건조시킨 시게스베키아 글라브레센스의 잎과 줄기를 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 시게스베키아 글라브레센스 시료 100 g을 에탄올 1 L에 넣고 50 °C에서 60분간 교반하면서 추출하였다. 추출된 시료는 와트만(whatman) 2번

여과지로 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거함으로써 시게스백키아 글라브레센스 에탄올 추출물을 얻었다.

[0076] [실시예 1-2] 시게스백키아 글라브레센스 메탄올 추출물의 제조

[0077] 건조시킨 시게스백키아 글라브레센스의 잎과 줄기를 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 시게스백키아 글라브레센스 시료 100 g을 에탄올 1 L에 넣고 50 ℃에서 60분간 교반하면서 추출하였다. 추출된 시료는 와트만(whatman) 2번 여과지로 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거함으로써 시게스백키아 글라브레센스 메탄올 추출물을 얻었다.

[0078] [실시예 1-3] 시게스백키아 글라브레센스 열수 추출물의 제조

[0079] 건조시킨 시게스백키아 글라브레센스의 잎과 줄기를 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 시게스백키아 글라브레센스 시료 100 g을 물 1 L에 넣고 100 ℃에서 4시간 교반하면서 추출하였다. 추출된 시료는 와트만 2번 여과지로 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거함으로써 시게스백키아 글라브레센스 열수 추출물을 얻었다.

[0080] [실시예 1-4] 시게스백키아 글라브레센스 에틸아세테이트 추출물의 제조

[0081] 건조시킨 시게스백키아 글라브레센스의 잎과 줄기를 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 시게스백키아 글라브레센스 시료 100 g을 에틸아세테이트 1 L에 넣고 50 ℃에서 60분간 교반하면서 추출하였다. 추출된 시료는 와트만 2번 여과지로 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거함으로써 시게스백키아 글라브레센스 에틸아세테이트 추출물을 얻었다.

[0082] [실시예 1-5] 시게스백키아 글라브레센스 초고압 추출물의 제조

[0083] 건조시킨 시게스백키아 글라브레센스의 잎과 줄기를 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 시게스백키아 글라브레센스 시료 1 g과 18% 에탄올 76 mL을 폴리에틸렌(polyethylene) 팩에 넣고 밀봉한 후 초고압 추출장치(Frescal MFP-7000; Mitsubishi Heavy Industries, Tokyo, Japan)를 이용하여 추출하였다. 초고압 추출 조건은 추출압력이 320 MPa, 추출시간은 5 min 이었다. 추출된 시료는 와트만 2번 여과지로 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거함으로써 시게스백키아 글라브레센스 초고압 추출물을 얻었다.

[0084] [실시예 2] 시게스백키아 푸베센스 추출물의 제조

[0085] [실시예 2-1] 시게스백키아 푸베센스 에탄올 추출물의 제조

[0086] 건조시킨 시게스백키아 글라브레센스의 잎과 줄기를 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 시게스백키아 글라브레센스 시료 100 g을 에탄올 1 L에 넣고 50 ℃에서 60분간 교반하면서 추출하였다. 추출된 시료는 와트만(whatman) 2번 여과지로 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거함으로써 시게스백키아 푸베센스 에탄올 추출물을 얻었다.

[0087] [실시예 2-2] 시게스백키아 푸베센스 메탄올 추출물의 제조

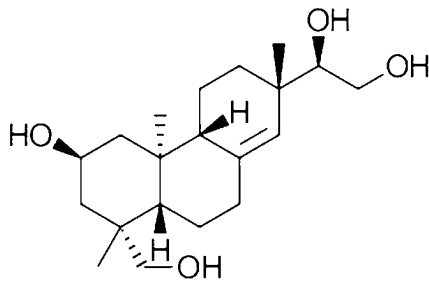
[0088] 건조시킨 시게스백키아 글라브레센스의 잎과 줄기를 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 시게스백키아 글라브레센스 시료 100 g을 에탄올 1 L에 넣고 50 ℃에서 60분간 교반하면서 추출하였다. 추출된 시료는 와트만(whatman) 2번 여과지로 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거함으로써 시게스백키아 푸베센스 메탄올 추출물을 얻었다.

[0089] [실시예 2-3] 시게스백키아 푸베센스 열수 추출물의 제조

- [0090] 건조시킨 시게스베키아 푸베센스 의 잎과 줄기를 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 시게스베키아 푸베센스 시료 100 g을 물 1 L에 넣고 100 ℃에서 4시간 교반하면서 추출하였다. 추출된 시료는 와트만 2번 여과지로 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거함으로써 시게스베키아 푸베센스 열수 추출물을 얻었다.
- [0091] [실시예 2-4] 시게스베키아 푸베센스 에틸아세테이트 추출물의 제조
- [0092] 건조시킨 시게스베키아 푸베센스 의 잎과 줄기를 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 시게스베키아 푸베센스 시료 100 g을 에틸아세테이트 1 L에 넣고 50 ℃에서 60분간 교반하면서 추출하였다. 추출된 시료는 와트만 2번 여과지로 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거함으로써 시게스베키아 푸베센스 에틸아세테이트 추출물을 얻었다.
- [0093] [실시예 2-5] 시게스베키아 푸베센스 초고압 추출물의 제조
- [0094] 건조시킨 시게스베키아 푸베센스의 잎과 줄기를 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 시게스베키아 푸베센스 시료 1 g과 18% 에탄올 76 mL을 폴리에틸렌(polyethylene) 팩에 넣고 밀봉한 후 초고압 추출장치(Frescal MFP-7000; Mitsubishi Heavy Industries, Tokyo, Japan)를 이용하여 추출하였다. 초고압 추출 조건은 추출압력이 320 MPa, 추출시간은 5 min 이었다. 추출된 시료는 와트만 2번 여과지로 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거함으로써 시게스베키아 푸베센스 초고압 추출물을 얻었다.
- [0095] **[실시예 3] 시게스베키아 오리엔탈리스 추출물의 제조**
- [0096] [실시예 3-1] 시게스베키아 오리엔탈리스 에탄올 추출물의 제조
- [0097] 건조시킨 시게스베키아 오리엔탈리스의 잎과 줄기를 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 시게스베키아 오리엔탈리스 시료 100 g을 에탄올 1 L에 넣고 48시간 상온에서 추출하였다. 추출된 시료는 와트만(whatman) 2번 여과지로 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거함으로써 시게스베키아 오리엔탈리스 에탄올 추출물을 얻었다.
- [0098] [실시예 3-2] 시게스베키아 오리엔탈리스 메탄올 추출물의 제조
- [0099] 건조시킨 시게스베키아 오리엔탈리스의 잎과 줄기를 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 시게스베키아 오리엔탈리스 시료 100 g을 메탄올 1 L에 넣고 50 ℃에서 60분간 교반하면서 추출하였다. 추출된 시료는 와트만 2번 여과지로 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거함으로써 시게스베키아 오리엔탈리스 메탄올 추출물을 얻었다.
- [0100] [실시예 3-3] 시게스베키아 오리엔탈리스 열수 추출물의 제조
- [0101] 건조시킨 시게스베키아 오리엔탈리스의 잎과 줄기를 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 시게스베키아 오리엔탈리스 시료 100 g을 물 1 L에 넣고 100 ℃에서 4시간 교반하면서 추출하였다. 추출된 시료는 와트만 2번 여과지로 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거함으로써 시게스베키아 오리엔탈리스 열수 추출물을 얻었다.
- [0102] [실시예 3-4] 시게스베키아 오리엔탈리스 에틸아세테이트 추출물의 제조
- [0103] 건조시킨 시게스베키아 오리엔탈리스의 잎과 줄기를 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 시게스베키아 오리엔탈리스 시료 100 g을 에틸아세테이트 1 L에 넣고 50 ℃에서 60분간 교반하면서 추출하였다. 추출된 시료는 와트만 2번 여과지로 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거함으로써 시게스베키아 오리엔탈리스 에틸아세테이트 추출물을 얻었다.

