

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 2월 4일 (04.02.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/018055 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 36/03 (2006.01) A61P 1/00 (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/007895
- (22) 국제출원일: 2015년 7월 28일 (28.07.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0095755 2014년 7월 28일 (28.07.2014) KR
- (71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 446-701 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 이태후 (YI, Tae Hoo); 135-892 서울시 강남구 논현로 807, Seoul (KR). 양정은 (YANG, Jung-Eun); 446-908 경기도 용인시 기흥구 흥덕 4로 30번길 28-14, Gyeonggi-do (KR). 이돈길 (LEE, Don-Gil); 448-140 경

기도 용인시 수지구 성북 1로 164번길 13, 203동 1103호, Gyeonggi-do (KR). 박상용 (PARK, Sang Yong); 443-280 경기도 수원시 영통구 광고중앙로 247, 3201동 907호, Gyeonggi-do (KR). 박재희 (PARK, Jae Hee); 138-874 서울시 송파구 풍성로 14길 15-1, 102호, Seoul (KR).

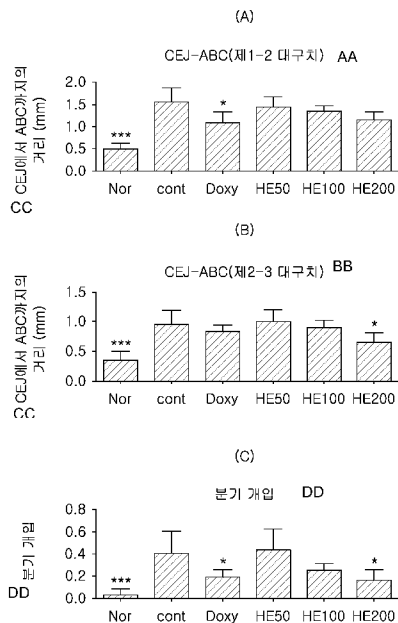
(74) 대리인: 안소영 (AHN, So Young); 137-881 서울시 서초구 서초대로 344, 4층, Seoul (KR).

(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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, 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.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR TREATING PERIODONTAL DISEASES CONTAINING EXTRACT OF HIZIKIA FUSIFORME

(54) 발명의 명칭: 톳 추출물을 포함하는 치주질환 치료용 조성물



AA ... First to second molar teeth
BB ... Second to third molar teeth
CC ... Distance (mm) from CEJ to ABC
DD ... Bifurcation intervention

(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing or treating periodontal diseases containing an extract of Hizikia fusiforme. The present invention has minimal side effects as a natural product and has an excellent effect of easing inflammation and activating formation of the alveolar bone of periodontal ligament cells. Accordingly, the present invention can effectively prevent, treat and improve periodontal diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 톳 추출물을 포함하는 치주질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 천연물로서 부작용이 적으며, 염증을 완화하고 치주인대세포의 치조골 형성을 활성화시키는 효과가 탁월하다. 따라서 효과적으로 치주질환을 예방, 치료 또는 개선시킬 수 있다.



(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 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 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 톳 추출물을 포함하는 치주질환 치료용 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 톳 추출물을 포함하는 치주질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 치아는 구조상 인체내 가장 단단한 경조직으로서 치조골(alveolar bone)에 의해 지지되고 있다. 치조골은 악골의 기저골에 단단히 부착되어 있고, 치근에 바로 인접한 2-3mm 부분을 치주골이라 칭하기도 하나, 통상 치조골이라 함은 상기 치주골을 포함한 경조직 모두를 지칭한다. 치조골이 낮아지면 치아 뿌리가 노출되어 풍치라고 부르는 증상이 나타난다. 또한, 치아가 상실되면 치조골도 점차 소실되는 경향이 있다.
- [3] 치주인대(periodontal ligament)는 평균 0.2mm 정도 두께의 층이며, 치아에 부착되어 치아를 치조골에 부착하고 지지하는 역할을 한다. 또한 치주인대는 치아가 음식을 씹을 때 치조골에 힘을 분산시켜 완충 작용을 하고, 치아의 감각을 치조골에 전달한다. 치주인대에는 미분화 간엽세포가 존재하고 있기 때문에 전체적인 구조와 기능이 변화되지 않으면서 지속적으로 골개조를 계속할 수 있다. 치주인대 내의 미분화 간엽세포는 치조골쪽으로 이동하여 치조골을 개조시키거나, 치아쪽으로 이동하여 교원섬유를 생산하여 치아를 더욱 단단히 지지하기도 한다.
- [4] 치주질환은 연령이 증가할수록 발병이 증가한다. 잇몸에만 치주질환이 국한된 경우 치은염이라고 하며, 이러한 염증이 잇몸과 잇몸뼈 주변까지 진행된 경우 치주염이라고 한다. 치주염이 진행되면 치주인대, 더 나아가 치조골까지 손상시킨다. 치조골 손상의 한 예로 치조골형성장애(alveolar bone osteodystrophy)가 있는데, 더욱 세분하면 치조골다공증(alveolar bone osteoporosis), 치조골연화증(alveolar bone osteomalacia), 치조골감소증(alveolar bone osteopenia) 등을 포함한다. 치조골이 손상되면 결국 치아가 손실된다.
- [5] 현재 치주질환은 비외과적 혹은 외과적인 치석제거술, 치근활택술, 치은소파술, 치주 조직 재생술 등 외과적인 방법으로 주로 치료되고 있다(안등수, 킨테센스 vol. 15 no. 11 통권169호 (2010년 11월) pp.94-112 1228-6656). 그러나 이런 외과적인 치료 방법은 환자에게 고통을 주고 번거로울 뿐 아니라 질환을 예방하기보다는 질환이 어느 정도 진행된 경우에야 적용되는 것이다. 외과적인 치료 방법에 더하여 약물 치료로서 전신적으로 작용하거나 또는 국소 부위에서 서방출되는 항생제가 사용되고 있으나, 이 경우 불필요한 부위에도 약물이 너무 많이 전달되어 부작용이 발생할 수 있고 항생제 내성 박테리아에는 효과가 없다는 문제점이 있다.

