



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0083000
(43) 공개일자 2022년06월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/40 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)

A61P 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/40 (2013.01)

A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2020-0172525

(22) 출원일자 2020년12월10일

심사청구일자 2020년12월10일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

정우진

경기도 성남시 분당구 판교원로 7, 403동 2401호 (운중동, LIG건영아파트)

김남영

서울특별시 마포구 회우정로 100-1, 302호 (망원동, 리빙텔)

(74) 대리인

이원희

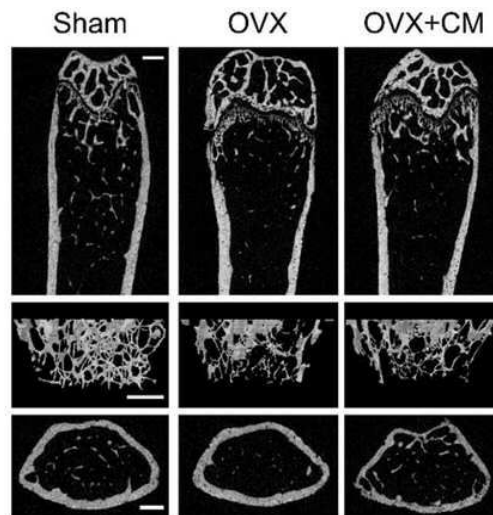
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **클레마스틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 클레마스틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 클레마스틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 파골세포 분화와 관련된 중요한 인자들을 억제함으로써, 파골세포의 분화를 억제하여 골 흡수를 저해하는 효과가 있는 바, 파골세포의 불균형에 의하여 유발되는 골 관련 질환을 치료할 수 있으므로, 골 관련 질환의 예방 또는 치료제 개발에 널리 활용될 수 있다.

대표도 - 도34



(52) CPC특허분류

A61P 19/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/306 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711113673
과제번호	2019R1A5A6099645
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	세포항상성연구센터
기 여 율	50/100
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711113993
과제번호	2017R1A2B2012435
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	p190RhoGEF의 파골세포 분화 및 기능 조절기전 연구
기 여 율	50/100
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

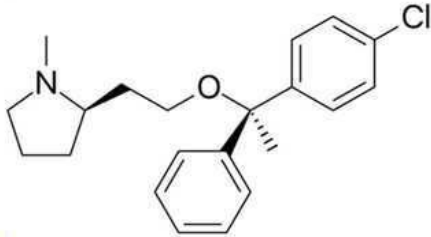
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 기재되는 클레마스틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는, 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 클레마스틴은 0.1 내지 10 μ M 농도인 것을 특징으로 하는, 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 NFATc1, Acp5, Mmp9, Ctsk, Dcstamp, c-FOS, SOD, JNK, ERK2, Src 및 caveolin-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나 이상의 발현 또는 활성을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 염증에 의한 골 손상을 억제하는 것을 특징으로 하는, 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

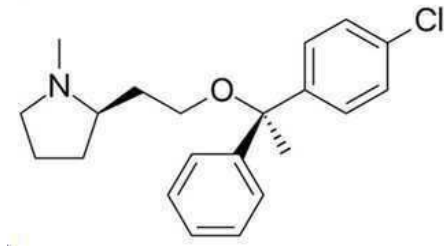
제1항에 있어서,

상기 골질환은 성장기 발육부진, 골절, 과도한 파골세포의 골 흡수에 의한 골다공증(osteoporosis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 치주질환(periodontal disease), 파제트병(Paget disease) 및 전이성 골암(metastatic bone cancers)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

하기 화학식 1로 기재되는 클레마스틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는, 골질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물:

[화학식 1]



청구항 7

제6항에 있어서,

상기 클레마스틴은 0.1 내지 10 μ M 농도인 것을 특징으로 하는, 골질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 조성물은 NFATc1, Acp5, Mmp9, Ctsk, Destamp, c-FOS, SOD, JNK, ERK2, Src 및 caveolin-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나 이상의 발현 또는 활성을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 골질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 조성물은 염증에 의한 골 손상을 억제하는 것을 특징으로 하는, 골질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 골질환은 성장기 발육부진, 골절, 과도한 파골세포의 골 흡수에 의한 골다공증(osteoporosis), 류마티스관절염(rheumatoid arthritis), 치주질환(periodontal disease), 파제트병(Paget disease) 및 전이성 골암(metastatic bone cancers)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 골질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 클레마스틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 대표적인 대사성 골 질환인 골다공증(osteoporosis)은 골 조직의 석회화 감소되어 뼈의 치밀질이 얇아지고 그로 인해 골수강(骨髓腔)이 넓어지게 되는 질환으로, 증세가 진전됨에 따라 뼈가 약해지기 때문에 작은 충격에도 골절되기 쉽다.
- [0004] 골다공증은 골량의 감소와 미세구조의 이상을 특징으로 갖는데, 노화가 진행되면서 낡은 뼈의 흡수와 새로운 뼈의 형성 사이에 균형이 무너져 새로운 뼈의 대체(bone remodeling)가 원활히 이루어지지 않아 뼈가 영성해지고, 부러지거나 부서질 위험성이 커지게 된다. 이러한 골량은 유전적 요인, 영양 섭취, 호르몬의 변화, 운동 및 생활 습관의 차이 등 여러 가지 요인들에 의해 영향을 받으며, 노령, 운동 부족, 저체중, 흡연, 저칼슘 식이, 폐경, 난소 절제 등이 골량 감소의 주요한 원인이다.
- [0005] 한편, 개인차는 있지만 대개 골량은 14~18세에 가장 높고 노후에는 1년에 약 1%씩 감소한다. 특히, 여성의 경우 30세 이후부터 골 감소가 지속적으로 진행되며, 폐경기에 이르면 호르몬 변화에 의해 골 감소가 급격히 진행된다. 즉, 폐경기에 이르면 에스트로겐 농도가 급속히 감소하는데, 이때, IL-7(interleukin-7)에 의한 것처럼 B-림프구(B-lymphocyte)가 다량 생성되어 골수(bone marrow)에 B 세포 전구체(pre-B cell)가 축적되고, 이로 인해 IL-6의 양이 증가하여 파골세포의 활성을 증가시키므로 결국 골량이 감소하게 된다.
- [0006] 이와 같이, 골다공증은 정도에 차이는 있으나 노년층, 특히 폐경기 이후의 여성에게 있어서는 피할 수 없는 증상으로, 선진국에서는 인구가 노령화됨에 따라 골다공증 및 그 치료제에 대한 관심이 점차 증가하고 있다. 또한, 전 세계적으로 골질환 치료와 관련되어 약 1,300억 달러의 시장이 형성되어 있으며, 앞으로 더 증가할 것으로 예상되기 때문에 세계적인 각 연구 기관과 제약회사에서는 골질환 치료제 개발에 많은 투자를 하고 있다.
- [0007] 국내에서도 근래에 평균수명이 80세에 육박하면서 골다공증 유병률이 급격하게 증가하고 있는데, 최근 지역 주민을 대상으로 실시된 연구에 의하면 전국 인구로 표준화하였을 경우 남성의 4.5%, 여성의 19.8%가 골다공증을 갖고 있다고 보고되었다. 이는 골다공증이 당뇨병이나 심혈관계 질환보다 더 흔한 질환이며, 골절로 인해 받는 환자들의 고통이나 치료를 위해 들어가는 비용을 추정할 때 골다공증은 매우 중요한 보건 문제임을 시사한다.
- [0009] 지금까지 여러 물질이 골다공증 치료제로 개발되었다. 그 중 골다공증 치료제로 가장 많이 사용되는 에스트로겐은 그 실제적인 효능이 아직 검증되지 않은 상태이며 생애 동안 계속 복용해야 하는 단점이 있으며, 장기간 투여하는 경우 유방암이나 자궁암이 증가하는 부작용이 있다. 알렌드로네이트(alendronate)도 그 효능이 명확하지 않고 소화관에서의 흡수가 더디며 위장과 식도점막에 염증을 유발하는 문제가 있다. 칼슘제제는 부작용이 적으면서도 효과가 우수한 것으로 알려져 있지만 치료제라기보다는 예방제에 해당한다. 그 외에 칼시토닌과 같은 비타민 D 제제가 알려져 있으나 아직 효능 및 부작용에 대한 연구가 충분히 되어있지 않은 상태이다. 이에, 부작용이 적고 효과가 우수한 새로운 대사성 골 질환 치료제가 요구되고 있는 실정이다.
- [0011] 파골세포는 척추동물의 뼈가 성장하는 과정에서 불필요하게 된 뼈조직을 파괴 또는 흡수하는 대형의 다핵세포로써, 파골세포 전구체(osteoclast precursor)로부터 분화되는 세포이다. 파골세포 전구세포들은 M-CSF 및 RANKL(Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)존재 하에서 파골세포로 분화되며, 융합을 통해 다핵 파골세포(multinucleated osteoclast)를 형성한다. 파골세포는 $\alpha\text{v}\beta 3$ 인테그린(integrin)등을 통해 골에 결합하며 산성 환경을 조성하는 한편 각종 콜라게네이즈(collagenase) 및 프로테아제(protease)를 분비하여 골 흡수(bone resorption)를 일으키는데, 이러한 파골세포의 역제는 골질환 치료의 효과적인 방법이 될 수 있다.
- [0013] 한편, 클레마스틴은 메클라스틴으로도 알려진 1세대 항히스타민제(selective histamine H1 antagonist)로서, 1967년 의료용으로 승인된 약물이나, 본 발명의 파골세포 분화 조절 효과 및 골질환 치료용도는 현재까지 알려진 바가 없다.
- [0015] 이에 본 발명자들은, 골질환을 치료하기 위한 새로운 물질을 찾고자 파골세포의 활성을 억제하는 물질을 탐색하던 중, 클레마스틴이 파골세포에 의한 골 흡수를 저해하고 파골세포 형성을 억제함을 규명하여, 클레마스틴이 골질환 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0017] 본 발명의 목적은 골다공증, 류마티스 관절염 등과 같은 과도한 파골세포 수나 활동에 의해 유발되는 골질환을 예방 또는 치료할 수 있는 신규 약물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0019] 상기 목적을 달성하기 위하여,
- [0020] 본 발명은 클레마스틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다,
- [0021] 아울러, 본 발명은 클레마스틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명의 클레마스틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 파골세포 분화와 관련된 중요한 인자들을 억제함으로써, 파골세포의 분화를 억제하여 골 흡수를 저해하는 효과가 있는 바, 파골세포의 불균형에 의하여 유발되는 골 관련 질환을 치료할 수 있으므로, 골 관련 질환의 예방 또는 치료제 개발에 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 10, 15 또는 20 μ M 농도에서 CM(클레마스틴)의 흡광도 스펙트럼이다.
- 도 2는 CM(클레마스틴)의 몰 흡광 계수를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 파골세포 전구세포(BMMs)를 M-CSF(40ng/ml) 및 RANKL(50ng/ml)과 함께 3일 및 4일 동안 0, 1, 2, 3 또는 4 μ M 농도에서 CM(클레마스틴)의 존재하에 배양하고 TRAP으로 염색 한 후 광학 현미경으로 관찰한 사진이다(스케일바 100 μ m).
- 도 4는 파골세포 전구세포(BMMs)를 M-CSF(40ng/ml) 및 RANKL(50ng/ml)과 함께 3일 및 4일 동안 0, 1, 2, 3 또는 4 μ M 농도에서 CM(클레마스틴)의 존재하에 배양하고 TRAP으로 염색 한 후 웰당 MNC(multinucleated cell)를 계수하여 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 클레마스틴의 농도별 세포독성 분석(M: M-CSF/ M+R: M-CSF 및 RANKL) 그래프이다(WST-1 시약을 사용하여 세포 생존률 분석, 양성 대조군에 대한 샘플의 450nm에서의 흡광도에 기초하여 계산).
- 도 6은 RANKL(50ng/ml) 존재 또는 부재 하에 0, 1, 2, 3 또는 4 μ M 농도의 CM(클레마스틴) 처리 후 NFATc1에 대한 항체를 사용한 면역블롯팅 분석 결과이다.
- 도 7은 RANKL(50ng/ml) 존재 하에 3 μ M CM(클레마스틴) 처리한 실험군과 그렇지 않은 대조군의 0, 1, 2, 3 또는 4 일 경과 시점에 NFATc1에 대한 항체를 사용한 면역블롯팅 분석 결과이다.
- 도 8은 RANKL(50ng/ml) 존재 하에 3 μ M CM(클레마스틴) 처리한 실험군과 그렇지 않은 대조군의 NFATc1, Acp5, Mmp9, Ctsk, Calcr 및 Dcstamp 타깃 유전자의 mRNA 수준을 RT-PCR 정량하여 나타낸 그래프이다.
- 도 9는 파골세포 전구세포(BMMs)를 3 μ M 농도의 CM(클레마스틴) 존재 또는 부재하에 RANKL(50ng/ml)과 함께 4일 내지 5일 동안 배양하고, 히스타민을 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 50 μ M 농도로 배양 배지에 처리하여, TRAP 염색 후 광학 현미경으로 관찰한 사진이다.