- [0104] [실시예 3-5] 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물의 제조
- [0105] 건조시킨 시게스벙키아 오리엔탈리스의 잎과 줄기를 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 시게스벙키아 오리엔탈리스 시료 1 g과 18% 에탄올 76 mL을 폴리에틸렌(polyethylene) 팩에 넣고 밀봉한 후 초고압 추출장치(Frescal MFP-7000; Mitsubishi Heavy Industries, Tokyo, Japan)를 이용하여 추출하였다. 초고압 추출 조건은 추출압력이 320 MPa, 추출시간은 5 min 이었다. 추출된 시료는 와트만 2번 여과지로 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거함으로써 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물을 얻었다.
- [0106] [실시예 4] 키레놀의 분리 및 구조결정
- [0107] [실시예 4-1] 키레놀의 분리
- [0108] 상기 실시예 3-1에서 얻은 농축된 시게스벙키아 오리엔탈리스 에탄올 추출물을 실리카겔이 충전된 컬럼에 적재하고 에틸아세테이트, 메탄올을 10:0.5(v/v)의 비율로 혼합한 용매시스템을 이용하여 분취하였다. 상기 분취 순서에 따라서 총 7개의 분획으로 나누어 각각의 분획을 농축 건조하였다. 7개의 분획 중 6번 분획(분획 6)을 RP-18 역상컬럼 크로마토그래피(Lichroprep RP-18 25~40um, Merck&Co., Whitehouse Station, NJ, USA)를 이용하여 전개 용매 10% 에틸아세테이트로 분취하였다. 상기 분취 순서에 따라서 총 2개의 분획으로 나누어 각각의 분획을 농축 건조하였다. 상기 2개의 분획 중 2번 분획(분획 6-2)을 농축 건조하고 다시 Rp-18 역상컬럼 크로마토그래피 이용하여 전개 용매 20% 에틸아세테이트로 분취하였다. 상기 분취 순서에 따라서 총 3개의 분획으로 나누어 각각의 분획을 농축 건조하였다. 최종적으로 3개의 분획 중 2번 분획(분획 6-2-2)을 농축 건조시켜 순수한 단일 활성 물질을 분리하였다.
- [0109] [실시예 4-2] 키레놀의 구조결정
- [0110] 상기 실시예 4-1에서 분리된 단일 활성물질의 구조결정을 위하여 ^1H -NMR 스펙트럼과 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 각각 500 MHz 와 125 MHz(용매: MeOH)에서 측정하였다. 수득된 ^1H -NMR 스펙트럼과 ^{13}C -NMR 스펙트럼의 결과를 토대로 ^1H - ^1H 의 상관관계와 ^1H - ^{13}C 의 상관관계를 측정하기 위하여 ^1H - ^1H COSY 스펙트럼과 ^1H - ^{13}C HSQC 스펙트럼을 측정하고, 탄소공명을 통해 나오는 파장으로 각각의 탄소 신호를 구별하여 그 결과를 측정하였다.
- [0111] 또한 상기 분리된 단일물질의 질량분석을 위해 측정된 FAB-MS를 측정하였다. 본 화합물은 FAB-MS에서 [M]⁺가 m/z 338.48에서 관측되어 분자량이 338.48로 판명되었고, 분자식 $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_4$ 였다.
- [0112] 이상의 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, 및 FAB-MS에 대한 결과와 기존에 발표된 연구보고(Wang J.P. et al., Pharmacogn. Mag., 8:149-155, 2012)를 비교 분석하여 동정한 결과, 상기에서 분리된 단일물질은 하기 화학식 2로 표시되는 키레놀(kirenol) 화합물로 확인되었다.

[0113] [화학적식 2]



[0114]

[0115] [실시예 5] 키레놀 처리에 의한 조골세포 분화 증진 및 파골세포 생성 억제 효과

[0116] [실시예 5-1] 키레놀의 조골세포 분화 유전자 발현 증가 효과

[0117] MC3T3-E1 조골세포(American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA)를 10%의 우태아 혈청이 함유된 α -MEM(α -modified Eagle's Medium) 배지에서 배양한 후, 6-웰 평판배양기(6-well microtiter plate)에 1,00,000 세포/ 웰이 되도록 넣는다. 90%까지 자란 후 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ L-아스코르브산(Sigma, St. Louis, MO, USA), 10mM β -glycerol phosphate disodium salt hydrate(Sigma)이 든 배양액에 상기 실시예 4-2에서 제조한 키레놀을 각각 10, 20, 그리고 40 μM 농도로 조골세포에 처리하여 3일 동안 조골세포 분화를 유도하였다. 키레놀을 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였다. 조골 세포 내 분화에 관여하는 주요 유전자 ALP, Col1A1 및 OPN의 mRNA 발현량을 알아보기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 분화한 세포로부터 TRIzol시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 총 RNA를 수확하여 역전사시킨 후, RT-PCR 분석을 다음과 같이 수행하였다. 먼저 cDNA 합성을 위해 상기 RNA를 역전사 효소로 역전사시켰다. 다음의 프라이머로 RT-PCR을 수행하였다:

[0118] β -액틴:

[0119] 서열번호 1: 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'(Forward primer)

[0120] 서열번호 2: 5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3'(Reverse primer)

[0121] ALP:

[0122] 서열번호 3: 5'-CCATGGTAGATTACGCTCACA-3'(Forward primer)

[0123] 서열번호 4: 5'-ATGGAGGATTCCAGATACAGG-3' (Reverse primer)

[0124] Col1A1:

[0125] 서열번호 5: 5'-ACTCAGCCGTCTGTGCCTCA-3' (Forward primer)

[0126] 서열번호 6: 5'-GGAGGCCTCGGTGGACATTA-3' (Reverse primer)

[0127] OPN:

[0128] 서열번호 7: 5'-GACCACATGGACGACGATG -3' (Forward primer)

[0129] 서열번호 8: 5'-TGGAACCTTGCTTGACTATCGA-3' (Reverse primer)

[0130] 또한, RT-PCR에 의하여 측정된 mRNA 발현량을 토대로, 대조군 대비 키레놀 처리에 의한 상대적인 mRNA 발현량을 계산하였다.