- [6] 치주질환을 효과적으로 치료하기 위해서는 감염, 염증, 치주인대 및 치조골 손상이 복합적으로 치료되어야 하나, 현재까지 이러한 치료를 위한 약물이나 치료 방법에 개발되어 있지 않은 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 톳 추출물을 유효성분으로 포함하는, 치주질환(periodontal disease)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [8] 본 발명은 톳 추출물을 유효성분으로 포함하는, 치주질환(periodontal disease)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [9] 또한 본 발명은 톳 추출물을 유효성분으로 포함하는, 치주질환(periodontal disease)의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [10] 본 발명에 있어서, 상기 톳(*Hizikia fusiforme*)은 평균수면에서 저조선 약 30 cm 위쪽의 조간대 하부에 서식하고 유성세대만 존재하는 다년생 해조류이다. 우리나라에서는 주문진 이남에서 서해안 장산곶까지 생육하고 남해안과 제주 지역에 널리 분포하고 있다. 톳은 분류학상 갈조식물문(Heterokontophyta), 갈조식물강(Phaeophyceae), 모자반목(Fucales), 모자반과(Sargassaceae), 톳속(*Hizikia*)에 속한다. 흑갈색으로 짧은 끈모양의 뿌리에서 3~5개의 줄기가 나오며 가지는 아주 짧고 그 가지에는 잎과 기포가 많이 난다. 식물체의 크기는 20~60 cm 정도이다. 줄기는 채찍 모양이며 잎은 송곳모양 또는 거치가 있는 주걱모양이며 기포는 가운데가 조금 부풀은 송곳모양이며 관엽은 없다.
- [11] 본 발명에서는 상기 톳의 전초를 사용할 수 있다.
- [12] 본 발명에 있어서, 추출 방법은 열수 추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출 및 초음파 추출 등의 추출 방법을 사용할 수 있다. 추출 횟수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 3회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 이러한 농축에 의해 액상 또는 분말 형태로 톳 추출물을 추출한다. 톳 추출물은 물, 탄소수 1~4의 알코올, 탄소수 1~4의 알코올 수용액으로 이루어진 군으로부터 선택된 추출용매로 추출하여 얻어질 수 있으며, 이렇게 얻어진 추출물, 그 추출물의 반건조물 또는 건조 분말이 될 수 있다. 바람직하게는 상기 추출용매는 에탄올 수용액을 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게 40 ~ 90% 에탄올 수용액을 사용할 수 있다. 상기 에탄올 수용액을 이용한 추출은 실온에서 1일 내지 7일 동안, 바람직하게는 3일 동안 수행될 수 있다. 또한, 필요에 따라 차광 및/또는 가온(예를 들어, 온침) 조건 하에서 수행될 수도 있다. 상기 추출 용매의 양은 톳 건조 중량의 2 내지 15 배로 한다. 본 발명의 톳 추출물은 톳 추출물을 포함하는 조성물의 총중량에 대하여 0.1 중량% 내지 95

중량%의 함량을 가진다.

- [13] 본 발명의 약학적 조성물 또는 식품 조성물은 치주질환을 예방 또는 치료하는데 사용할 수 있다. 치주질환(periodontal disease)은 잇몸뼈 및 인접 조직의 질환을 말한다. 치주질환은 세균 감염으로부터 시작되어 세균의 독소에 의해 염증반응이 진행되면 잇몸과 치아 사이에 치주낭(periodontal pocket)이 형성되고, 질환이 심해질수록 치주낭의 깊이가 깊어져서 치주인대로 염증이 과급되며 골소실이 일어나게 된다. 또는 치조골에서 골형성과 골흡수의 균형이 깨어져 골흡수가 골형성을 초과하여 골량이 한계 이하로 감소하면 치주질환의 일종인 치조골형성장애가 발생한다.
- [14] 본 발명의 약학적 조성물 또는 식품 조성물이 예방, 치료 또는 개선할 수 있는 치주질환은 치은염(gingivitis), 치주염(periodontal inflammation), 치조골 파손(alveolar bone breakage), 또는 치조골형성장애(alveolar bone osteodystrophy)일 수 있다. 치조골형성장애는 치조골다공증(alveolar bone osteoporosis), 치조골연화증(alveolar bone osteomalacia), 치조골감소증(alveolar bone osteopenia) 등을 포함한다.
- [15] 상기 약학적 조성물은 상기 뜻 추출물을 유효성분으로 함유하고, 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있으며, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화될 수 있다. 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한다.
- [16] 또한, 본 발명의 조성물은 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 포함한다. 경구용 고형 제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로즈(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 포함할 수 있으며, 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제 등을 포함할 수 있다. 경구용 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하며, 물, 리퀴드 파라핀 등의 희석제, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다. 비경구용 제제는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제를 포함하며, 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르류 등을 포함한다.
- [17] 본 발명의 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 조성물은 경구 또는 피하로

투여할 수 있다. 그러나 투여 경로는 이에 제한되지 않는다.