도 10은 파골세포 전구세포(BMMs)를 3 μ M 농도의 CM(클레마스틴)존재 또는 부재하에 RANKL(50ng/ml)과 함께 4일 내지 5일 동안 배양하고, 히스타민을 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 50 μ M 농도로 배양 배지에 처리하고, TRAP 염색 후 3개 이상의 핵을 포함하는 TRAP 양성 MNC를 계수하여 나타낸 그래프이다.

도 11은 3 μ M 농도의 CM(클레마스틴)존재 또는 부재하에 무처리, 히스타민 10 μ M 단독, RANKL(50ng/ml)단독, 히스타민 10 μ M 및 RANKL(50ng/ml)를 5분 또는 10분 동안 처리한 후, p-ERK, ERK2, p-AKT, AKT, p-CREB 및 CREB에 특이적인 항체를 사용한 면역블롯팅 분석 결과이다.

도 12는 NF- κ B reporter plasmid 또는 AP-1 reporter plasmid으로 형질감염 된 RAW264.7 세포를 3 μ M CM(클레마스틴)의 존재 또는 부재하에 24시간 동안 RANKL(50ng/ml)로 처리하여, CM(클레마스틴)에 의한 NF- κ B 및 AP-1 활성화 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

도 13은 파골세포 전구세포(BMMs)를 M-CSF(40ng/ml)의 존재하에 배양하고, RANKL(50ng/ml)을 처리하되, 3 μ M CM(클레마스틴)처리에 따른 c-fos 발현 변화를 관찰한 면역블롯팅 분석 결과이다

도 14는 파골세포 전구세포(BMMs)를 M-CSF(40ng/ml)의 존재하에 배양하고, RANKL(50ng/ml)을 처리하되, 3 μ M CM(클레마스틴)처리에 따른 Sod2 발현 변화를 관찰한 면역블롯팅 분석 결과이다.

도 15는 파골세포 전구세포(BMMs)를 M-CSF(40ng/ml)의 존재하에 배양하고, RANKL(50ng/ml)을 처리하되, 3 μ M CM(클레마스틴)처리에 따른 c-fos, Sod2, Cox2, I1-6 및 I1-1 β 의 발현 변화를 측정하여 그래프로 도시한 것이다.

도 16은 파골세포 전구세포(BMMs)를 M-CSF(40ng/ml)의 존재하에 배양하고, RANKL(50ng/ml)을 처리하되, 3 μ M CM(클레마스틴)처리와 시간에 따른 p-I κ B α 및 I κ B α 의 발현 변화를 확인한 면역블로팅 분석 결과이다.

도 17은 파골세포 전구세포(BMMs)를 M-CSF(40ng/ml)의 존재하에 배양하고, RANKL(50ng/ml)을 처리하되, 3 μ M CM(클레마스틴)처리와 시간에 따른 p-p65 및 p65의 발현 변화를 확인한 면역블로팅 분석 결과이다.

도 18은 파골세포 전구세포(BMMs)를 M-CSF(40ng/ml)의 존재하에 배양하고, RANKL(50ng/ml)및 3 μ M CM(클레마스틴)처리 여부에 따라 다른 각 세포를 p65와 DAPI로 염색한 후, 공초점 레이저 현미경으로 관찰한 사진이다(스케일 바 10 μ m).

도 19는 3 μ M CM(클레마스틴)처리 여부에 따른 p65의 핵 전자의 colocalization coefficient를 계측하여 나타낸 그래프이다.

도 20은 파골세포 전구세포(BMMs)를 M-CSF(40ng/ml)의 존재하에 배양하고, RANKL(50ng/ml)을 처리하되, 3 μ M CM(클레마스틴)처리와 시간에 따른 p-JNK, JNK 1, p-ERK, ERK2, p-p38 및 p38의 발현 변화를 확인한 면역블로팅 분석 결과이다.

도 21은 파골세포 전구세포(BMMs)를 M-CSF(40ng/ml)의 존재하에 배양하고, RANKL(50ng/ml)을 처리하되, 3 μ M CM(클레마스틴)처리와 시간에 따른 p-src, src, p-AKT, AKT, p-CREB 및 CREB의 발현 변화를 확인한 면역블로팅 분석 결과이다.

도 22는 파골세포 전구세포(BMMs)를 RANKL(50ng/ml)존재하에 3일 동안 배양한 다음, 파골세포 전구세포(BMMs)에서 분화 된 파골세포에 대하여 3 μ M CM(클레마스틴)을 24시간 또는 36시간 동안 처리한 후 나타난 양상을 TRAP 용액으로 염색하고 광학 현미경으로 관찰한 사진이다(스케일 바, 100 μ m).

도 23은 파골세포 전구세포(BMMs)에서 분화 된 파골세포에 대하여 3 μ M CM(클레마스틴)을 24시간 또는 36시간 동안 처리한 후 관찰 된 TRAP 양성 다핵 세포 (MNC)의 수를 계측하여 나타낸 그래프이다.

도 24는 파골세포 전구세포(BMMs)에서 분화 된 파골세포에 대하여 3 μ M CM(클레마스틴)처리 후 0, 6, 9, 18 및 24시간 경과에 따른 변화 양상을 광학 현미경으로 관찰한 사진이다(스케일 바, 100 μ m).

도 25는 파골세포 전구세포(BMMs)를 glass 상에서 RANKL(50ng/ml)존재하에 3일 동안 배양한 다음, 배양 3일 시점에 3 μ M CM(클레마스틴)을 12시간 동안 처리하고 Alexa Fluor 488-phalloidin 및 DAPI로 고정 및 염색 한 후 공 초점 레이저 현미경으로 관찰한 사진이다(스케일 바, 100 μ m).

도 26은 파골세포 전구세포(BMMs)를 dentin disc 상에서 RANKL(50ng/ml)존재하에 11일 동안 배양한 다음, 배양 시작(0일)또는 5일 시점에 3 μ M CM(클레마스틴)을 처리하고 헤마톡실린으로 염색함으로써 resorption pit area를 관찰한 사진(스케일 바, 200 μ m)과 이를 정량화 하여 나타낸 그래프이다.

도 27은 파골세포 전구세포(BMMs)에서 분화 된 파골세포에 대하여 3 μ M CM(클레마스틴)을 24시간 또는 36시간 동안 처리한 후 Cathepsin K 및 ATP6V0D2에 특이적인 항체를 사용한 면역블로팅 분석 결과이다.

도 28은 파골세포 전구세포(BMMs)에서 분화 된 파골세포에 대하여 3 μ M CM(클레마스틴)을 24시간 또는 36시간 동안 처리한 후 파골세포 성숙 및 기능에 관여하는 유전자인 ctsk, Atp6v0d2, Dcstamp 및 Mmp9의 mRNA 수준을 RT-PCR로 정량화 하여 나타낸 그래프이다.

도 29는 파골세포 전구세포(BMMs)에서 분화 된 파골세포에 대하여 3 μ M CM(클레마스틴)을 24시간 또는 36시간 동안 처리한 후 NFATc1, Integrin β 3, p130Cas 및 c-Src의 발현 변화를 확인한 면역블로팅 분석 결과이다.

도 30은 파골세포 전구세포(BMMs)에서 분화 된 파골세포에 대하여 3 μ M CM(클레마스틴)을 24시간 또는 36시간 동안 처리한 후 파골세포 성숙 및 기능에 관여하는 유전자인 itgb3, p130cas 및 Src의 발현 변화를 확인한 면역블로팅 분석 결과이다.

도 31은 파골세포 전구세포(BMMs)에서 분화 된 파골세포에 대하여 3 μ M CM(클레마스틴)을 24시간 또는 36시간 동안 처리한 후 Rac1-GTP 및 Rac1의 발현 변화를 확인한 면역블로팅 분석 결과이다.

도 32는 LPS 유도 골 파괴에 대한 CM(클레마스틴)의 억제 효과를 나타낸 것으로, LPS 단독 또는 LPS 및 CM 병용 처리 된 마우스 두개골에 대하여 TRAP 및 헤마톡실린 염색 후 공 초점 레이저 현미경으로 관찰한 사진이다(스케일 바, 100 μ m).

도 33은 LPS 단독 또는 LPS 및 CM 병용 처리 된 마우스 두개골에서 확인 된 골강 (왼쪽패널)및 TRAP 양성 파골세포 (오른쪽패널)를 정량화 하여 나타낸 그래프이다.

도 34는 난소 절제 마우스 (OVX model mice)에 CM (10 mg / kg)을 3 주 동안 일주일에 6 번 복강 내로 투여한 후 관측한 대퇴골의 대표적인 마이크로 CT 이미지이다(upper, sagittal; middle, three-dimensional reconstruction; bottom, transaxial; Scale bar, 0.5mm).