[0131] 그 결과 도 1에 나타난 바와 같이 키레놀이 조골세포 분화 유전자인 ALP, Col1A1 및 OPN의 mRNA 발현량을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(**p<0.01). 이는, MC3T3-E1 조골세포 내에서 키레놀은 뼈 형성을 촉진하는 효과가 있음을 의미한다.

- [0132] [실시예 5-2] 키레놀의 조골세포 초기분화 마커인 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP)의 활성 증가 효과
- [0133] 상기 실시예 5-1와 동일한 방법으로 분화한 MC3T3-E1 조골세포는 PBS(phosphate buffered saline)용액으로 세척한 후 0.2% Triton X-100을 이용하여 세포막을 용해시킨 뒤 2,500×g, 4℃에서 15분 동안 원심분리하여 상등액을 취하고, SensoLyte p-nitrophenyl phosphate (p-NPP) ALP activity assay kit (AnaSpec, Inc., Fremont, CA, USA)를 이용하여 ALP 활성을 측정하였다. 단백질을 Bio-Rad protein assay kit(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 Bradford법으로 단백질을 정량하였다. ALP 활성은 ng/mg 단백질로 표기하였다.
- [0134] 그 결과 도 2에 나타난 바와 같이 키레놀은 ALP 활성을 농도 의존적으로 증가시켰고 대조군과 비교 하였을 때 유의적인 차이를 보였다 (*p< 0.05, **p< 0.01). 이는 본 발명의 키레놀이 조골세포 초기 분화 마커인 ALP 활성을 증가시킴으로써 조골세포 분화를 촉진하는 능력이 우수하다는 것을 의미한다.
- [0135] [실시예 5-3] 키레놀의 조골세포 무기질화(mineralization) 증진효과
- [0136] 상기 실시예 5-1와 동일한 방법으로 14일 동안 분화한 MC3T3-E1 조골세포는 PBS용액으로 세척한 후 70% 에탄올로 1시간 동안 상온에서 세포를 고정시켰다. 세포를 고정시킨 후 Alizarine Red solution(40 mM, pH 4.2)으로 10분간 염색하고 3차 증류수로 5번 세척한 다음 0.1 N 수산화나트륨(NaOH)을 첨가하여 Alizarine Red염색을 추출한 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 무기질화 정도는 키레놀을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.
- [0137] 그 결과 도 3에 나타난 바와 같이 대조군과 비교하여 키레놀 처리에 의하여 조골 세포의 무기질화가 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 본 발명의 키레놀이 조골 세포의 분화를 촉진시켜 무기질화를 증진시키는 활성을 갖고 있음을 의미한다.
- [0138] [실시예 5-4] 키레놀의 파골세포 생성을 억제하는 OPG(osteoprotegerin), RANKL(receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)의 발현 증가 효과
- [0139] 상기 실시예 5-1에서와 동일한 방법으로 분화한 MC3T3-E1 조골세포로부터 총 RNA를 수확하여 역전사 시킨 후, 다음의 프라이머로 RT-PCR을 수행하였다:
- [0140] RANKL:
- [0141] 서열번호 9: 5'-CGCTCTGTTCTGTTCTTCGAGCG-3' (Forward primer)
- [0142] 서열번호 10: 5'-TCGTGCTCCCTCCTTTCATCAGGTT-3' (Reverse primer)
- [0143] OPG:
- [0144] 서열번호 11: 5'-AAAGCACCTGTATAAAACA-3'(Forward primer)
- [0145] 서열번호 12: 5'-CCGTTTATCCTCTCTACTC-3'(Reverse primer)
- [0146] 또한, RT-PCR에 의하여 측정된 mRNA 발현량을 토대로, 대조군 대비 키레놀 처리에 의한 상대적인 mRNA 발현량을 계산하였다.
- [0147] 도 4에 나타낸 바와 같이 키레놀 처리에 따라 파골세포 생성을 억제하는 OPG의 mRNA 발현이 통계학적으로 유의하게 증가하고 RANKL의 mRNA 발현이 통계학적으로 유의하게 감소한 것을 확인할 수 있었다 (**p<0.01). 따라서 키레놀 처리로 인해 MC3T3-E1 조골세포 내에서 파골세포 생성을 억제하는 OPG와 RANKL의 발현을 조절하여 파골세포의 생성을 억제하는 기능을 갖고 있음을 의미한다.
- [0148] [실시예 5-5] 키레놀의 골형성 단백질(bone morphogenic protein, BMP) 신호전달계 활성 촉진 효과

- [0149] 상기 실시예 5-1에서와 동일한 방법으로 분화한 MC3T3-E1 조골세포로부터 총 RNA를 수확하여 역전사 시킨 후, 다음의 프라이머로 RT-PCR을 수행하였다:
- [0150] BMP:
- [0151] 서열번호 13: 5'-CCAAGACACAGTTCCTACA-3' (Forward primer)
- [0152] 서열번호 14: 5'-CACGGCTTCTAGTTGATGGA-3' (Reverse primer)
- [0153] Runx2:
- [0154] 서열번호 15: 5'-GCCGGGAATGATGAGAACTA-3' (Forward primer)
- [0155] 서열번호 16: 5'-TGGGGAGGATTTGTGAAGAC-3' (Reverse primer)
- [0156] Osx:
- [0157] 서열번호 17: 5'-CTTCCAATCCTATTGCCGTTT-3' (Forward primer)
- [0158] 서열번호 18: 5'-CGGCCAGGTTACTAACACCAATCT-3' (Reverse primer)
- [0159] 또한, RT-PCR에 의하여 측정된 mRNA 발현량을 토대로, 대조군 대비 키레놀 처리에 의한 상대적인 mRNA 발현량을 계산하였다.
- [0160] 도 5에 나타낸 바와 같이 키레놀 처리에 따라 골형성 단백질 신호전달계 주요 유전자인 BMP2, Runx2(runt-related transcription factor 2), Osx(osterix)의 mRNA 발현이 통계학적으로 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다 (**p<0.01). 따라서 키레놀 처리로 인해 MC3T3-E1 조골세포 내에서 골형성 단백질 신호전달계 활성이 촉진됨을 확인하였다.
- [0161] [실시예 5-6] 키레놀의 Wnt/ β -카테닌 신호전달계 활성 촉진 효과
- [0162] 상기 실시예 5-1에서와 동일한 방법으로 분화한 MC3T3-E1 조골세포로부터 총 RNA를 수확하여 역전사 시킨 후, 다음의 프라이머로 RT-PCR을 수행하였다:
- [0163] β -액틴:
- [0164] 서열번호 1: 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3' (Forward primer)
- [0165] 서열번호 2: 5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3' (Reverse primer)
- [0166] LRP5:
- [0167] 서열번호 19: 5'-AAGGTGCTGTGTACTGGAC-3' (Forward primer)
- [0168] 서열번호 20: 5'-AGAAGAGAACCTTACGGGACG-3' (Reverse primer)
- [0169] DVL2:
- [0170] 서열번호 21: 5'-GCTTCCACATGGCCATGGGC-3' (Forward primer)
- [0171] 서열번호 22: 5'-TGGCACTGCTGGTGAGAGTCACAG-3' (Reverse primer)
- [0172] β -카테닌:
- [0173] 서열번호 23: 5'-GCCAAGTGGGTGGTATAGAG-3' (Forward primer)
- [0174] 서열번호 24: 5'-CTGGGTATCCTGATGTGC--3' (Reverse primer)
- [0175] CCND1:
- [0176] 서열번호 25: 5'-AAAATCGTGGCCACCTGGAT-3' (Forward primer)