- [18] 본 발명의 조성물 및 방법에 있어서, 유효성분의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 경우에 따라 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 상기 톳 추출물은 1일 0.0001 내지 500 mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 300 mg/kg의 용량으로 투여할 수 있으며, 상기 투여는 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다.
- [19] 본 발명의 식품 조성물의 제형은 통상의 방법에 따라 제조하며, 담체와 함께 건조한 후 캡슐화하거나 기타 정제, 과립, 분말, 음료, 죽 등의 형태로 제형화할 수 있으며, 상기 기재한 것 외에도 모든 식품 형태로 제조 가능하다.
- [20] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [21] 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [22] 상기 "식품 첨가물 공전"에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.
- [23] 본 발명의 건강 기능성 식품 조성물은 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있으며, 예컨대, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 보조 식품, 식품 첨가제 등에 사용될 수 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 환 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다. 상기 기재한 것 외에도 모든 식품 형태일 수 있다.
- [24] 본 발명의 식품 조성물의 제형은 통상의 방법에 따라 제조하며, 담체와 함께 건조한 후 캡슐화하거나 기타 정제, 과립, 분말, 음료, 죽 등의 형태로 제형화할 수 있으며, 상기 기재한 것 외에도 모든 식품 형태로 제조 가능하다.
- [25] 본 발명은 톳 추출물을 환자에게 투여하여 치주질환을 예방, 개선 또는 치료하는 방법을 제공한다. 상기 환자는 사람을 포함하는 동물이 될 수 있다.
- [26] 본 발명은 치주질환을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 톳 추출물의 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [27] 본 발명은 천연물로서 부작용이 적으며, 감염을 치료하고 염증을 완화하고 치주인대세포의 치조골 형성을 활성화시키는 효과가 탁월하다. 따라서

효과적으로 치주질환을 예방, 치료 또는 개선시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [28] 도 1은 NO 생성 억제 활성을 평가하여 나타낸 그래프이다.
- [29] 도 2는 치주인대세포의 알칼리성 포스파타아제의 활성 증가를 평가하여 나타낸 그래프이다.
- [30] 도 3은 치주인대세포의 광화(mineralization) 활성 증가를 평가하여 나타낸 그래프이다.
- [31] 도 4a~f는 백서에서 치주염 개선 효과를 확인한 3D 도면 및 X-레이 도면(각도의 우측 하단)이다.
- [32] 도 5는 도 4의 도면으로부터 계산한 제1 대구치와 제2 대구치 끝단에서의 CEJ-ABC 수치와 분기 개입(Furcation Involvement) 수치를 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [33] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.
- [34] **제조예. 톳 추출물의 제조**
- [35] 건조된 톳(완도수협, KR)을 흐르는 물에 세척하여 불순물을 제거하였다. 세척된 톳 1kg에 물 20 L을 가하여 100 °C 조건에서 열수추출 하였다. 상기 과정을 3 배치(Batch)로 진행하였으며, 얻어진 추출액을 합하여 40 °C 이하에서 감압 농축하여 반고체 형태의 추출물 628 g (수득율 20.9%)을 얻었다.
- [36] **실시예 1. 톳 추출물의 NO 생성 억제 활성 평가**
- [37] 높은 농도의 NO는 염증반응을 유발하여 치주인대세포의 증식과 분화를 억제하나, 낮은 농도의 NO는 염증반응을 억제하여 치주인대세포의 기능을 자극하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 본 발명의 톳 추출물이 NO 생성을 억제하는지 여부를 평가하였다.
- [38] Sherman et al.에 개시된 방법(Biochem. Biophys. Res. Commun. 191, p1301 - 1308, 1993)을 변형하여 수행하였다.
- [39] 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum)이 함유된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium, Cambrex, USA)를 포함하는 48 웰 플레이트에 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포주를 2.5×10^5 cell/ml로 접종하고, 3개 군으로 나누어 제1군에는 아무런 처리를 하지 않고, 제2군에는 LPS(10 ng/ml)만을 첨가하여 대식세포의 활성화를 유도하고, 제3군은 다시 3개 군으로 나누어 톳 추출물을 3-1군에는 1 μ g/ml, 3-2 군에는 10 μ g/ml, 3-3군에는 100 μ g/ml을 각각 LPS(10 ng/ml)와 함께 첨가하였다. 각각을 이산화탄소 항온 배양기(5 % 이산화탄소, 95 % 상대습도, 37°C)에서 24시간 동안 배양하였다.
- [40] 상기 배양액 각각에 그리스 시약 (Griess reagent : 37.5 mM 설파닐릭 산 (sulphanilic acid), 12.5 mM N-(1-나프틸)에틸렌디아민디하이드로클로라이드

[N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydride), 6.5 mM 염산]) 50 μ l를 첨가하고, 그 후 분광광도계를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0~50 μ M 농도의 질산염을 사용하여 작성한 NO₂-농도-흡광도 상관 계수를 기준으로, 상기 배양액에서 RAW 264.7 세포에 의해 생성된 NO₂ 농도를 계산하였다.