도 35는 난소 절제 마우스 (OVX model mice)에 CM (10 mg / kg)을 3 주 동안 일주일에 6 번 복강 내로 투여한 후 관측한 대퇴골의 조직 형태 학적 분석 결과이다(BMD, 골 무기질 밀도; BV/TV, 총 골량의 일부인 골량; Tb.N, trabecular 수; Tb.Th: trabecular 두께; BS/TV, 골 표면 밀도; Tb.pf, trabecular 패턴 계수).

도 36은 난소 절제 마우스 (OVX model mice)에 CM (10 mg / kg)을 3 주 동안 일주일에 6 번 복강 내로 투여하고 TRAP 및 헤마톡실린 염색 후 관측한 대퇴골 절편 사진이다(Scale bar: 40 $\times$ 100 μ m; 100 $\times$ 50 μ m).

도 37은 난소 절제 마우스 (OVX model mice)에 CM (10 mg / kg)을 3 주 동안 일주일에 6 번 복강 내로 투여하고 TRAP 및 헤마톡실린 염색 후, 성장판 아래의 TRAP 양성 세포의 영역을 측정하여 나타낸 그래프이다(OcS/BS: osteoclast surface to total volume).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

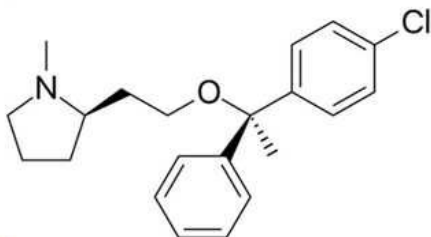
[0026]

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0028]

본 발명이 유효성분으로 함유하는 클레마스틴(Clemastine)은 하기 화학식 1로 기재되는 구조를 갖는다:

화학식 1



[0029]

[0030]

본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는

것을 특징으로 하는, 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [0031] 또한, 상기 조성물은 NFATc1, Acp5, Mmp9, Ctsk, Dcstamp, c-FOS, SOD, JNK, ERK2, Src 및 caveolin-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나 이상의 발현 또는 활성을 감소시킬 수 있다.
- [0032] 또한, 상기 조성물은 염증에 의한 골 손상을 억제할 수 있다. 상기 염증은 염증유도물질인 마우스 모델에 LPS(Lipopolysaccharide)를 주입하여 유도할 수 있다.
- [0033] 아울러, 본 발명의 조성물이 적용될 수 있는 골질환으로는 성장기 발육부진, 골절, 과도한 파골세포의 골 흡수에 의한 골다공증(osteoporosis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 치주질환(periodontal disease), 파제트병(Paget disease) 및 전이성 골암(metastatic bone cancers)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0034] 본 발명의 구체예에서, 상기 화학식 1로 기재되는 클레마스틴(Clemastine)이 RANKL에 의한 파골세포 전구세포(BMMs)의 분화를 효과적으로 억제함을 확인하였다(도 3, 도 4 및 도 5 참조). 또한 Clemastine을 처리하였을 때, 파골세포 분화에서 가장 중요하게 알려져 있는 transcription factor인 NFATc1 단백질과 그 타겟 유전자들인 Acp5, Mmp9, Ctsk 및 Dcstamp 유전자의 mRNA 발현이 억제되었다(도 6, 도 7 및 도 8 참조).
- [0035] 본 발명의 구체예에서, 클레마스틴(Clemastine)에 의한 파골세포 분화 억제에 대하여 히스타민이 미치는 영향을 조사한 결과, 히스타민 단독 처리에서는 파골세포 분화에 대하여 어떠한 변화도 없는 것으로 확인되며, 파골세포 분화에 관련한 p-ERK, ERK2, p-AKT, AKT, p-CREB 및 CREB에 대해서도 히스타민 단독 처리에 의한 영향은 거의 없고, 클레마스틴에 의하여 발현 변화가 있는 것으로 확인되는 바, 파골세포의 분화 억제는 히스타민과 무관한 클레마스틴의 고유한 효과인 것으로 확인되었다(도 9, 도 10 및 도 11 참조).
- [0036] 본 발명의 구체예에서, 클레마스틴이 전사인자인 NF- κ B 및 AP-1의 활성을 억제하여 파골세포의 분화를 억제하는지 확인하기 위하여, NF- κ B 리포터 또는 AP-1 리포터 플라스미드로 형질 감염시킨 RAW264.7 세포를 RANKL로 처리하고, CM 처리 여부에 따른 NF- κ B 활성 및 AP-1 활성 변화를 측정된 결과, RANKL 처리한 경우 NF- κ B 및 AP-1의 활성이 증가하는 반면, 클레마스틴을 처리했을 때 NF- κ B 및 AP-1의 활성이 억제되는 것을 확인하였다(도 12 참조).
- [0037] 본 발명의 구체예에서, 클레마스틴이 NF- κ B 타겟 유전자인 SOD2 및 c-Fos의 발현 변화에 주는 영향을 확인한 결과, 클레마스틴이 SOD2 및 c-Fos의 발현을 억제하고, 그외 Cox2, Il-6 및 Il-1 β 의 발현을 억제함으로써 파골세포의 분화를 억제하는데 기여함을 확인하였다(도 13 및 도 14 참조). 한편, 클레마스틴이 I κ B α 의 인산화와 p65의 인산화에는 영향이 없고(도 16 및 도 17 참조), JNK, ERK2, p38 및 I κ B α 의 인산화에도 영향이 없으며(도 20 참조), src, AKT, 및 CREB의 인산화에도 영향이 없으나(도 21 참조), p65의 핵으로의 전이가 억제되는 것을 확인하였다(도 18 및 19 참조). 이는, 클레마스틴이 전사인자인 NF- κ B 및 AP-1의 활성을 억제하여 파골세포의 분화를 억제하는 효과를 나타내므로, 파골세포에 의한 골흡수를 감소시키고, 골밀도를 향상시키는 골다공증의 예방 및 개선 용도로 사용될 수 있음을 시사한다.
- [0038] 본 발명의 구체예에서, 클레마스틴의 파골세포의 성숙 및 골 재흡수 기능 억제에 대하여 확인하기 위해 실험한 결과, 클레마스틴이 파골세포의 성숙을 억제하고(도 22 및 도 23 참조), dentine disc에서 파골세포에 의한 골 흡수를 저해하고(도 24 및 도 26 참조), 액팅의 형성을 억제하며(도 25 참조), 파골세포 성숙 및 기능에 관여하는 유전자인 ctsk, Atp6v0d2, Dcstamp 및 Mmp9의 발현을 억제하는 것으로 확인되어, 클레마스틴에 의해 파골세포의 성숙 및 골 재흡수 기능이 억제됨을 확인하였다.
- [0039] 본 발명의 구체예에서, 클레마스틴에 의한 인테그린 발현 억제를 확인한 결과, NFATc1 발현, (integrin β 3)의 인산화, 파골세포 성숙 및 기능에 관여하는 유전자인 itgb3, p130cas, src의 발현 모두 클레마스틴에 의해 억제되는 것을 확인하였으며(도 29 및 도 30 참조), 또한 클레마스틴은 Rac1 활성을 감소시키는 것으로 확인되었다(도 31 참조). 이는 클레마스틴이 NF- κ B를 조절하여 파골세포 분화를 억제하고 인테그린 신호를 조절하여 파골세포의 성숙과 기능을 약화시킨다는 것을 시사한다.
- [0040] 본 발명의 구체예에서, LPS 유도 골 파괴에 대한 CM(클레마스틴)의 억제 효과를 확인한 결과, 클레마스틴에 의해 골강 형성이 감소되는 것을 확인하였다(도 32 및 도 33 참조). 또한 난소 절제 마우스(OVX model mice)에서 클레마스틴에 의해 대퇴골의 BMD(골 무기질 밀도)가 증가하고, BV/TV(총 골량)가 증가하며, Tb.N.(trabecular 수)가 증가하고, Tb.Th(trabecular 두께)회복되고, Tb.pf(trabecular 패턴 계수)가 감소하는 것을 확인하고(도 34 및 도 35 참조), 대퇴골 사진(도 36 참조)과 OcS/BS(osteoclast surface to total volume)의 결과와 같이,

클레마스틴이 골 손상에 대한 보호 효과와 골 파괴를 회복시키는 효과가 있음을 확인하였다.

[0041] 과도한 파골세포는 골다공증 및 류마티스 관절염과 같은 다양한 골 질환을 유발하는 바, 파골세포 분화의 조절은 임상적 의미를 갖는데, 클레마스틴은 본 명세서의 실험들에 의해 확인되는 바와 같이, 효과적인 파골세포 분화, 성숙 및 형성 억제제임을 확인하였다. 클레마스틴은 골수 유래 대식세포(파골세포 전구세포)의 파골세포로의 분화를 억제하며, NF- κ B 및 AP-1 활성화를 억제하고, c-Fos 발현을 약화시키면서 NFATc1 발현을 감소시키고, NF- κ B의 핵 전좌를 억제하는 것으로 밝혀졌다. 나아가 분화된 파골세포에서도 파골세포 형성과 골 흡수를 억제하고 인테그린 β 3 및 p130cas 발현과 Rac1 활성을 감소시키는 것을 확인하여, 클레마스틴이 NF- κ B를 조절하여 파골세포 분화를 억제하고 인테그린 신호를 조절하여 파골세포 성숙과 기능을 약화시키는 기전을 확인하였다. 또한 클레마스틴은 LPS 및 난소 절제술로 유도된 골 분해 마우스 모델에서 골 파괴를 효과적으로 방지하였으며, 이는 염증 유발 골 질환 및 폐경기 후 골다공증과 같은 골질환 치료에 클레마스틴이 효과적인 약물임을 시사한다.

[0042] 따라서, 본 발명의 클레마스틴을 유효성분으로 함유하는 조성물은 골질환의 예방 또는 치료를 위해 유용하게 사용될 수 있다.

[0044] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물뿐만 아니라, 이의 약학적으로 허용되는 염, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 라세이체 또는 입체이성질체를 모두 포함한다.

[0045] 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸이도에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설페이트, 바이설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 숙시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[0047] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 동량의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 및 산 수용액 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조하거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0048] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조 시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0050] 상기 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.

[0051] 경구 투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose)또는 락토오스(lactose)또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마

그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0052] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다.

[0053] 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween)81, 카카오지, 타우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0055] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0056] 구체적으로, 본 발명에 따른 화합물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.1 mg 내지 100 mg, 바람직하게는 0.5 mg 내지 10 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 질환의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0057] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용될 수 있다.

[0059] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 클레마스틴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0060] 또한, 상기 조성물은 NFATc1, Acp5, Mmp9, Ctsk, Dcstamp, c-FOS, SOD, JNK, ERK2, Src 및 caveolin-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나 이상의 발현 또는 활성을 감소시킬 수 있다. 또한, 상기 조성물은 염증에 의한 골 손상을 억제할 수 있다.