- [0177] 서열번호 26: 5'-CATCCGCCTCTGGCATTG-3' (Reverse primer)
- [0178] 또한, RT-PCR에 의하여 측정된 mRNA 발현량을 토대로, 대조군 대비 키레놀 처리에 의한 상대적인 mRNA 발현량을 계산하였다.
- [0179] 도 6에 나타난 바와 같이 키레놀 처리에 따라 Wnt/ β -카테닌 신호전달계 주요 유전자인 LRP5, DVL2, β -카테닌, 및 CCND1의 mRNA 발현이 통계학적으로 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). 따라서 키레놀 처리로 인해 MC3T3-E1 조골세포 내에서 Wnt/ β -카테닌 신호전달계 활성이 촉진됨을 확인하였다.
- [0180] **[실시예 6] 회침 추출물 처리에 의한 조골세포 분화 증진 및 파골세포 생성 억제 효과**
- [0181] [실시예 6-1] 시게스베키아 글라브레센스 에탄올 추출물, 시게스베키아 푸베센스 에탄올 추출물, 시게스베키아 오리엔탈리스 에탄올 추출물의 조골세포 분화 유전자 발현 증가 효과
- [0182] 상기 실시예 1-1, 2-1, 3-1에서 제조한 시게스베키아 글라브레센스 에탄올 추출물, 시게스베키아 푸베센스 에탄올 추출물, 시게스베키아 오리엔탈리스 에탄올 추출물을 각각 10 ppm 농도로 처리하여 MC3T3-E1 조골세포에서 조골세포 내 분화에 관여하는 주요 유전자 ALP, Col1A1, OCN 및 OPN의 mRNA 발현량을 알아보기 위해 상기 실시예 5-1과 동일한 방법으로 분화 후 다음의 프라이머를 추가하여 RT-PCR을 수행하였다:
- [0183] OCN:
- [0184] 서열번호 27: 5'-CTGAGTCTGACAAAGCCTTC-3' (Forward primer)
- [0185] 서열번호 28: 5'-GCTGCTGTGACATCCATACTGC-3' (Reverse primer)
- [0186] 그 결과 도 7에 나타난 바와 같이 시게스베키아 글라브레센스 에탄올 추출물, 시게스베키아 푸베센스 에탄올 추출물, 시게스베키아 오리엔탈리스 에탄올 추출물 처리에 의해 조골세포 내 분화에 관여하는 주요 유전자 ALP, Col1A1, OCN 및 OPN의 mRNA 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 따라서 시게스베키아 글라브레센스 에탄올 추출물, 시게스베키아 푸베센스 에탄올 추출물, 시게스베키아 오리엔탈리스 에탄올 추출물처리로 인해 MC3T3-E1 조골세포 내에서 분화가 촉진되어 뼈 형성이 촉진됨을 확인하였다.
- [0187] [실시예 6-2] 시게스베키아 글라브레센스 에탄올 추출물, 시게스베키아 푸베센스 에탄올 추출물, 시게스베키아 오리엔탈리스 에탄올 추출물의 파골세포 생성을 억제하는 OPG의 발현 효과
- [0188] 상기 실시예 1-1, 2-1, 3-1에서 제조한 시게스베키아 글라브레센스 에탄올 추출물, 시게스베키아 푸베센스 에탄올 추출물, 시게스베키아 오리엔탈리스 에탄올 추출물을 각각 10 ppm 농도로 처리하여 MC3T3-E1 조골세포에서 파골세포 생성을 억제하는 OPG의 mRNA 발현량을 알아보기 위해 상기 실시예 5-4와 동일한 방법으로 분화 후 RT-PCR을 수행하였다.
- [0189] 그 결과 도 8에 나타난 바와 같이 시게스베키아 글라브레센스 에탄올 추출물, 시게스베키아 푸베센스 에탄올 추출물, 시게스베키아 오리엔탈리스 에탄올 추출물 처리에 의해 조골세포에서 파골세포 생성을 억제하는 OPG의 mRNA 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 시게스베키아 글라브레센스 에탄올 추출물, 시게스베키아 푸베센스 에탄올 추출물, 시게스베키아 오리엔탈리스 에탄올 추출물처리로 인해 MC3T3-E1 조골세포 내에서 파골세포 생성을 억제하는 OPG의 발현을 조절하여 파골세포의 생성을 억제하는 기능을 갖고 있음을 의미한다.
- [0190] [실시예 6-3] 시게스베키아 오리엔탈리스의 메탄올 추출물, 열수 추출물, 에틸아세테이트 추출물의 조골세포 분화 증가 효과
- [0191] 상기 실시예 3-2 내지 3-4에서 제조한 시게스베키아 오리엔탈리스의 메탄올 추출물, 열수 추출물, 에틸아세테이트 추출물을 각각 10 ppm 농도로 처리하여 MC3T3-E1 조골세포에서 조골세포 내 분화에 관여하는 주요 유전자 ALP 및 Col1A1의 mRNA 발현량을 알아보기 위해 상기 실시예 5-1과 동일한 방법으로 분화 후 RT-PCR을 수행하였다.
- [0192] 그 결과 도 9에 나타난 바와 같이 시게스베키아 오리엔탈리스의 메탄올 추출물, 열수 추출물, 에틸아세테이트

추출물 처리에 의해 조골세포 내 분화에 관여하는 주요 유전자 ALP 및 Col1A1의 mRNA 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 따라서 시게스벙키아 오리엔탈리스의 메탄올 추출물, 열수 추출물, 에틸아세테이트 추출물 처리로 인해 MC3T3-E1 조골세포 내에서 분화가 촉진되어 뼈 형성이 촉진됨을 확인하였다.