- [41] 결과는 도 1에 나타내었다. 도 1에서 톳 추출물이 농도 의존적으로 NO의 생성을 유의하게 억제함을 알 수 있다(도 1에서, *는 p-value < 0.05을 나타내며, **는 p-value < 0.01을 나타낸다).
- [42] 상기 결과로부터 본 발명의 톳 추출물이 NO 생성을 억제하여 염증반응을 억제하고 치주인대세포의 작용을 자극함을 알 수 있다.
- [43] 실시예 2. 톳 추출물의 알칼리성 포스파타아제 활성화 평가
- [44] 알칼리성 포스파타아제(Alkaline phosphatase, ALP)는 치주인대세포 분화의 초기 지표로 알려져 있다. 따라서 본 발명의 톳 추출물이 알칼리성 포스파타아제 활성을 증가시키는지 여부를 평가하였다.
- [45] 인간 치주인대세포 (Periodontal ligament progenitor cells (PDLC)를 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum; FBS), 100 IU/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM 배지에 넣고 5% CO₂, 37 °C로 유지되는 세포 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포를 24 웰 플레이트에 1×10⁵ cell/ml로 분주하고 다시 상기 세포 배양기에서 24시간 동안 배양하였다.
- [46] 배양된 세포를 2개 군으로 나누어 제1군에는 아무런 처리를 하지 않고, 제2군은 다시 3개 군으로 나누어 2-1군에는 1 μ g/ml, 2-2군에는 10 μ g/ml, 2-3군에는 100 μ g/ml의 톳 추출물을 첨가하였다. 72시간이 경과한 후, 플레이트에서 배지를 제거하고 PBS로 3회 세척한 후, 플레이트에 0.15 % Triton X-100 을 50 μ l 씩 넣은 다음 37°C 배양기에서 30 분간 배양하여 세포를 용해(lysis)시켰다. 그 후, 3,000 rpm에서 5 분간 원심분리한 다음 40 μ l 의 상등액과 0.1 N glycine 40 μ l, 100 mM p-NPP(p-nitrophenylphosphate) 20 μ l 를 첨가한 뒤 37°C 배양기에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 0.1 N NaOH 50 μ l 를 넣어 반응을 정지시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하여 ALP 효소에 의해 p-NPP 가 p-NP(p-nitrophenol)로 전환된 양을 산출함으로써 ALP 활성을 측정하였다.
- [47] 결과는 도 2에 나타내었다. 도 2에서 톳 추출물이 ALP 활성을 증가시키는 것을 알 수 있다(도 2에서, *는 p-value < 0.05을 나타내며, **는 p-value < 0.01을 나타낸다).
- [48] 상기 결과로부터 본 발명의 톳 추출물이 ALP 활성을 증가시켜 치주인대세포 분화를 촉진함을 알 수 있다.
- [49] 실시예 3. 톳 추출물의 광화 촉진 평가
- [50] 치주인대세포는 칼슘을 생산하여 세포 외부로 방출한다. 따라서 치주인대세포를 배양시키는 배지에서 세포 주위로 칼슘이 축적되는 광화작용(mineralization)이 일어난다. 따라서 본 발명의 치주인대세포의 광화작용을 증가시키는지 여부를 평가하였다.

- [51] 인간 치주인대세포(Periodontal ligament progenitor cells (PDLC))를 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum; FBS), 100 IU/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM 배지에 넣고 5% CO₂, 37 °C로 유지되는 세포 배양기에서 배양하였다. 배양된 세포를 24 웰 플레이트에 1×10⁵ cell/ml로 분주하고 다시 상기 세포 배양기에서 24시간 동안 배양하였다.
- [52] 치주인대세포를 활성화시키는 것으로 알려져 있는 아스코르브산 (ascorbic acid)과 베타-글리세로포스페이트 (beta-glycerophosphate)를 각각 50 µg/ml과 10 mM의 농도로 배지에 첨가하여 치주인대세포를 활성화시켰다. 활성화된 세포를 2개 군으로 나누어 제1군에는 어떤 물질도 첨가하지 않고(대조군), 제2군은 다시 4개 군으로 나누어 2-1군에는 1 µg/ml, 2-2군에는 5 µg/ml, 2-3군에는 10 µg/ml, 2-4군에는 50 µg/ml의 톳 추출물을 배양 배지에 첨가하였다. 3일 간격으로 상기 톳 추출물이 포함된 배지로 교환하고 24일 동안 배양하였다.
- [53] 그 후 각 세포를 10% 포르말알데하이드 (neutral formaldehyde) 용액으로 고정한 후, 알리자린 레드-에스 염색 용액 (Alizarin red-S staining solution)에서 5분간 처리하고 세척하여 육안으로 붉은 색의 석회화 결절의 형성여부를 관찰하였다. 결절 형성을 확인한 후 10 mM 소듐 포스페이트(10 % cetylpyridinium chloride, pH 7.0)을 1 ml/well로 첨가하여 ELISA 판독기로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [54] 결과는 도 3에 나타내었다. 도 3에서 톳 추출물이 대조군과 비교하여 1.5배 내지 2배 치주인대세포의 광화 활성을 증가시킴을 알 수 있다(도 3에서, *는 p-value < 0.05을 나타내며, **는 p-value < 0.01을 나타내고, ***는 p-value < 0.001를 나타낸다.).
- [55] 상기 결과로부터 본 발명의 톳 추출물이 치주인대세포의 광화 활성을 증가시켜 골의 광화를 촉진시킴을 확인할 수 있다.
- [56] 실시예 4. 톳 추출물의 치주질환 개선 확인
- [57] 치주질환 개선 여부를 확인하기 위한 동물 모델로 백서에서 치아 결찰을 이용하여 치석형성 및 치조골 손상을 유발하는 모델과 치주염을 유발하는 박테리아(*Entamoeba gingivalis* 등)를 이용하여 치주염을 유발하는 모델이 있다. 본 발명에서는 백서에서의 치아 결찰 동물 모델을 이용한 실험을 통해 톳 추출물의 치주질환 개선 효과를 확인하였다.
- [58] 7주령의 수컷 백서의 좌측 아래 제 2 대구치를 3-0 봉합사를 이용하여 결찰한 후 6주간 결찰 상태를 유지하여 치주염을 유발시켰다. 치주염이 유발된 것을 확인한 다음, 5개 군으로 나누어 1개 군에는 아무것도 투여하지 않고(음성대조군, Control), 1개 군에는 7주간 독시사이클린 매일 20 mg/kg(Doxycycline)을 투여하였고(양성 대조군), 3개 군에는 7주간 톳 추출물(Hizikia Extract, HE)을 각각 매일 50, 100, 200 mg/kg 투여하였다(각각 HE 50, HE 100, HE 200). 한편 치주염을 유발하지 않은 백서를 정상군(Normal)으로 하였다. 7주 후 백서를 희생하여 치조골을 획득하고 Micro-CT를 이용하여 3D

사진을 확보하고, X-레이 사진도 확보하였다.