[0061] 아울러, 본 발명의 조성물이 적용될 수 있는 골질환으로는 성장기 발육부진, 골절, 과도한 파골세포의 골 흡수에 의한 골다공증(osteoporosis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 치주질환(periodontal disease), 파제트병(Paget disease) 및 전이성 골암(metastatic bone cancers)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0062] 상기의 골질환은 성장기 발육부진, 골절, 과도한 파골세포의 골 흡수에 의한 골다공증(osteoporosis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 치주질환(periodontal disease), 파제트병(Paget disease) 및 전이성 골암(metastatic bone cancers)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0063] 본 명세서의 "건강기능식품"이란 일상 식사에서 결핍되기 쉬운 영양소나 인체에 유용한 기능을 가진 원료나 성분(기능성 원료)을 사용하여 제조한 것으로, 인체의 정상적인 기능을 유지하거나 생리기능 활성화를 통하여 건강을 유지하고 개선하는 식품으로 식품의약품안전처가 정한 것을 의미하나, 이에 한정되지 않으며 통상적인 의미의 건강식품을 배제하는 의미로 사용된 것이 아니다.

[0064] 본 발명의 조성물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강기능식품 중의 상기 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취 시에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상

의 양으로도 사용될 수 있다.

[0065] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 조성물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 단당류, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 이당류, 예를 들어 말토스, 수크로스 등; 및 다당류, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 g 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0066] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일 주스 및 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0067] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0069] 이하, 본 발명을 실험예에 의해서 상세히 설명한다.

[0070] 단, 하기 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실험예에 의해서 한정되는 것은 아니다.

[0072] <실시예 1> 클레마스틴의 준비

[0073] 클레마스틴은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구매하여 준비하였다.

[0075] <실험예 1> 클레마스틴의 파골세포 분화 억제

[0076] 본 발명자들은 클레마스틴의 파골세포 분화 억제 효과를 확인하기 위하여, BMM(Bone Marrow-Derived Macrophages)세포를 대상으로 하여 다음의 실험을 수행하였다.

[0077] BMM 세포는 파골세포(osteoclast)로 분화할 수 있는 전구체 세포(precursor cell)로써, 본 실험에서는 8주령 C57BL/6 수컷 마우스의 대퇴골과 경골의 골수(Bone marrow)에서 추출한 세포를 사용하였다.

[0078] 다양한 농도(0, 1, 2, 3 또는 4 μ M)의 클레마스틴 존재 하에서 BMM(Bone Marrow-Derived Macrophages)세포에 40ng/ml의 M-CSF(대식세포콜로니자극인자)와 50ng/ml의 RANKL(Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)을 3일 또는 4일 동안 처리하여 파골세포로 분화시키고 PBS 워싱처리 후 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정한 뒤 leukocyte acid phosphatase cytochemistry kit (SigmaAldrich)를 사용하여 TRAP 염색한 후, TRAP 염색된 3개 이상의 다핵을 가진 파골세포의 수를 현미경으로 분석하였다.

[0079] 그 결과, RANKL을 3일 또는 4일 동안 처리하여 파골세포로 분화시켰을 때 파골세포 분화가 유의적으로 억제되었다(도 3 및 도 4).

[0080] 또한, 클레마스틴의 파골세포 분화 억제효과가 세포독성에 의한 것임을 배제하기 위하여, EASY Cytos (WST-1) assay kit로 세포독성을 분석하였다. BMM 세포를 각각 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt (WST-1) reagent (Roche Applied Science)를 10 μ l씩 넣어주고 37 $^{\circ}$ C에서 2-4시간 배양한 뒤, 450nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[0081] 그 결과, 다양한 농도의 클레마스틴(0, 1, 2, 3, 4 및 5 μ M)을 처리하였을 때 5 μ M 농도 까지 클레마스틴에 의한 세포독성이 나타나지 않는 것을 확인하였다(도 5). 이는 클레마스틴의 파골세포 분화 억제효과가 세포사멸에 의한 것이 아님을 보여준다.

[0083] <실험예 2> 클레마스틴에 의한 NFATc1 발현 억제

[0084] 클레마스틴의 파골세포 분화 억제 효과를 확인하기 위하여, 다양한 농도(0, 1, 2, 3 및 4 μ M)의 클레마스틴 존재 하에서 BMM 세포에 4일 동안 50ng/ml의 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화시키고, 파골세포의 분화에서 가장 중요하게 알려져 있는 전사 인자(transcription factor)인 NFATc1 단백질의 발현을 확인하기 위해 NFATc1에 대한 항체를 사용한 면역 블롯(immunoblot)을 수행하였다.

[0085] 10% 폴리아크릴아미드 겔(polyacrylamide gel)을 이용하여 단백질을 분리하고, 분리된 단백질을 니트로 셀룰로오스 막(nitrocellulose membranes)에 옮겨주었다. TBST(0.05% Tween-20 in Tris-buffered saline, pH 7.4)에 녹인 5% 탈지유를 이용하여 막에 있는 비특이적 결합부위를 모두 블로킹하였다. 일차항체(mouse monoclonal antibodies, Santa Cruz Biotechnology Inc)를 14시간 동안 4°C에서 처리한 후 이차항체를 1시간 동안 상온에서 처리하여 West save Up (Ab Frontier)으로 분석하였다.

[0086] 그 결과, NFATc1 단백질은 클레마스틴 농도 구배적으로 억제되었다(도 6 참조). 4일까지 억제효과가 지속되는 것을 확인하였다(도 7 참조).

[0087] 또한, NFATc1의 타겟 유전자인 Nfatc1, Acp5, Mmp9 및 Ctsk와 파골세포 융합과 관련되어 있는 Calcr 및 Dcstamp의 유전자의 mRNA 발현 변화를 RT-PCR로 확인하였다.

[0088] real time-PCR을 위해, Trizol reagent (Invitrogen)을 사용하여 총 RNA를 추출하여 260nm의 흡광도에서 정량 분석하였으며, 총 RNA를 0.5mg의 oligo(dT)primers를 포함, 총 15ml가 되게 하여 70°C에서 5분간 인큐베이션한 후, 얼음에서 바로 식혀주었다. cDNA 처음 가닥은 M-MLV reverse transcriptase (Promega)200 units, ribonuclease inhibitor 24 units 및 각각의 dNTP 0.25mM를 포함한 최종볼륨 25 μ l에서 42°C에서 1시간, 70°C에서 10분 간 합성하였다. 회색 cDNA template의 0.8 μ l씩(1:2.5)을 2X SYBR Green PCR Master Mix(M Biotech)10 μ l, 각 gene-specific primer(제노텍)10 μ M 의 1 μ l씩을 포함한 최종 20 μ l 볼륨에서 ABI 7300 real time PCR System(Applied Biosystems)을 사용하여 증폭시켰으며, 증폭은 50°C에서 2분간, 95°C에서 2분간, 다음으로 95°C에서 15초간, 60°C에서 1분간 40 사이클을 수행하여 실험하였다. 실험에서 사용한 Primer의 서열은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0090] real-time PCR primer의 서열 및 amplicon 크기

Gene	Primer (sense & antisense)	서열번호	Amplicon size (bp)
Nfatc1	5' -CTTCAGCTGGAGGACACC-3'	서열번호 1	79
	5' -CCAATGAACAGCTGTAGCG-3'	서열번호 2	
Ctsk	5' -ACCACTGCCTTCCAATACG-3'	서열번호 3	99
	5' -CGTGGCGTTATACATACAAC-3'	서열번호 4	
Mmp9	5' -AGACGACATAGACGGCATC-3'	서열번호 5	97
	5' -TGCTGTCGGCTGTGGTTC-3'	서열번호 6	
Acp5	5' -CCAGCGACAAGAGGTTC-3'	서열번호 7	113
	5' -AGAGACGTTGCCAAGGTGAT-3'	서열번호 8	
Calcr	5' -TGATGACTCTCAGGACAATG-3'	서열번호 9	87
	5' -ACTGGATCAATCTGTAGGAG-3'	서열번호 10	
Dcstamp	5' -TTATGTGTTTCCACGAAGCCCTA-3'	서열번호 11	141
	5' -ACAGAAGAGAGCAGGGCAACG-3'	서열번호 12	
Dock5	5' -TGGTGACACAGGGACAGTGG-3'	서열번호 13	168
	5' -CACCCCAACTATGCACGTGG-3'	서열번호 14	
cFos	5' -GAGAAACGGAGAATCCGAAG-3'	서열번호 15	97
	5' -GAGAAACGGAGAATCCGAAG-3'	서열번호 16	
Sod2	5' -ATTAACGCGCAGATCATGCA-3'	서열번호 17	161
	5' -TGTCCTCCACCATTTGAACCT-3'	서열번호 18	

Cox2	5' -GATCATAAGCGAGGACCTG-3' 5' -GTCTGTCCAGAGTTTCACC-3'	서열번호 19 서열번호 20	85
Itgb3	5' -GGAGTGGCTGATCCAGATGT-3' 5' -TCTGACCATCTTCCCTGTCC-3'	서열번호 21 서열번호 22	138
Atp6v0d2	5' -CAGAGATGGAAGCTGT-3' 5' -TGCCAAATGAGTTCAG-3'	서열번호 23 서열번호 24	282
Ppargclb	5' -CTCCAGGCAGGTCAACCC-3' 5' -GGGCCAGAAGTCCCTTAGG-3'	서열번호 25 서열번호 26	83
Mt-cyb	5' -GCCACCTTGACCCGATTCT-3' 5' -TTGCTAGGGCCGCGATAAT-3'	서열번호 27 서열번호 28	64
Mt-nd4	5' -CATCACTCTATTCTGCCTAGCAA-3' 5' -TCCTCGGGCCATGATTATAGTAC-3'	서열번호 29 서열번호 30	74
Mt-col	5' -TTTTCAGGCTTCACCCTAGATGA-3' 5' -GAAGAATGTTATGTTTACTCCTACGAATATG-3'	서열번호 31 서열번호 32	81
Mt-co3	5' -CGGAAGTATTTTCTTGCAGGAT-3' 5' -CAGCAGCCTCCTAGATCATGTG-3'	서열번호 33 서열번호 34	82
b-actin	5' -ACCCTAAGGCCAACCCTG-3' 5' -GCCTGGATGGCTACGTAC-3'	서열번호 35 서열번호 36	81
Ctsk, Cathepsin K; Mmp9, matirx metalloprotease 9; Acp5, acid phosphatase 5, tartrat-resistant ; CR, Calcitonim receptor; DC-STAMP, Dendritic cell-specifictransmembrane protein; Dock5, dedicator of cytokinesis 5; SOD2, superoxide dismutase 2; COX2, cyclooxygenase 2; PGC-1 β peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 β ; ND4, NADH dehydrogenase subunit 4; COX1, cytochrome c oxidase subunit 1;			

[0091] 그 결과, 3 μ M 클레마스틴 존재 하에서 50ng/ml RANKL을 처리하였을 때 NFATc1와 이의 타겟 유전자인 Nfatc1, Acp5, Mmp9 및 Ctsk와 파골세포 융합과 관련되어 있는 Calcr 및 Dcstamp의 유전자의 mRNA 발현이 현저히 억제되는 것을 확인하였다(도 8).

[0093] <실험예 3> 클레마스틴에 의한 파골세포 분화 억제에 대한 히스타민에 영향

[0094] 또한, 클레마스틴의 파골세포 분화 억제효과가 히스타민에 의한 기전에 기인하는 것이 아님을 확인하기 위해, 다음과 같이 실험하였다.