[0193] [실시예 7] 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물 처리에 의한 조골세포 분화 증진 및 파골세포 생성 억제 효과

[0194] [실시예 7-1] 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물의 조골세포 분화 증가

[0195] 상기 실시예 3-5에서 제조한 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물을 10, 20, 그리고 40 ppm 농도로 처리하여 상기 실시예 5-1과 동일한 방법으로 분화 후 실시예 6-1과 동일한 방법으로 RT-PCR을 수행하였다. 또한, RT-PCR에 의하여 측정된 mRNA 발현량을 토대로, 대조군 대비 키레놀 처리에 의한 상대적인 mRNA 발현량을 계산하였다.

[0196] 그 결과 도 10에 나타난 바와 같이 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물 처리에 의해 조골세포 내 분화에 관여하는 주요 유전자 ALP, Col1A1, OCN 및 OPN의 mRNA 발현이 통계학적으로 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). 이는 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물 처리로 인해 MC3T3-E1 조골세포 내에서 분화가 촉진되어 뼈 형성이 촉진됨을 의미한다.

[0197] [실시예 7-2] 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물의 조골세포 초기분화 마커인 알칼라인 포스파타제 (alkaline phosphatase, ALP)의 활성 증가 효과

[0198] 상기 실시예 3-5에서 제조한 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물을 10, 20, 그리고 40 ppm 농도로 처리하여 상기 실시예 5-1과 동일한 방법으로 분화 후 상기 실시예 5-2와 동일한 방법으로 ALP 활성을 측정하였다. 그 결과 도 11에 나타난 바와 같이 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물은 ALP 활성을 농도 의존적으로 증가시켰고 대조군과 비교하였을 때 유의적인 차이를 보였다 (** $p < 0.01$). 이는 본 발명의 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물이 조골세포 초기 분화 마커인 ALP 활성을 증가시킴으로써 조골세포 분화를 촉진하는 능력이 우수하다는 것을 의미한다.

[0199] [실시예 7-3] 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물의 조골세포 무기질화 증진효과

[0200] 상기 실시예 3-5에서 제조한 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물을 10, 20, 그리고 40 ppm 농도로 처리하여 상기 실시예 5-1과 동일한 방법으로 분화 후 상기 실시예 5-3와 동일한 방법으로 무기질화를 측정하였다. 그 결과 도 12에 나타난 바와 같이 대조군과 비교하여 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물 처리에 의하여 조골 세포의 무기질화가 통계학적으로 유의하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다 (** $p < 0.01$). 이는 본 발명의 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물이 조골 세포의 분화를 촉진시켜 무기질화를 증진시키는 활성을 갖고 있음을 의미한다.

[0201] [실시예 7-4] 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물의 파골세포 생성을 억제하는 OPG, RANKL의 발현 효과

[0202] 상기 실시예 3-5에서 제조한 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물을 10, 20, 그리고 40 ppm 농도로 처리하여 상기 실시예 5-1과 동일한 방법으로 분화 후 상기 실시예 5-4와 동일한 방법 RT-PCR을 수행하였다. 또한, RT-PCR에 의하여 측정된 mRNA 발현량을 토대로, 대조군 대비 키레놀 처리에 의한 상대적인 mRNA 발현량을 계산하였다.

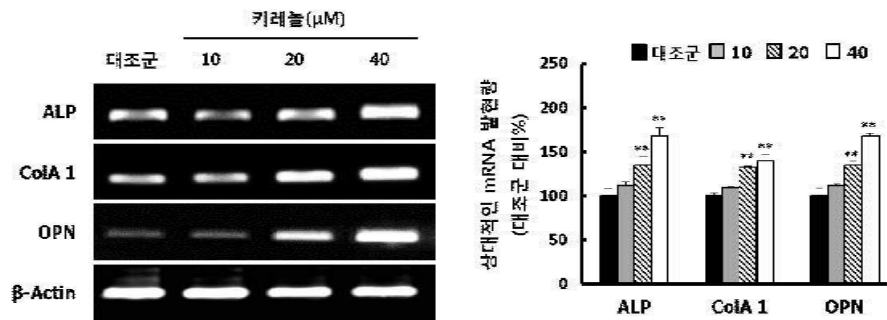
[0203] 그 결과 도 13에 나타난 바와 같이 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물 처리에 따라 파골세포 생성을 억제하는 OPG의 mRNA 발현이 통계학적으로 유의하게 증가하고 RANKL의 mRNA 발현이 통계학적으로 유의하게 감소한 것을 확인할 수 있었다 (** $p < 0.01$). 따라서 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물 처리로 인해 MC3T3-E1 조골세포 내에서 파골세포 생성을 억제하는 OPG와 RANKL의 발현을 조절하여 파골세포의 생성을 억제하는 기능을 갖고 있음을 의미한다.

- [0204] [실시예 7-5] 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물의 골형성 단백질 신호전달계 활성 촉진 효과
- [0205] 상기 실시예 3-5에서 제조한 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물을 10, 20, 그리고 40 ppm 농도로 처리하여 상기 실시예 5-1과 동일한 방법으로 분화 후 상기 실시예 5-5와 동일한 방법 RT-PCR을 수행하였다. 또한, RT-PCR에 의하여 측정된 mRNA 발현량을 토대로, 대조군 대비 키레놀 처리에 의한 상대적인 mRNA 발현량을 계산하였다.
- [0206] 그 결과 도 14에 나타낸 바와 같이 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물 처리에 따라 골형성 단백질 신호전달계 주요 유전자인 BMP2, Runx2, Osx의 mRNA 발현이 통계학적으로 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다 (**p<0.01). 따라서 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물 처리로 인해 MC3T3-E1 조골세포 내에서 골형성 단백질 신호전달계 활성이 촉진됨을 확인하였다.
- [0207] [실시예 7-6] 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물의 Wnt/ β -카테닌 신호전달계 활성 촉진 효과
- [0208] 상기 실시예 3-5에서 제조한 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물을 10, 20, 그리고 40 ppm 농도로 처리하여 상기 실시예 5-1과 동일한 방법으로 분화 후 상기 실시예 5-6와 동일한 방법 RT-PCR을 수행하였다. 또한, RT-PCR에 의하여 측정된 mRNA 발현량을 토대로, 대조군 대비 키레놀 처리에 의한 상대적인 mRNA 발현량을 계산하였다.
- [0209] 그 결과 도 15에 나타낸 바와 같이 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물 처리에 따라 Wnt/ β -카테닌 신호전달계 주요 유전자인 LRP5, DVL2, β -카테닌, 및 CCND1의 mRNA 발현이 통계학적으로 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다 (*p<0.05, **p<0.01). 따라서 시게스벙키아 오리엔탈리스 초고압 추출물 처리로 인해 MC3T3-E1 조골세포 내에서 Wnt/ β -카테닌 신호전달계 활성이 촉진됨을 확인하였다.
- [0210] 이하, 본 발명에 따른 키레놀 또는 이를 함유하는 시게스벙키아 오리엔탈리스 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방, 치료 또는 개선용 식품류 및 의약품의 제조예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다. 상기 골다공증 예방, 치료 또는 개선 효과가 우수한 키레놀 또는 이를 함유하는 시게스벙키아 오리엔탈리스 추출물을 가지고 하기와 같은 조성성분 및 조성비에 따라 제조예 1 내지 2의 골다공증 예방, 개선 또는 치료용 식품 및 의약품 조성물을 통상적인 방법에 따라서 제조하였다.
- [0211] [제조예 1] 식품의 제조
- [0212] [제조예 1-1] 건강식품의 제조
- [0213] 상기 실시예 1내지 3의 회침 추출물 또는 키레놀 1000 mg, 비타민 A 아세테이트 70 ug, 비타민 E 1.0 mg, 비타민 B1 0.13 mg, 비타민 B2 0.15 mg, 비타민 B6 0.5 mg, 비타민 B12 0.2 ug, 비타민 C 10 mg, 비오틴 10 ug, 니코틴산아미드 1.7 mg, 엽산 50 ug, 판토텐산 칼슘 0.5 mg, 황산제1철 1.75 mg, 산화아연 0.82 mg, 탄산마그네슘 25.3 mg, 제1인산칼슘 15 mg, 제2인산칼슘 55 mg, 구연산칼슘 90 mg, 탄산칼슘 100 mg, 염화마그네슘 24.8 mg를 혼합하여 제조할 수 있으며, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.
- [0214] [제조예 1-2] 건강음료의 제조
- [0215] 상기 실시예 1내지 3의 회침 추출물 또는 키레놀 1000 mg, 구연산 1000 mg, 올리고당 100 g, 매실농축액 2 g, 타우린 1 g에 정제수를 가하여 전체 900 ml 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1 시간동안 85에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 L용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 건강음료 조성물 제조에 사용할 수 있다.
- [0216] [제조예 1-3] 츄잉껌