- [59] 동물실험에서 치주염 개선을 확인하는 방법에는 CEJ-ABC라는 치아의 시멘트질과 에나멜질의 경계에서 치조골간의 거리를 측정하는 방법, 분기 개입(Furcation involvement)이라는 치아의 하단과 치조골간의 거리를 측정하는 방법, 대형동물의 경우 치아와 잇몸간의 벌어짐 정도(pocket depth)를 확인하는 방법이 있는데, 본 발명에서는 CEJ-ABC와 분기 개입(Furcation involvement) 방법을 이용하여 확인하였다. 결과는 도 4a~f에 나타내었다. 도 4b에서 빨간 선으로 표시한 A 및 C가 각각 제1 대구치와 제2 대구치 사이 및 제2 대구치와 제3 대구치 사이의 CEJ-ABC를 나타내고, 빨간 선으로 표시한 B가 분기 개입을 의미한다(그 외 도면에서도 동일). 이 부분의 치조골이 파손되어 벌어짐이 발생하면 치아가 잘 닳이지 않고 그 결과 벌어짐이 심해지는 악순환이 나타난다. 도 4a~f에서 음성 대조군의 경우 치조골이 손실되어 치아가 표면으로 드러나있으나, 톳 추출물 투여군의 경우 투여량이 높을수록 치조골의 손상 정도가 더욱 개선되어, HE200 군의 경우 치조골의 거의 손실되지 않아 치아가 거의 드러나 있지 않은 것을 확인 할 수 있다.

- [60] 또한 도 4a~f의 3D 사진을 이용하여 CEJ-ABC 값과, 분기 개입 값을 측정하여 통계처리한 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에서 음성 대조군에 비하여 톳 추출물 투여군에서 CEJ-ABC와 분기 개입 지표 수치가 더욱 낮아짐을 알 수 있으며, 이러한 효과는 톳 추출물의 투여량이 높을수록 더욱 우수하게 나타남을 알 수 있다.

- [61] 상기 결과로부터 톳 추출물이 동물실험에서 치조골의 손실을 막고 치조골의 재생에 도움을 주어 치주염을 개선하는데 도움이 되는 것을 확인 할 수 있다.

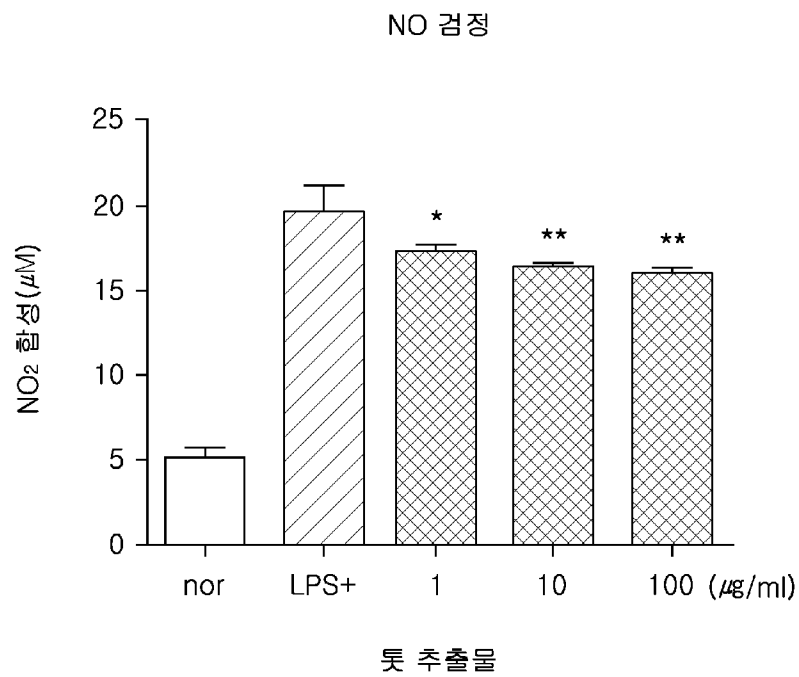
산업상 이용가능성

- [62] 본 발명은 치주질환을 예방, 치료 또는 개선하는데 사용할 수 있다.