[0095] BMM은 고정 된 3uM CM의 부재 또는 존재하에 4-5 일 동안 RANKL과 함께 배양되었다. 용량 의존적 히스타민의 표시된 농도를 동시에 배양 배지에 처리하였다.

[0096] 세포를 고정하고 TRAP 염색을 한 후 광학 현미경으로 검사하고, 3 개 이상의 핵을 포함하는 TRAP 양성 MNC를 계수한 결과, 클레마스틴의 파골세포 분화 억제효과에 히스타민에 의한 영향은 없는 것으로 확인되었다(도 9 및 도 10).

[0097] 또한, 세포 용해물을 phosphor p-ERK 및 ERK2, p-AKT 및 AKT, p-CREB 및 CREB에 특이적인 항체를 사용하여 면역블롯팅 분석한 결과에서도, 클레마스틴의 파골세포 분화 억제효과에 히스타민에 의한 영향은 없는 것으로 확인되었다(도 11).

[0099] <실험예 4> 클레마스틴에 의한 NF- κ B 및 AP-1 조절

[0100] 클레마스틴이 NF- κ B 및 AP-1의 활성을 조절하는지 확인하기 위하여, NF- κ B 리포터 또는 AP-1 리포터 플라스미드로 형질 감염시킨 RAW264.7 세포를 24시간 동안 RANKL로 처리하고, 3 μ M CM 처리 여부에 따른 NF- κ B 활성 및 AP-1 활성 변화를 측정하였다.

[0101] 그 결과, RANKL 처리한 경우 NF- κ B 및 AP-1의 활성이 증가하는 반면, 클레마스틴을 처리했을 때 NF- κ B 및 AP-1의 활성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(도 12).

[0102] 또한, I κ B α 와 p-I κ B α 에 대한 항체(rabbit polyclonal antibodies, Cell Signaling Technology)를 사용한 면역 블롯(immunoblot)으로 I κ B α 의 인산화 정도를 확인하였고, SOD2 및 c-FOS 단백질의 발현도 이들의 항체

(SOD2/rabbit polyclonal antibody, Upstate; c-FOS/rabbit polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 이용한 면역 블롯(immunoblot)으로 확인하였으며, SOD2 및 c-Fos mRNA의 발현을 상기 실험예 2에 기재된 방법으로 RT-PCR로 분석하였다(표 1 primer 서열 참조).

[0103] 그 결과, 클레마스틴($3\mu\text{M}$)은 RANKL(50 ng/ml)의 존재 하에서 NF- κB 타겟 유전자인 SOD2 및 c-Fos의 단백질 및 mRNA 발현을 유의적으로 억제하였고(도 13 및 도 14). 또한 클레마스틴이 SOD2 및 c-Fos의 발현을 억제하고, 그외 Cox2, I β 및 I α 의 발현을 억제함으로써 파골세포의 분화를 억제하는데 기여함을 확인하였다(도 13 및 도 14). 한편, 클레마스틴이 I $\kappa\text{B}\alpha$ 의 인산화와 p65의 인산화에는 영향이 없었다(도 16 및 도 17).

[0104] 이는, 클레마스틴이 전사인자인 NF- κB 및 AP-1의 활성을 억제하여 파골세포의 분화를 억제하는 효과를 나타내므로, 파골세포에 의한 골흡수를 감소시키고, 골밀도를 향상시키는 골다공증의 예방 및 개선 용도로 사용될 수 있음을 시사한다.

[0106] <실험예 5> 클레마스틴에 의한 MAPKs 및 AKT 활성 억제

[0107] RANKL에 의해 활성화되는 MAPKs와 AKT에 대한 클레마스틴의 효과를 보기 위하여, 이들의 항체(phospho-JNK, phospho-ERK, phospho-p38, phospho-Src, phospho-AKT에 대한 Rabbit polyclonal antibodies, AKT에 대한 rabbit monoclonal antibodies, Cell Signaling Technology; JNK1, p38에 대한 Rabbit polyclonal antibodies, ERK2 mouse monoclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 이용한 면역 블롯(immunoblot)으로 MAPKs와 AKT 관련 단백질의 인산화 정도를 비교해 보았다.

[0108] 그 결과, 클레마스틴에 의해 JNK, ERK2 및 p38의 인산화는 영향을 받지 않음을 확인하였고(도 20), src, AKT, 및 CREB의 인산화에도 영향이 없으나(도 21), p65의 핵으로의 전좌가 억제되는 것을 확인하였다(도 18 및 19).

[0110] <실험예 6> 클레마스틴에 의한 파골세포의 성숙 및 골 흡수 억제

[0111] 클레마스틴의 파골세포의 분화억제 작용시점을 알아보기 위하여, RANKL을 처리하여 BMM 세포를 파골세포로 분화시키는 동안, 여러 시점에서 클레마스틴에 노출시키고 TRAP 염색된 다핵의 파골세포의 수를 분석하였다.

[0113] 그 결과, 클레마스틴($3\mu\text{M}$)을 RANKL(50 ng/ml)과 함께 처리하였을 때 파골세포의 형성이 유의적으로 억제되었고, 성숙된 파골세포에 클레마스틴을 처리한 경우에서도 3핵 이상의 파골세포 수는 유의적으로 억제되었다(도 22 및 도 23 참조).

[0115] 또한 유사한 실험조건에서 클레마스틴이 액틴링(acting ring)의 형성과 골 흡수에 미치는 영향을 보기 위하여, BMM 세포에 3일 동안 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화시킨 후 클레마스틴을 처리한 세포와, 클레마스틴을 RANKL과 함께 처리한 세포를 고정하고 액틴링과 핵을 염색하거나 dentine disc에서 골 흡수 정도를 분석하였다. 3.7 % formaldehyde가 첨가된 PBS에서 세포를 고정하여 0.1 % Triton X-100 처리를 한 뒤, Alexa Fluor 488-phalloidin(Invitrogen)을 30분간 처리하고, 다시 DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole, Roche)로 염색하여 형광 현미경을 통해 관찰하였다. 또한 골 흡수 정도는 dentine disc(Immunodiagnostic Systems Ltd)에 배양된 세포들을 cotton tip을 사용하여 제거한 뒤 재흡수 구멍(resorption pit)을 hematoxylin으로 염색하여 현미경 100배율로 촬영한 사진을 Image-Pro Plus 4.5 software (Media Cybernetics)로 분석하였다.

[0116] 그 결과, 클레마스틴은 액틴링의 형성과 dentine disc에서의 파골세포에 의한 골 흡수를 완전히 억제하였고, 3일 동안 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화시킨 후 클레마스틴을 처리한 경우에는 액틴링의 크기가 감소되었고 골 흡수도 상당히 저해되는 것을 확인하였다(도 24, 도 25 및 도 26). 이러한 결과는 클레마스틴이 파골세포의 융합과 골 흡수 기능을 저해할 수 있음을 나타낸다.

[0117] 한편, 파골세포 성숙 및 기능에 관여하는 유전자인 ctsk, Atp6v0d2, Dcstamp 및 Mmp9의 발현 역시 클레마스틴에 의해 억제되는 것으로 확인하여(도 28), 클레마스틴에 의해 파골세포의 성숙 및 골 재흡수 기능이 억제됨을 확인하였다.

[0119] <실험예 7> 클레마스틴의 인테그린 신호 경로를 이용한 파골세포 성숙 조절

[0120] 파골세포는 세포-세포 융합(cell-cell fusion) 및 이동(migration)에 의해 다핵 세포를 형성하고, 골흡수가 발생하는 밀봉 구역을 형성하기 위해 액틴링을 개발한다. 따라서, 세포 이동 또는 융합에 관여하는 유전자를 억제하거나 액틴링을 형성하는 것은 파골세포 성숙 또는 기능에 상당한 영향을 미친다. 클레마스틴의 파골세포 생성 관련 유전자의 발현이 감소되는지 여부를 확인하기 위해, 실험예 2의 실험방법과 동일한 RT-PCR 방법을 이용하여 실험을 수행하였고, 이 때, 표 1의 Primer를 사용하였다.

[0121] 그 결과, 클레마스틴에 의한 인테그린 발현 억제를 확인한 결과, NFATc1 발현, (integrin β 3)의 인산화, 파골세포 성숙 및 기능에 관여하는 유전자인 itgb3, p130cas, src의 발현 모두 클레마스틴에 의해 억제되는 것을 확인하였으며(도 29 및 도 30), 또한 클레마스틴은 Rac1 활성을 감소시키는 것으로 확인되었다(도 31).

[0122] 이는 클레마스틴이 NF- κ B를 조절하여 파골세포 분화를 억제하고 인테그린 신호를 조절하여 파골세포의 성숙과 기능을 약화시킨다는 것을 시사한다.

[0124] <실험예 8> 클레마스틴의 염증 및 난소 절제술에 의한 골 손상 억제

[0125] 클레마스틴의 염증에 의해 유발되는 골 손상 억제효능을 동물모델에서 확인하기 위해, 마우스 두개골에 염증유도물질인 LPS(Lipopolysaccharide, 12.5 mg/kg body weight)를 하루 간격을 두고 2회 주입하였다. 이 때 Vehicle (10% DMAC + 10% Tween 80 + 80% distilled water) 또는 클레마스틴(10 mg/kg)이 함께 투여되었고, 첫 주입 5일 후에 두개골을 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정 후, PBS 워싱하여 TRAP 염색 후 관찰하였다. 또한 0.5M ethylenediaminetetraacetic acid로 7일간 석회질을 제거하고, 파라핀 블록을 만든 후 절단하여 TRAP과 Hematoxylin으로 염색한 뒤 관찰하였다.

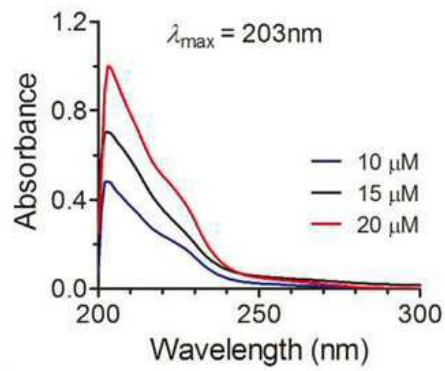
[0127] 그 결과, LPS만 처리한 두개골에서는 TRAP 염색된 부분이 많았으나, 클레마스틴을 함께 처리한 두개골에서는 TRAP 염색된 부분이 현저히 감소된 것을 확인하여, 클레마스틴에 의해 골강 형성이 감소되는 것을 확인하였다(도 32 및 도 33 참조).

[0129] 또한, 폐경기 골다공증의 OVX-유도 모델을 사용하여 클레마스틴의 치료 가능성을 확인하기 위해, 난소 절제술(OVX)과 마이크로 컴퓨터 단층 촬영(μ CT)을 수행하였다. 암컷 12주령 마우스는 모의 수술 또는 OVX를 받았고, 클레마스틴(5mg/kg)을 주당 6회 복강 내 주사하였다. 수술 3주 후 마우스를 안락사시키고, 대퇴골을 μ CT를 사용하여 평가하였다.