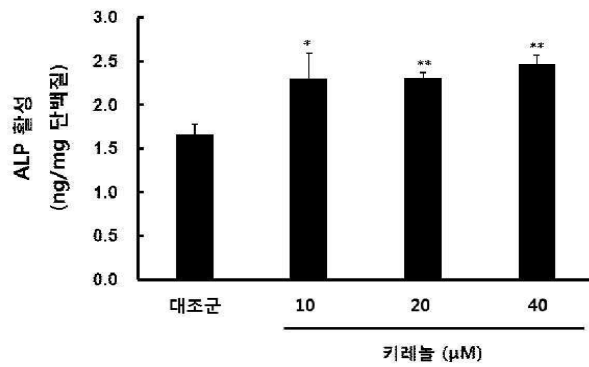
- [0217] 껌 베이스 20 중량%, 설탕 76.9 중량%, 향료 1 중량% 및 물 2 중량% 와 상기 실시예 1내지 3의 희침 추출물 또는 키레놀 0.1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 츄잉껌을 제조하였다.
- [0218] [제조예 1-4] 캔디
- [0219] 설탕 60 중량%, 물엿 39.8 중량% 및 향료 0.1 중량%와 상기 실시예 1내지 3의 희침 추출물 또는 키레놀 0.1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 캔디를 제조하였다.
- [0220] [제조예 1-5] 비스킷
- [0221] 박력 1급 25.59 중량%, 중력 1급 22.22 중량%, 정백당 4.80 중량%, 식염 0.73 중량%, 포도당 0.78 중량%, 팜쇼트닝 11.78 중량%, 압모늄 1.54 중량%, 중조 0.17 중량%, 중아황산나트륨 0.16 중량%, 쌀가루 1.45 중량%, 비타민 B 0.0001 중량%, 밀크향 0.04 중량%, 물 20.6998 중량%, 전지분유 1.16 중량%, 대용분유 0.29 중량%, 제1인산칼슘 0.03 중량%, 살포염 0.29 중량% 및 분무유 7.27 중량%와 상기 실시예 1내지 3의 희침 추출물 또는 키레놀 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 비스킷을 제조하였다.
- [0222] [제조예 2] 의약품의 제조
- [0223] [제조예 2-1] 산제
- [0224] 상기 실시예 1내지 3의 희침 추출물 또는 키레놀 50 mg, 결정셀룰로오즈 2 g을 혼합한 후 통상의 산제 제조방법에 따라서 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.
- [0225] [제조예 2-2] 정제
- [0226] 상기 실시예 1내지 3의 희침 추출물 또는 키레놀 50 mg, 결정셀룰로오즈 400 mg, 스테아린산 마그네슘 5 mg을 혼합한 후 통상의 정제 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- [0227] [제조예 2-3] 캡슐제
- [0228] 상기 실시예 1내지 3의 희침 추출물 또는 키레놀 30 mg, 유청단백질 100 mg, 결정셀룰로오즈 400 mg, 스테아린산 마그네슘 6 mg을 혼합한 후 통상의 캡슐제 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0229] [제조예 2-4] 주사제
- [0230] 통상의 주사제 제조방법에 따라 활성성분을 주사용 증류수에 용해하고 pH를 약 7.5로 조절한 다음 상기 실시예 1내지 3의 희침 추출물 또는 키레놀 100 mg, 주사용 증류수, pH 조절제를 혼합하여 2 ml 용량의 앰플에 충전하고 멸균시켜서 주사제를 제조하였다.