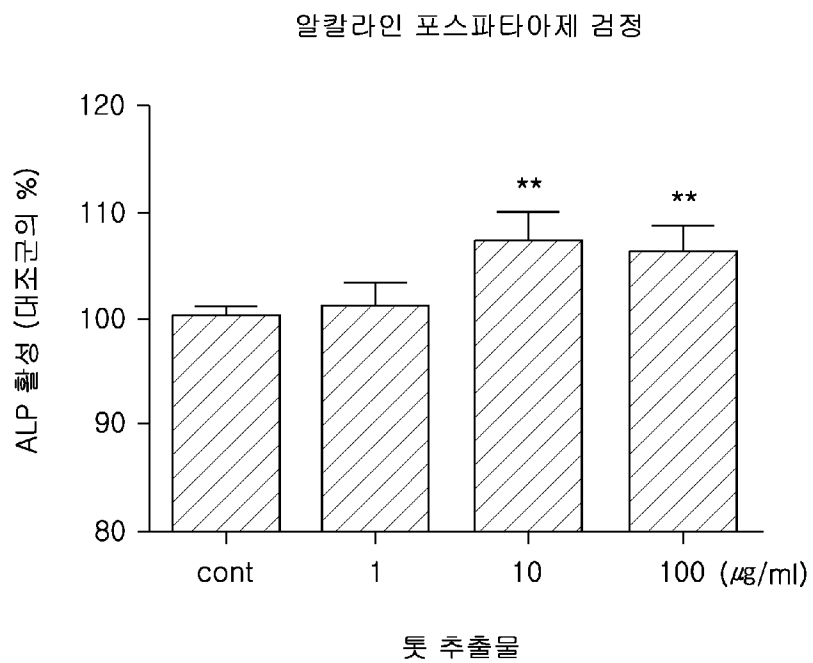
청구범위

- [청구항 1] 톳(*Hizikia Fusiforme*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 치주질환(periodontal disease)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 톳 추출물을 유효성분으로 포함하는 치주질환(periodontal disease)의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 톳 추출물은 톳을 물, C1~C4 알콜, 및 C1~C4 알콜 수용액으로 이루어진 군으로부터 선택된 추출용매로 추출하여 얻어진 추출액, 상기 추출액의 반건조물 또는 건조 분말인 조성물.
- [청구항 4] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 치주질환은 치은염(gingivitis), 치주염(periodontal inflammation), 치조골 파손(alveolar bone breakage), 또는 치조골형성장애(alveolar bone osteodystrophy)인 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 치조골형성장애는 치조골다공증(alveolar bone osteoporosis), 치조골연화증(alveolar bone osteomalacia), 또는 치조골감소증(alveolar bone osteopenia)인 조성물.
- [청구항 6] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 경구투여용인 조성물.

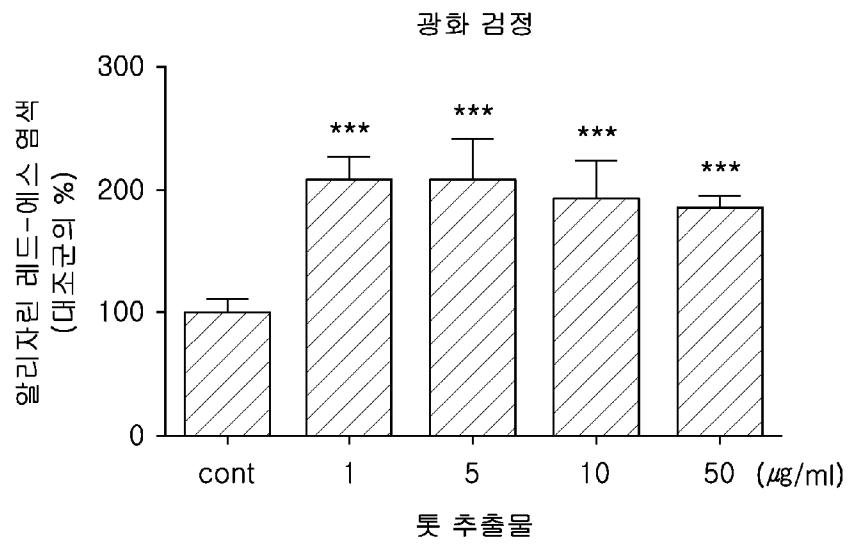
[Fig. 1]



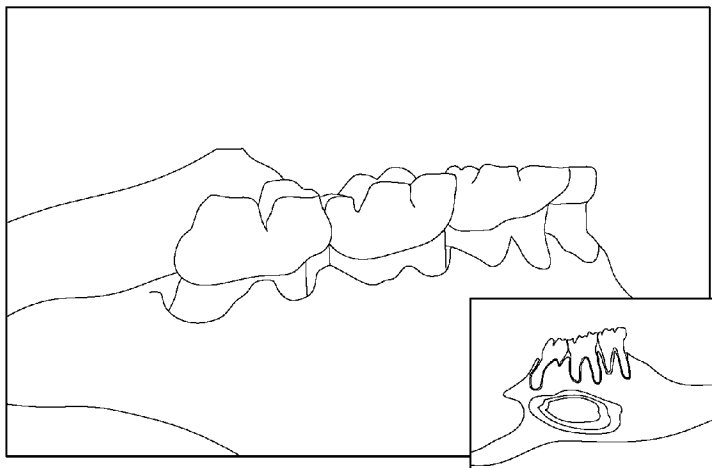
[Fig. 2]



[Fig. 3]

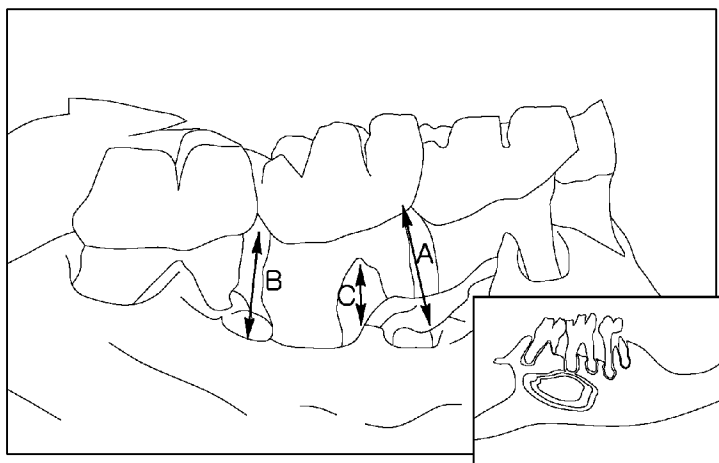


[Fig. 4a]