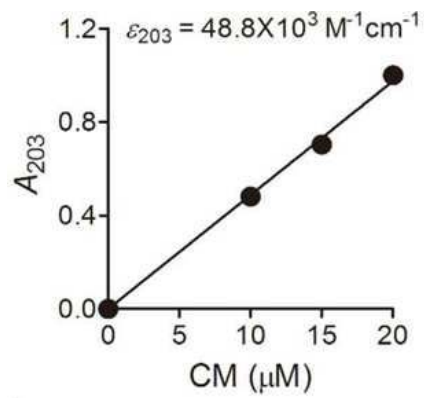
[0131] 그 결과, OVX-유도 모델은 골 무기질 밀도, 골 표면, 골 뼈 수 및 골 부피가 감소하였고, 골 패턴 인자 및 골 분리가 OVX에 의해 증가되었으나, 클레마스틴에 의해 대퇴골의 BMD(골 무기질 밀도)이 증가하고, BV/TV(총 골량)이 증가하며, Tb.N.(trabecular 수)가 증가하고, Tb.Th(trabecular 두께)회복되고, Tb.pf(trabecular 패턴 계수)가 감소하는 것을 확인하고(도 34 및 도 35 참조), 대퇴골 사진(도 36 참조)과 OcS/BS(osteoclast surface to total volume)의 결과와 같이, 클레마스틴이 골 손상에 대한 보호 효과와 골 파괴를 회복시키는 효과가 있음을 확인하였다. 따라서, 클레마스틴은 골다공증과 같은 병리학적 골질환을 치료할 수 있는 치료 가능성이 있음을 나타낸다.