도면

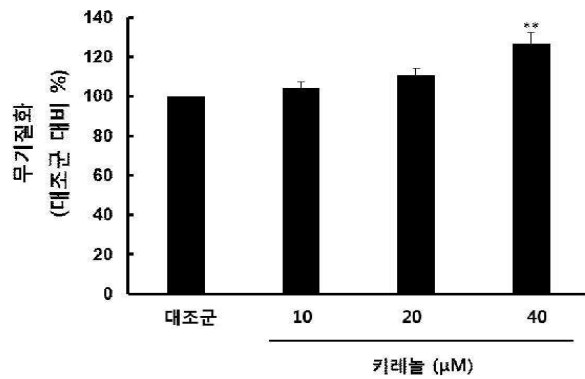
도면1



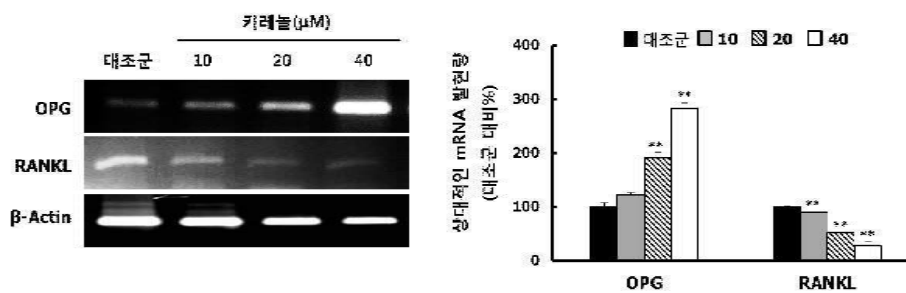
도면2



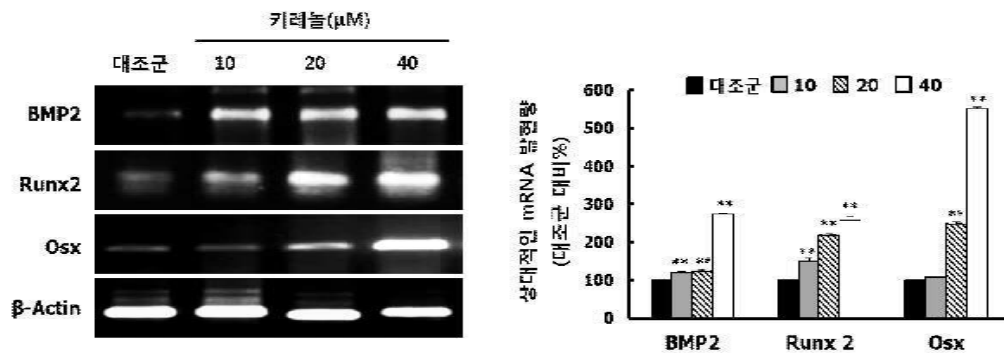
도면3



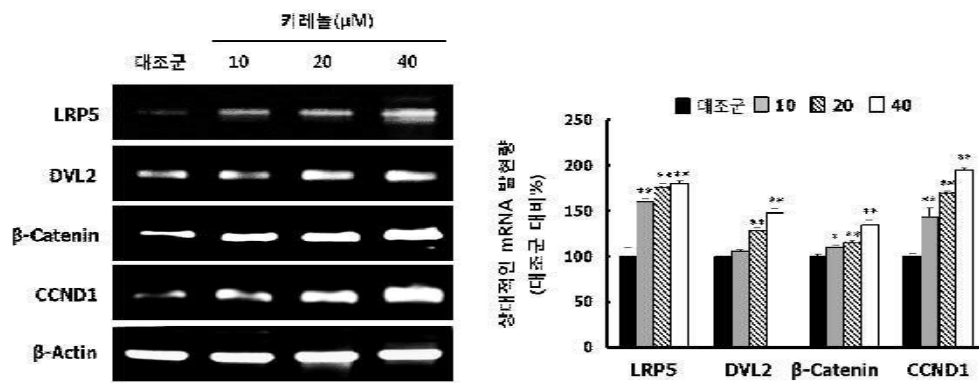
도면4



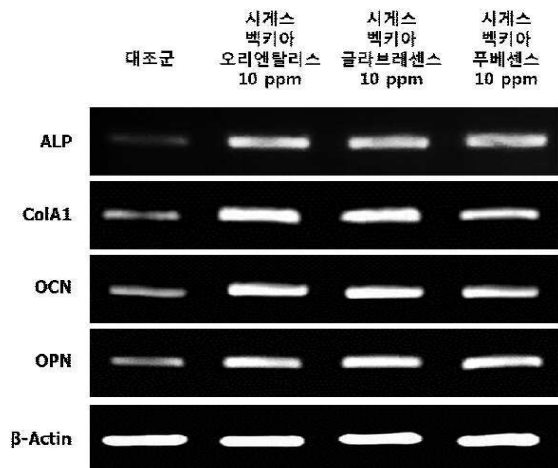
도면5



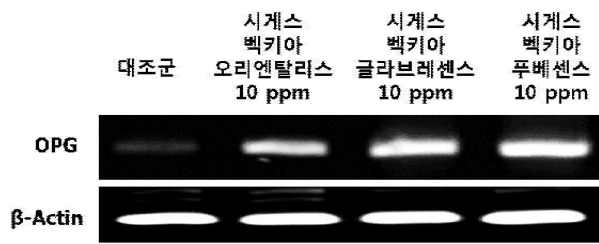
도면6



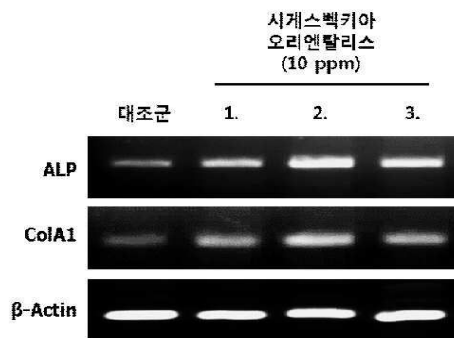
도면7



도면8

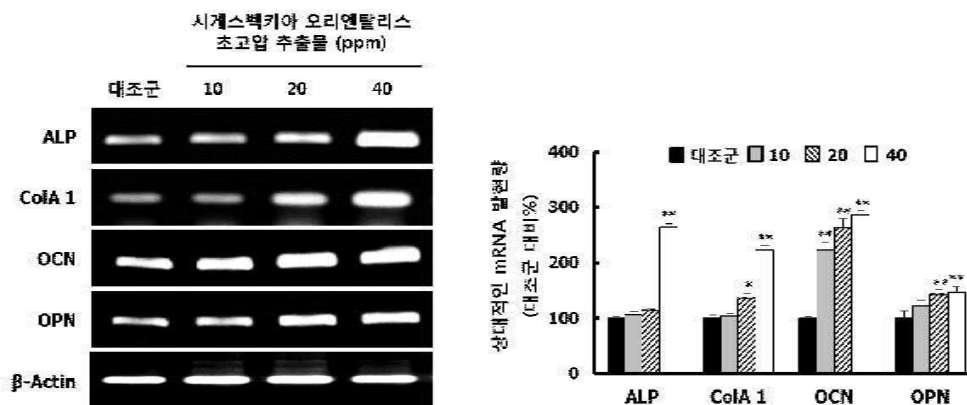


도면9

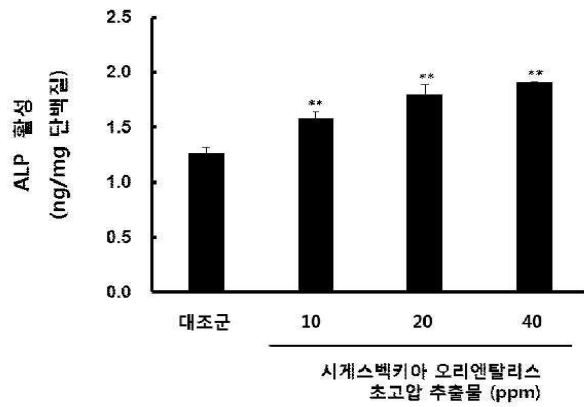


1. 메탄올 추출물 (MeOH extract)
2. 열수 추출물 (Water extract)
3. 에틸아세테이트 추출물 (Ethyl acetate extract)