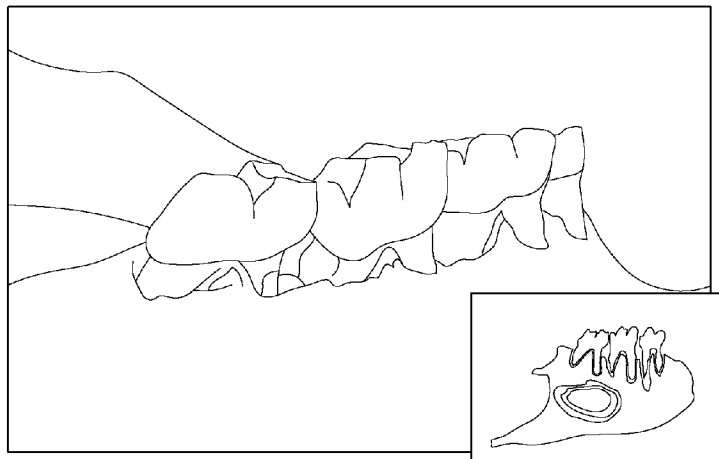
정상

[Fig. 4b]



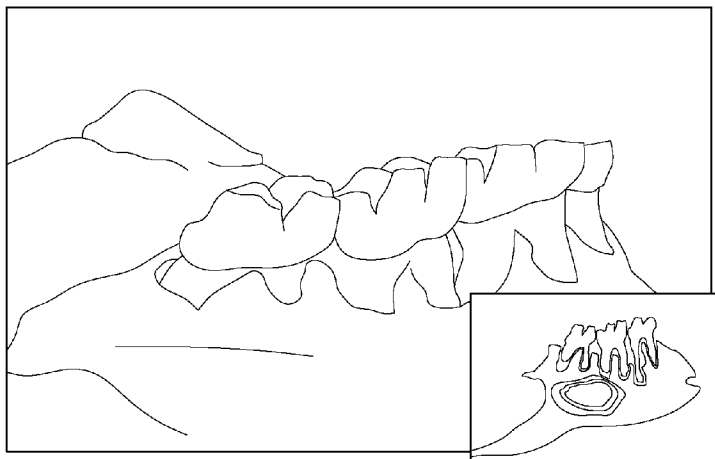
대조군

[Fig. 4c]



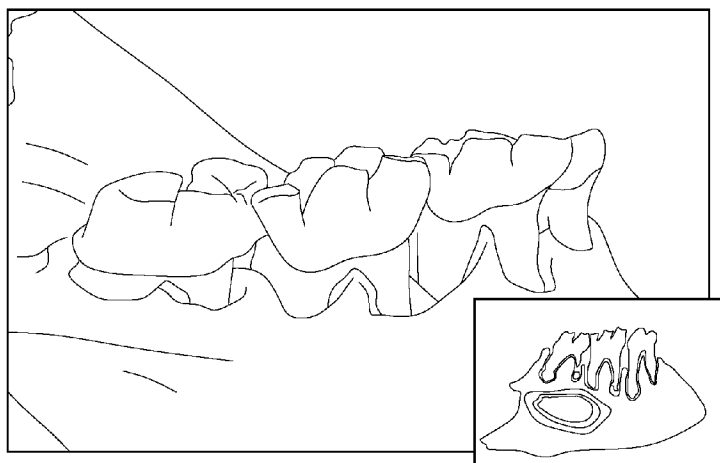
Doxy

[Fig. 4d]



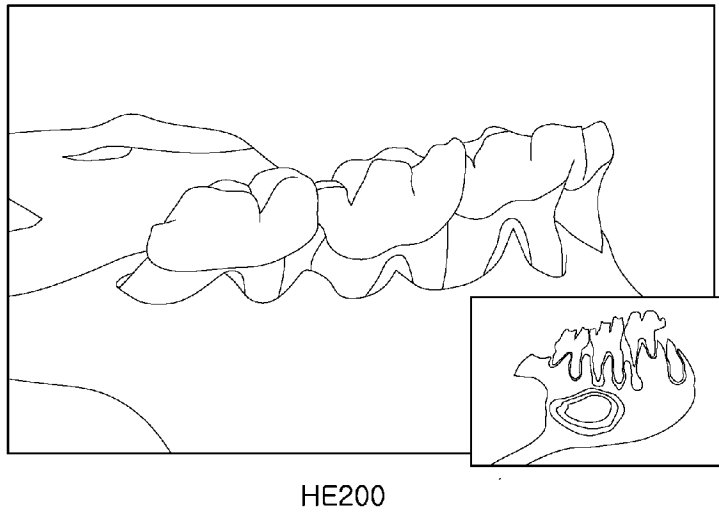
HE50

[Fig. 4e]

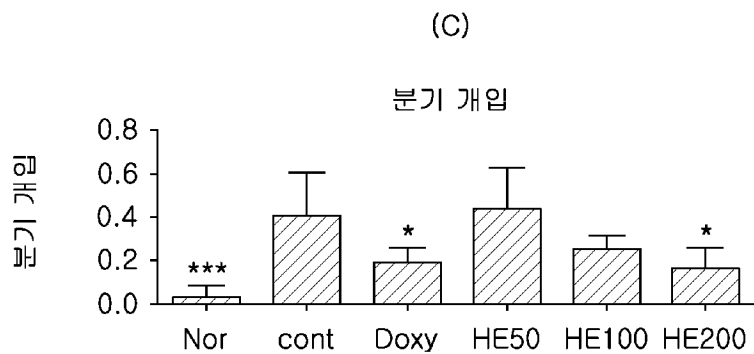
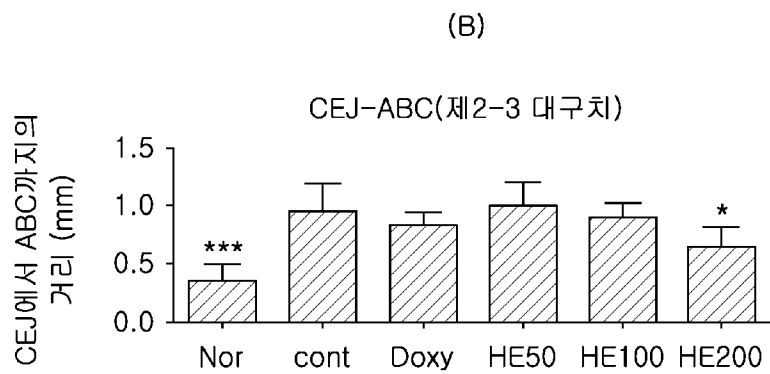
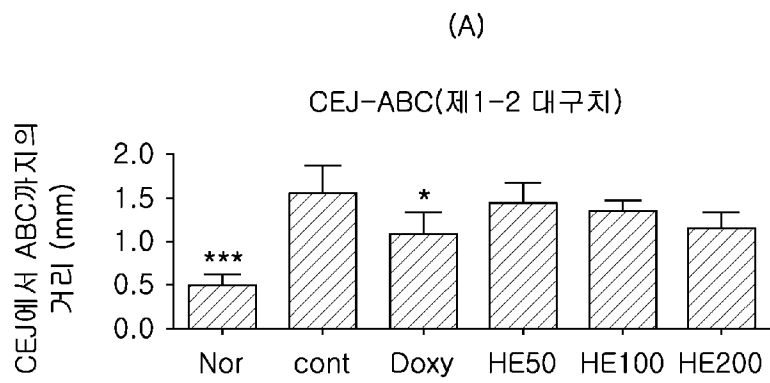