도면

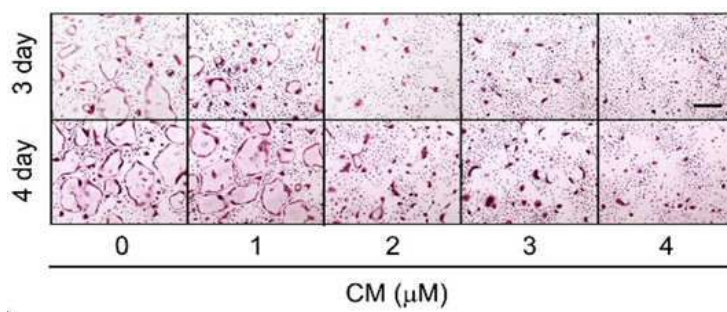
도면1



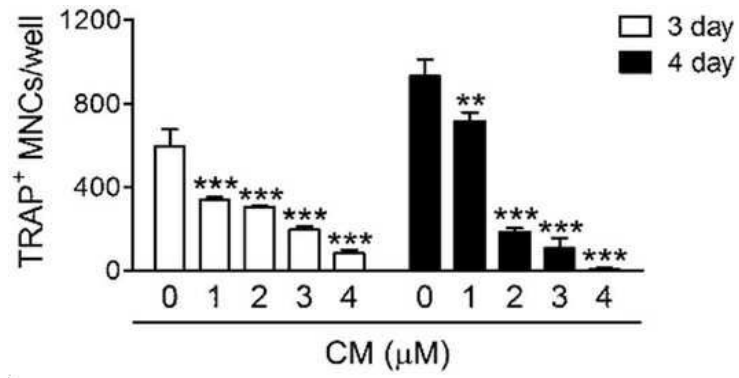
도면2



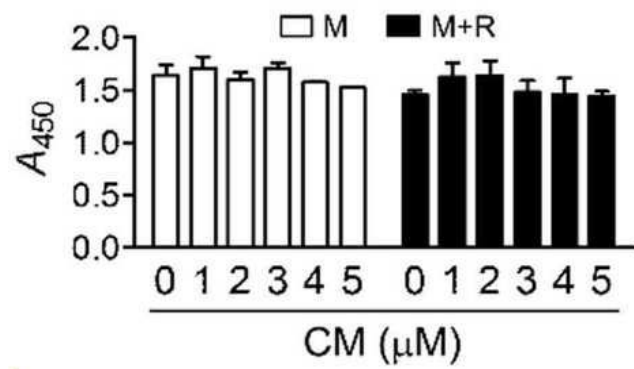
도면3



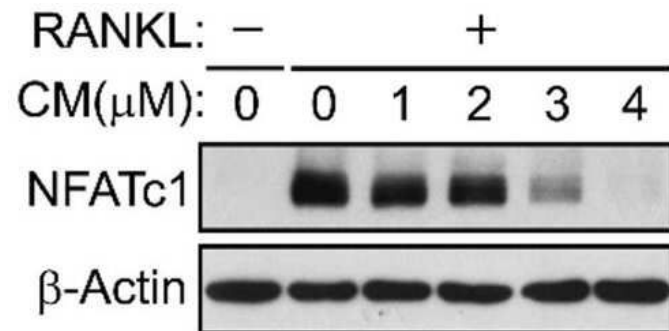
도면4



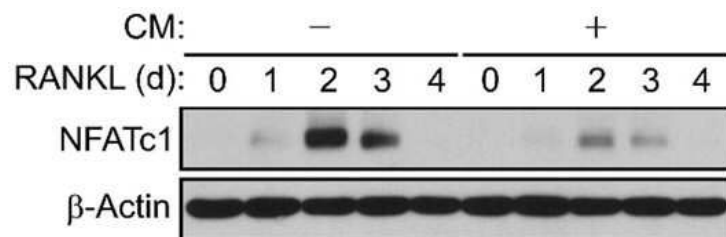
도면5



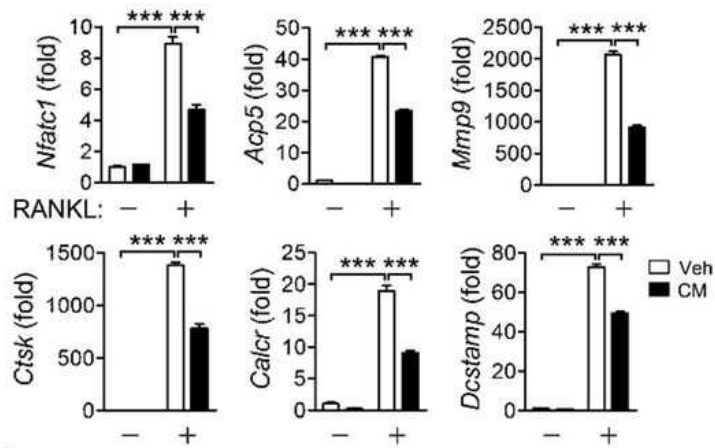
도면6



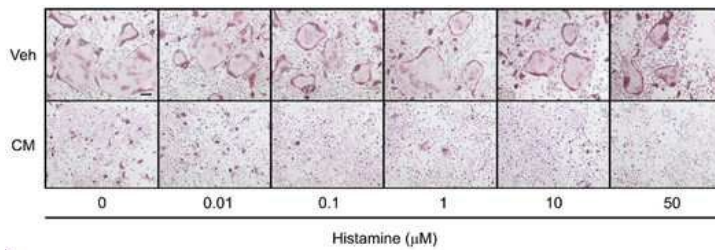
도면7



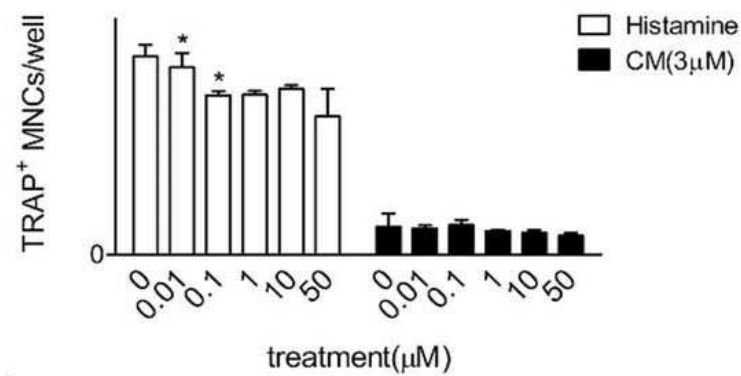
도면8



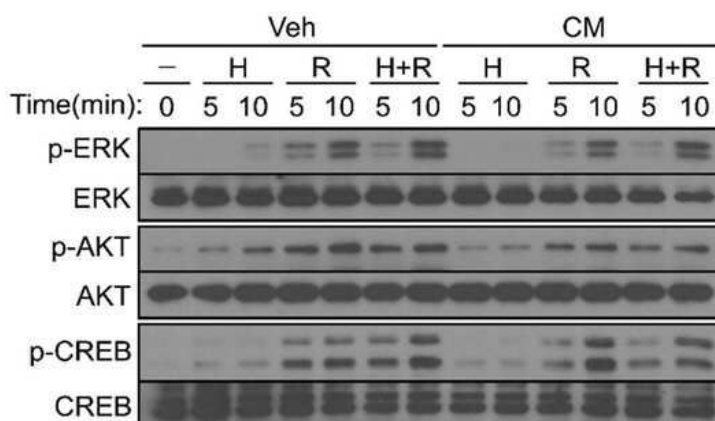
도면9



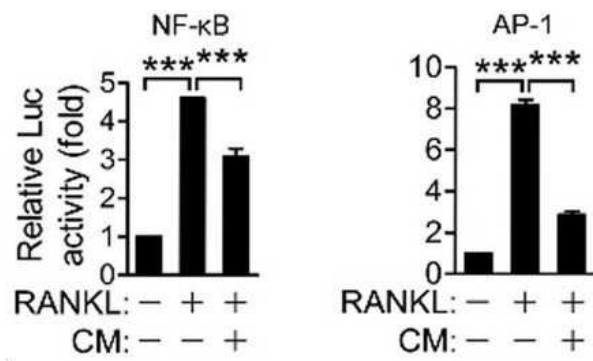
도면10



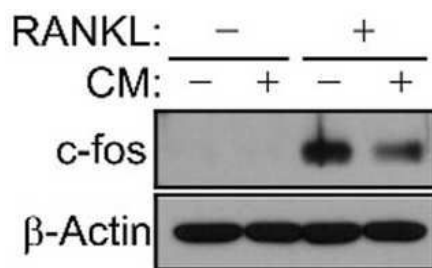
도면11



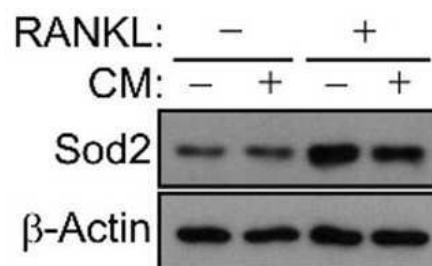
도면12



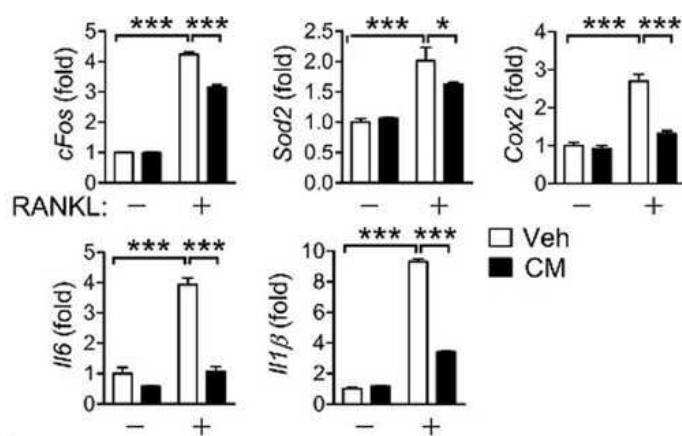
도면13



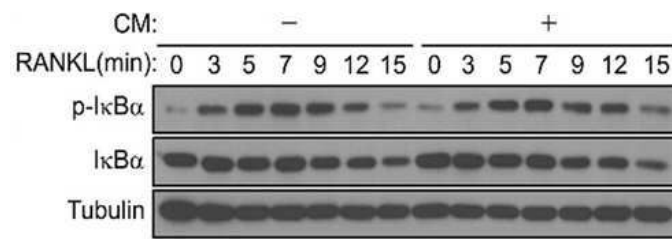
도면14



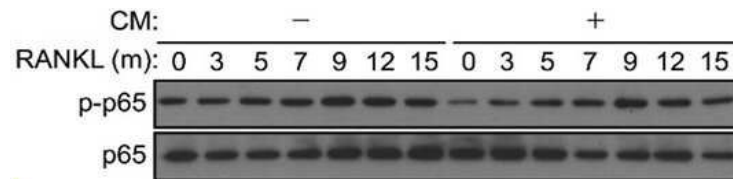
도면15



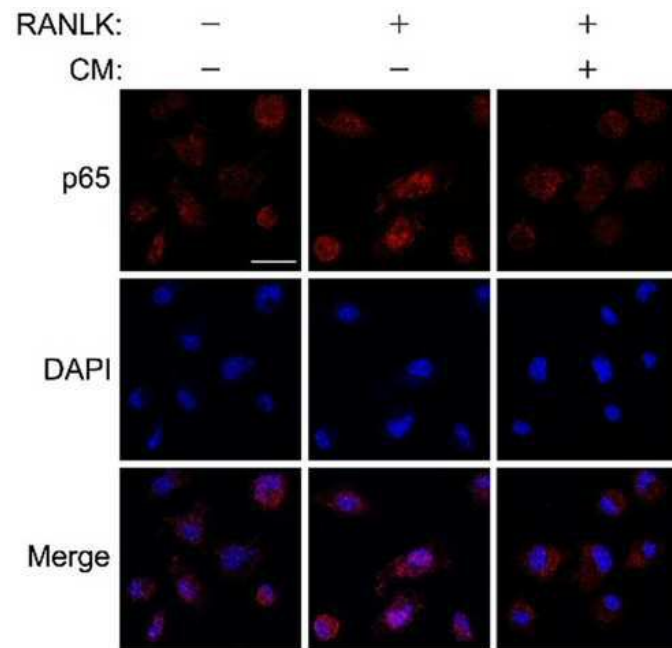
도면16



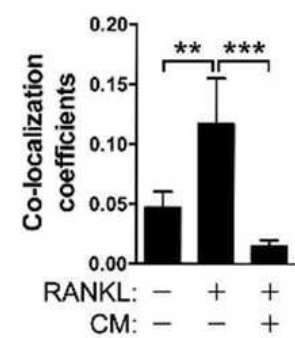
도면17



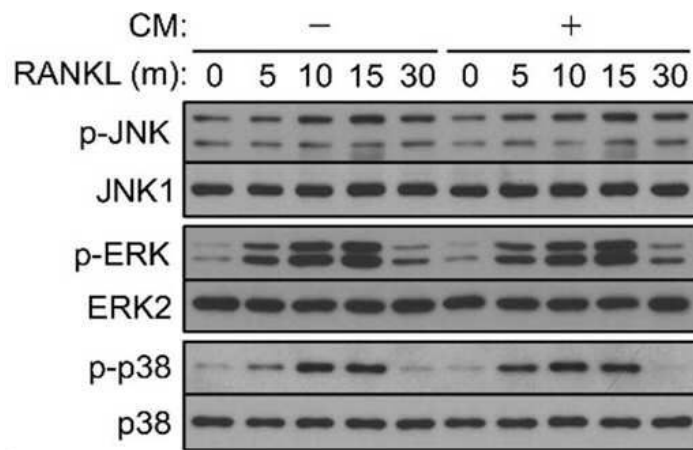
도면18



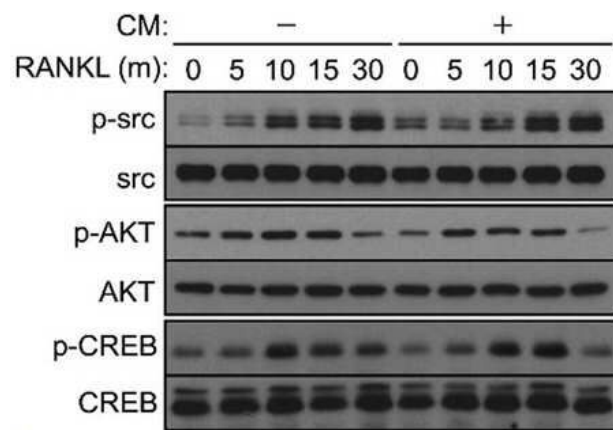
도면19



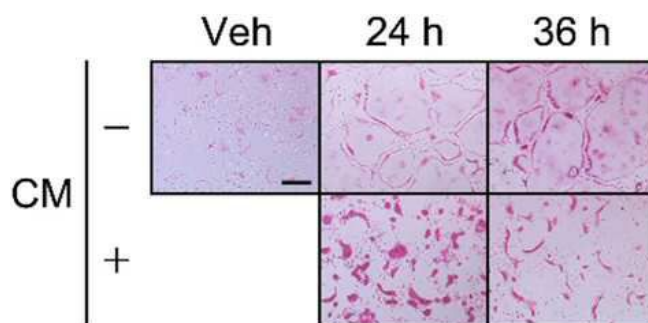
도면20



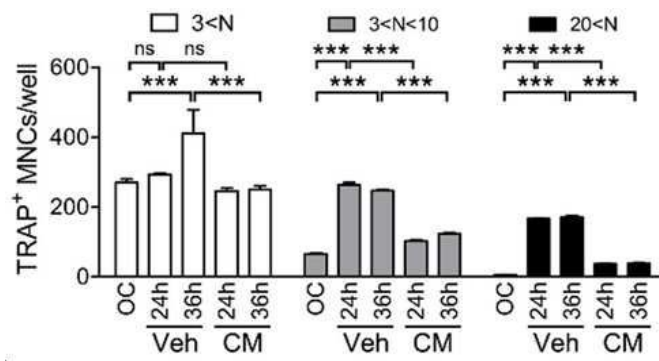
도면21



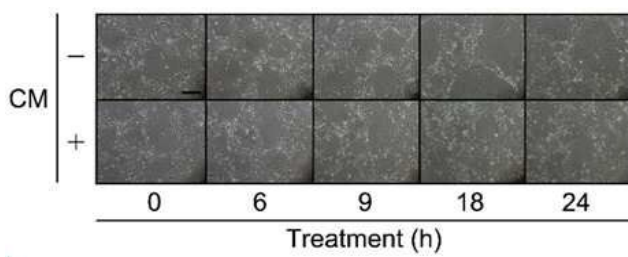
도면22



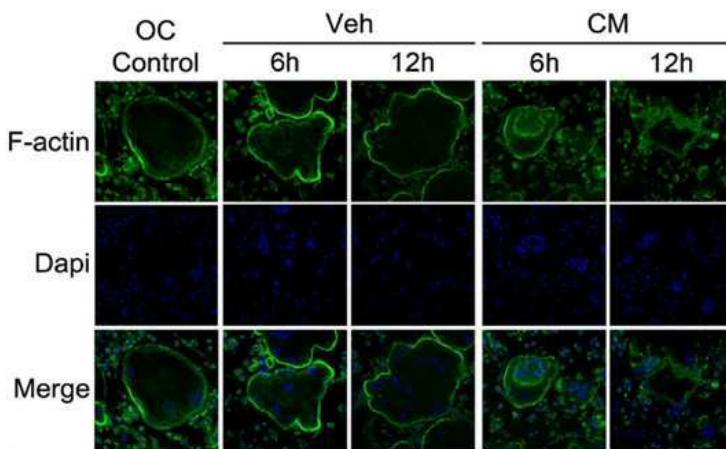
도면23



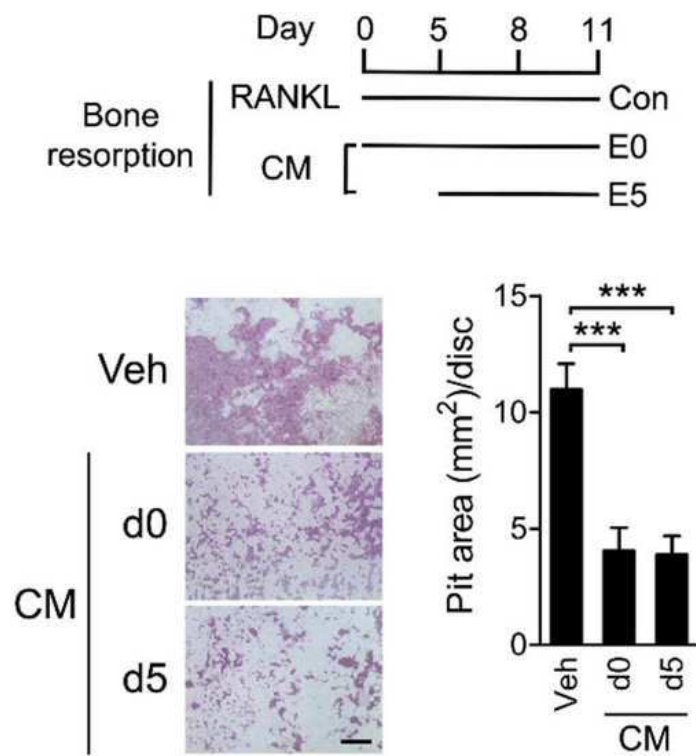
도면24



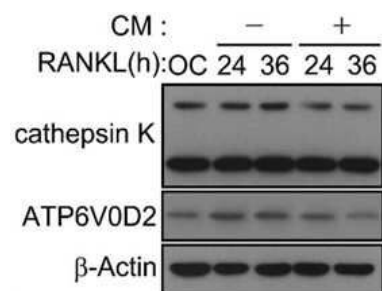
도면25



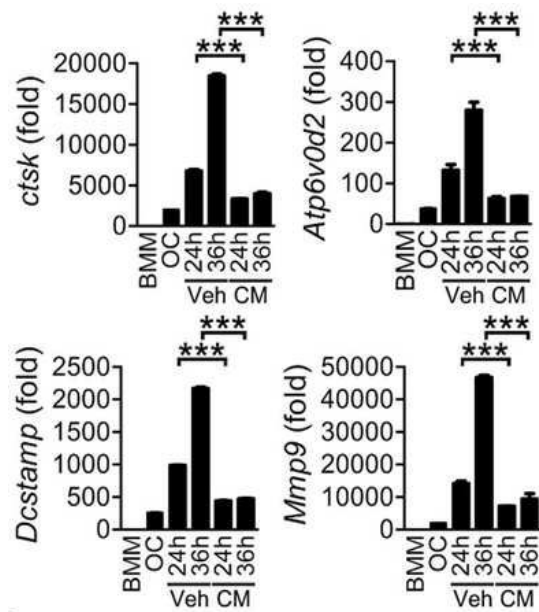
도면26



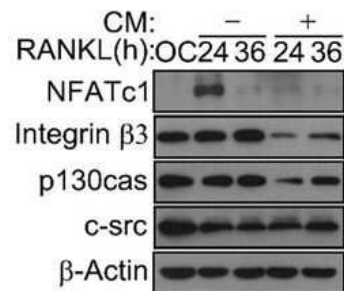
도면27



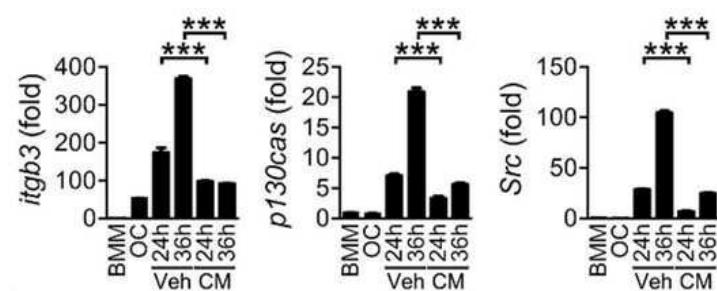
도면28



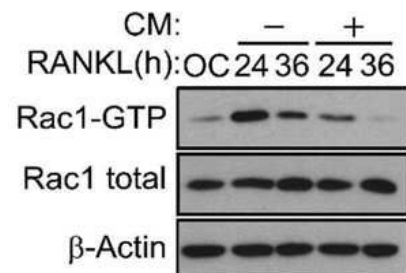
도면29



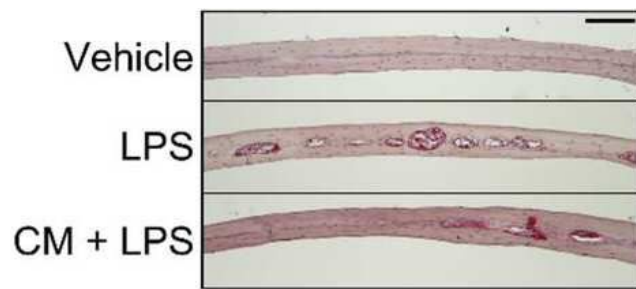
도면30



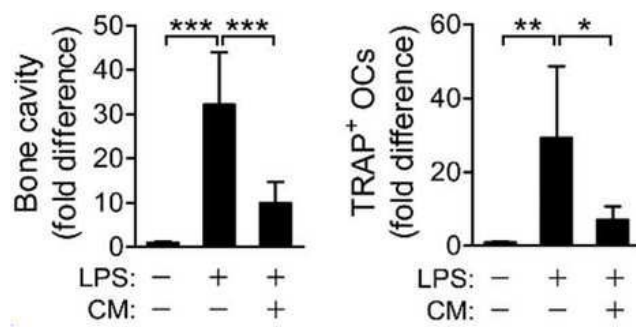
도면31



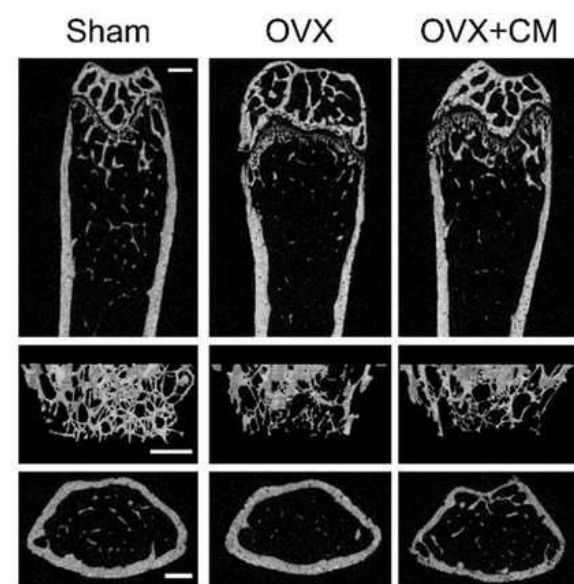
도면32



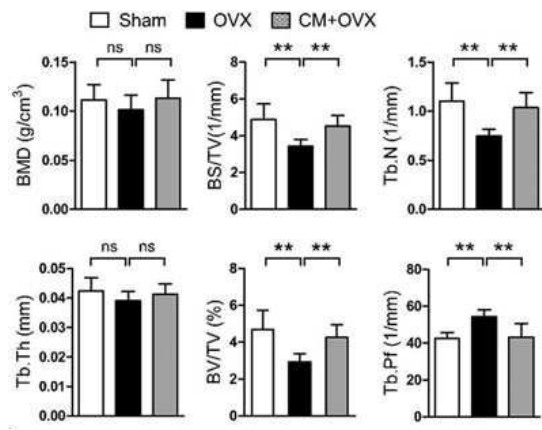
도면33



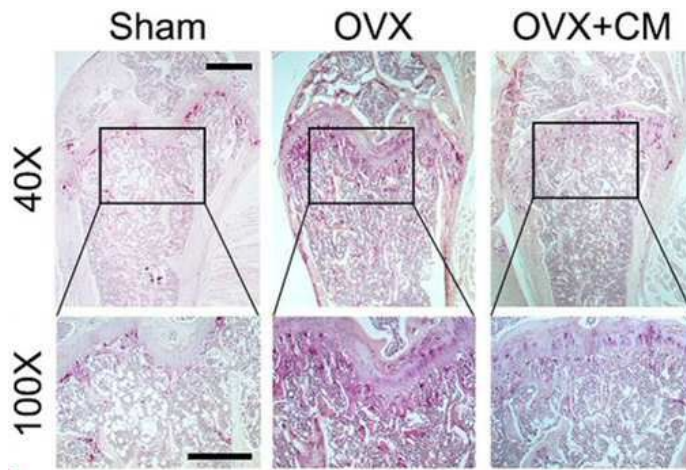
도면34



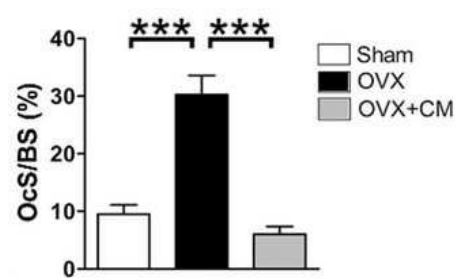
도면35



도면36



도면37



서열목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Pharmaceutical composition for prevention or treatment of bone disease containing Clemastine or pharmaceutically acceptable salts thereof as an active ingredient
- <130> 2020P-11-058
- <160> 36
- <170> KoPatentIn 3.0

<210>	1	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Nfatc1 sense primer	
<400>	1	
	cttcagctgg aggacacc	18
<210>	2	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Nfatc1 antisense primer	
<400>	2	
	ccaatgaaca gctgtagcg	19
<210>	3	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Ctsk sense primer	
<400>	3	
	accactgcct tccaatagc	19
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Ctsk antisense primer	
<400>	4	
	cgtggcggtta tacatacaac	20
<210>	5	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Mmp9 sense primer	

<400>	5	
agacgacata gacggcatc		19
<210>	6	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Mmp9 antisense primer	
<400>	6	
tgctgtcggc tgtgttc		18
<210>	7	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Acp5 sense primer	
<400>	7	
ccagcgacaa gaggttcc		18
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Acp5 antisense primer	
<400>	8	
agagacgttg ccaagtgat		20
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Calcr sense primer	
<400>	9	
tgatgactct caggacaatg		20
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Calcr antisense primer	
<400>	10	
	actggatcaa tctgtaggag	20