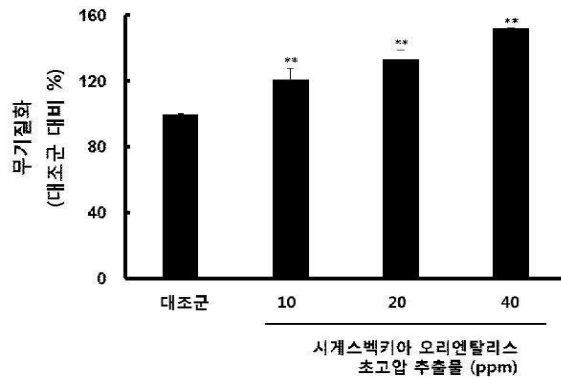
도면10



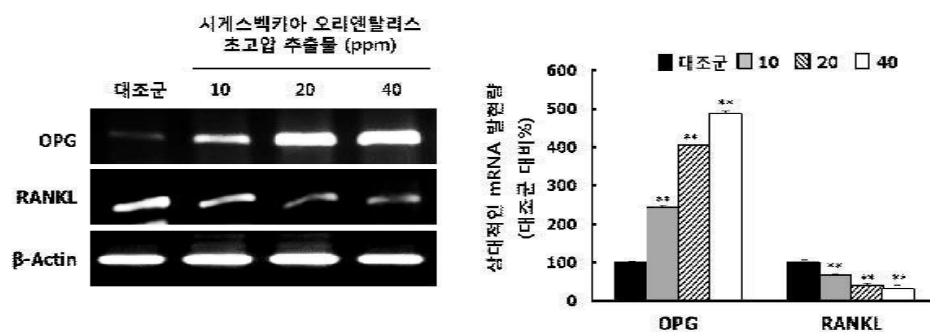
도면11



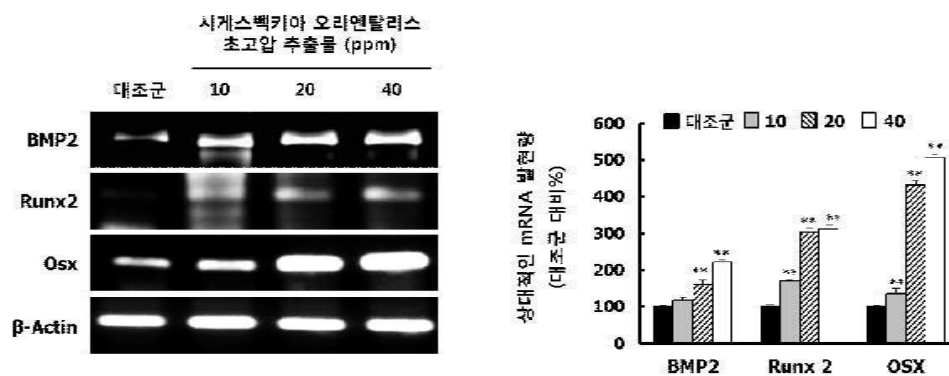
도면12



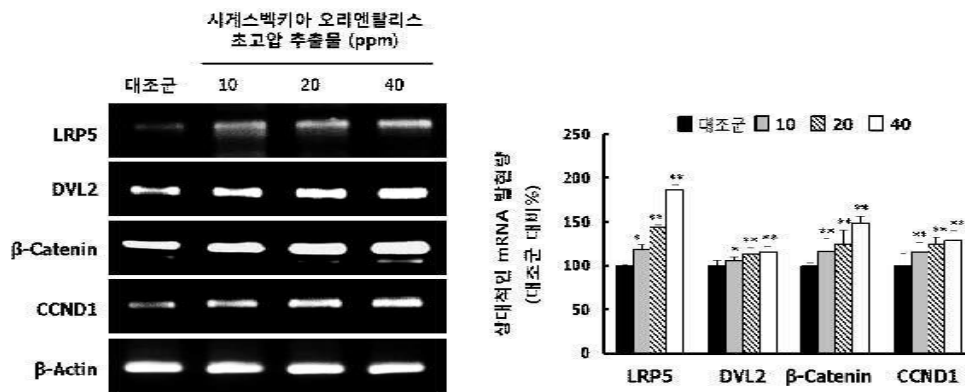
도면13



도면14



도면15



서열 목록

<110> University-Industry Foundation, Yonsei University

<120> Composition for prevention, improvement or treatment of
osteoporosis comprising kirenol or extract of Sigesbeckia spp.

<130> P14U16C0906

<150> 2013-0084905

<151> 2013-07-18

<160> 28

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta-actin forward primer

<400> 1

agccatgtac gtagccatcc

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta-actin reverse primer

<400> 2

ctctcagctg tgggtggtgaa

20

<210> 3

<211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ALP forward primer
 <400> 3
 ccatggtaga ttacgctcac a 21
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ALP reverse primer

 <400> 4
 atggaggatt ccagatacag g 21
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ColA1 forward primer
 <400> 5
 actcagccgt ctgtgcctca 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ColA1 reverse primer
 <400> 6
 ggaggcctcg gtggacatta 20
 <210> 7
 <211
 > 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> OPN forward primer
 <400> 7
 gaccacatgg acgacgatg 19

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> OPN reverse primer
 <400> 8
 tggaacttgc ttgactatcg a 21
 <210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RANKL forward primer
 <400> 9
 cgctctgttc ctgtactttc gagcg 25
 <210> 10
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RANKL reverse primer
 <400> 10
 tcgtgctccc tcctttcatc aggtt 25
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> OPG forward primer
 <400> 11
 aaagcaccct gtataaaaca 20
 <210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> OPG reverse primer

<400> 12
ccgttttatac ctctctacac tc 22
<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> BMP forward primer
<400> 13
ccaagacaca gttccctaca 20
<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> BMP reverse primer
<400> 14
cacggcttct agttgatgga 20
<210> 15
<211>
> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Runx2 forward primer
<400> 15
gccgggaatg atgagaacta 20
<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Runx2 reverse primer
<400> 16
tggggaggat ttgtgaagac 20
<210> 17
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Osx forward primer
 <400> 17

cttcccaatc ctatttgccg ttt 23
 <210> 18
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Osx reverse primer
 <400> 18

cggccaggtt actaacacca atct 24
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LRP5 forward primer
 <400> 19

aagggtgctg tgtactggac 20
 <210> 20
 <211> 21
 <
 212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LRP5 reverse primer
 <400> 20

agaagagaac cttacgggac g 21
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DVL2 forward primer
 <400> 21

gcttcacat ggccatgggc 20
 <210> 22
 <211> 24

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	DVL2 reverse primer	
<400>	22	
	tggcactgct ggtgagagtc acag	24
<210>	23	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta-catenin forward primer	
<400>	23	
	gcccaagtggg tggatatagag	20
<210>	24	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta-catenin reverse primer	
<400>	24	
	ctgggtatcc tgatgtgc	18
<210>	25	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CCND1 forward primer	
<400>	25	
	aaaatcgtgg ccacctggat	20
<210>	26	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CCND1 reverse primer	
<400>	26	
	catccgctc tggcattttg	20

<210>	27	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	OCN forward primer	
<400>	27	
	ctgagtcctga caaagccttc	20
<210>	28	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	OCN reverse primer	
<400>	28	
	gctgctgtga catccatact tgc	23