HE100

[Fig. 4f]



[Fig. 5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/007895

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 36/03(2006.01)i, A61P 1/02(2006.01)i, A61P 1/00(2006.01)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 36/03; A61P 29/00; A23L 3/44; A23L 1/337; A61K 36/06; A61P 1/02; A61P 1/00

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: Hizikia fusiforme, extract, periodontal disease, inflammation, periodontal, gingiva, teeth, alveolarbone, osteoporosis, osteomalacia, osteopenia, Hizikia Fusiforme, extract, periodontal, gingivitis, osteoporosis, osteomalacia, alveolarbone, osteopenia

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HUH, GYU-WON et al. Fucosterols from Hizikia fusiformis and Their Proliferation Activities on Osteosarcoma-derived Cell MG63. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 2012, Vol. 55, pp. 551-555 See abstract; page 302, "Alkaline phosphatase (ALP) activity" part; page 303, "The effect of Alkaline phosphatase (ALP) activity" part.	1-6
X	JEON, MIN-HEE et al. Effect of Hijikia fusiforme Fractions on Proliferation and Differentiation in Osteoblastic MC3T3-E1 Cells. Journal of Life Science. 2011, Vol. 21, No. 2, pp. 300-308 See page 300, left column first paragraph - right column, second paragraph; page 552, left column, first paragraph - second paragraph.	1-6
X	KR 10-2010-0131809 A (JEJU TECHNOPARK) 16 December 2010 See abstract; claims 1-7; tables 1-3.	1-6
A	KR 10-1305621 B1 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 09 September 2013 See the entire document.	1-6
A	KR 10-2013-0054518 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, CHOSUN UNIVERSITY et al.) 27 May 2013 See the entire document.	1-6



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

07 SEPTEMBER 2015 (07.09.2015)

Date of mailing of the international search report

09 SEPTEMBER 2015 (09.09.2015)

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. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/007895

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2010-0131809 A	16/12/2010	KR 10-1110064 B1	14/03/2012
KR 10-1305621 B1	09/09/2013	KR 20120107800 A	04/10/2012
KR 10-2013-0054518 A	27/05/2013	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 36/03(2006.01)i, A61P 1/02(2006.01)i, A61P 1/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 36/03; A61P 29/00; A23L 3/44; A23L 1/337; A61K 36/06; A61P 1/02; A61P 1/00

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: 톳, 추출, 치주질환, 염증, 치주, 치은, 이, 치조골, 골다공증, 골연화증, 골감소증, Hizikia Fusiforme, extract, periodontal, gingivitis, osteoporosis, osteomalacia, alveolarbone, osteopenia

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	HUH, GYU-WON 등. Fucosterols from Hizikia fusiformis and Their Proliferation Activities on Osteosarcoma-derived Cell MG63. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 2012, Vol. 55, pp. 551-555 초록; 페이지 302, `Alkaline phosphatase (ALP) 활성` 부분; 페이지 303, `Alkaline phosphatase (ALP) 활성에 미치는 영향` 부분 참조.	1-6
X	JEON, MIN-HEE 등. Effect of Hizikia fusiforme Fractions on Proliferation and Differentiation in Osteoblastic MC3T3-E1 Cells. Journal of Life Science. 2011, Vol. 21. No. 2. pp. 300-308 페이지 300, 왼쪽 컬럼 첫 번째 단락- 오른쪽 컬럼, 두 번째 단락; 페이지 552, 왼쪽 컬럼, 첫 번째 단락 - 두 번째 단락 참조.	1-6
X	KR 10-2010-0131809 A (재단법인 제주테크노파크) 2010.12.16 요약; 청구항 1-7; 표 1-3 참조.	1-6
A	KR 10-1305621 B1 (경희대학교 산학협력단) 2013.09.09 문서 전체 참조.	1-6
A	KR 10-2013-0054518 A (조선대학교산학협력단 등) 2013.05.27 문서 전체 참조.	1-6

☐ 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

2015년 09월 07일 (07.09.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 09월 09일 (09.09.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

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

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

이정아

전화번호 +82-42-481-8740



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2010-0131809 A	2010/12/16	KR 10-1110064 B1	2012/03/14
KR 10-1305621 B1	2013/09/09	KR 20120107800 A	2012/10/04
KR 10-2013-0054518 A	2013/05/27	없음	