<210>	11	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Dcstamp sense primer	
<400>	11	
	ttatgtgttt ccacgaagcc cta	23
<210>	12	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Dcstamp antisense primer	
<400>	12	
	acagaagaga gcagggaac g	21
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Dock5 sense primer	
<400>	13	
	tggtgacaca gggacagtgg	20
<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Dock5 antisense primer	
<400>	14	
	cacccaact atgcacgtgg	20
<210>	15	

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	cFos sense primer	
<400>	15	
	gagaaaacgga gaatccgaag	20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	cFos antisense primer	
<400>	16	
	gagaaaacgga gaatccgaag	20
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Sod2 sense primer	
<400>	17	
	attaacgcgc agatcatgca	20
<210>	18	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Sod2 antisense primer	
<400>	18	
	tgtccccac cattgaactt	20
<210>	19	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Cox2 sense primer	
<400>	19	
	gatcataagc gaggacctg	19

<210>	20	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Cox2 antisense primer	
<400>	20	
	gtctgtccag agtttcacc	19
<210>	21	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Itgb3 sense primer	
<400>	21	
	ggagtggctg atccagatgt	20
<210>	22	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Itgb3 antisense primer	
<400>	22	
	tctgaccatc ttcctgtcc	20
<210>	23	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Atp6v0d2 sense primer	
<400>	23	
	cagagatgga agctgt	16
<210>	24	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Atp6v0d2 antisense primer	

<400>	24	
tgccaaatga gttcag		16
<210>	25	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Ppargclb sense primer	
<400>	25	
ctccaggcag gttcaaccc		19
<210>	26	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Ppargclb antisense primer	
<400>	26	
gggccagaag ttcccttagg		20
<210>	27	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Mt-cyb sense primer	
<400>	27	
gccaccttga cccgattct		19
<210>	28	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Mt-cyb antisense primer	
<400>	28	
ttgctagggc cgcgataat		19
<210>	29	
<211>	24	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mt-nd4 sense primer

<400> 29

catcactcct attctgccta gcaa 24

<210> 30

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mt-nd4 antisense primer

<400>

> 30

tcctcgggcc atgattatag tac 23

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mt-col sense primer

<400> 31

ttttcaggct tcaccctaga tga 23

<210> 32

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mt-col antisense primer

<400> 32

gaagaatgtt atgtttactc ctacgaatat g 31

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mt-co3 sense primer

<400> 33

cggaagtatt tttctttgca ggat 24

<210> 34

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mt-co3 antisense primer
 <400> 34
 cagcagcctc ctagatcatg tg 22
 <210> 35
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> b-actin sense primer
 <400> 35

 accctaaggc caaccgtg 18
 <210> 36
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> b-actin antisense primer
 <400> 36
 gcctggatgg ctacgtac 18