



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0135652
(43) 공개일자 2019년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/32 (2015.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 36/232 (2006.01) A61K 36/286 (2006.01)
A61K 36/35 (2006.01) A61K 36/40 (2006.01)
A61K 36/835 (2006.01) A61P 19/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/32 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0060912

(22) 출원일자 2018년05월29일

심사청구일자 2018년05월29일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김봉이

서울특별시 강동구 진향도로47길 43, 701호(길동, 상스빌)

박문여

서울특별시 강서구 공항대로58나길 71, 3층(등촌동)

(74) 대리인

위병갑

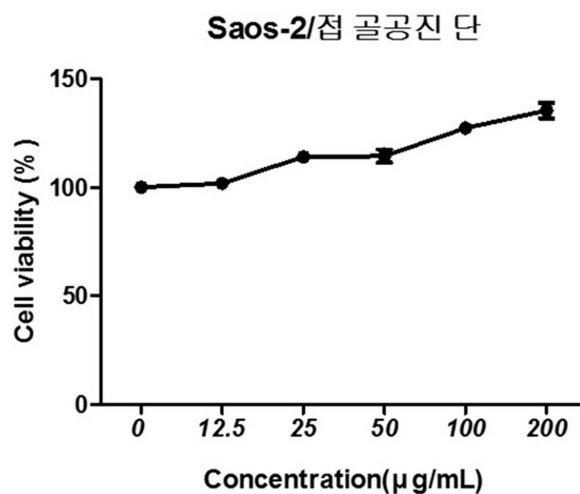
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **접골공진단을 포함하는 골 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 골 재생 및 골 세포 분화를 위한 접골공진단을 포함하는 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 녹용, 당귀, 산수유, 홍화자, 접골목 및 침향을 혼합하여 제조된 접골공진단 추출물은 조골세포에서 골세포로의 분화를 유도하고, 골형성(osteogenesis) 관련 유전자 및 단백질의 발현을 증가시켜, 골형성 및 골세포 분화 촉진 효과를 나타냄으로써, 골 관련 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 36/232 (2013.01)
A61K 36/286 (2013.01)
A61K 36/35 (2013.01)
A61K 36/40 (2013.01)
A61K 36/835 (2013.01)
A61P 19/08 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/306 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2016R1D1A1B03933656
부처명	교육부, 미래창조과학부
연구관리전문기관	경희대학교 산학협력단
연구사업명	이공학개인지초연구지원
연구과제명	Scaffold를 이용한 접골산 및 접골공진단의 골 재생 기전 연구
기 여 율	1/1
주관기관	한국연구재단(학술진흥)
연구기간	2017.11.01 ~ 2018.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

녹용, 당귀, 산수유, 홍화자, 접골목 및 침향 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은 침향 1.0 중량부를 기준으로 녹용 6 내지 10 중량부, 당귀 6 내지 10 중량부, 산수유 6 내지 10 중량부, 홍화자 0.1 내지 4.0 중량부 및 접골목 0.1 내지 4.0 중량부를 혼합한 혼합물을 추출하여 제조되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 탄소수 4의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 추출물은 에탄올로 추출한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 추출물은 골형성(osteogenesis) 관련 유전자 또는 단백질의 발현을 촉진시키는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 추출물은 조골세포(osteoblast)에서 골세포(osteocyte)로의 분화를 촉진시키는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 골 관련 질환은 골다공증, 골 형성 부전증, 골연화증, 골량 감소증, 골절, 골 결손, 고관절 감소증, 골관절염, 퇴행성 관절염, 무릎관절증, 고관절증, 전신 홍반루푸스(SLE), 척추관절염, 류마티스성 다발성 근육통, 강직성 척추염, 라이터 증후군, 건선성 관절병증, 장병성 관절염, 류마티스 관절염, 신경병관절병증, 급성 류마티스 열, 통풍, 연골석회화증, 치조골 파괴에 의한 치주질환, 염증성 치조골 흡수질환, 염증성 뼈 흡수질환, 칼슘 수산화인회석 결정 침전 질환 및 라임 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 골 관련 질환은 골다공증인 것인 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 인공골, 인공관절, 골 고정재, 골 대체제, 골 수복재, 골 충전재 및 골 이식재로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 물질에 사용되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 10

녹용, 당귀, 산수유, 홍화자, 접골목 및 침향 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 11

녹용, 당귀, 산수유, 홍화자, 접골목 및 침향 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 골 재생 및 골 세포 분화를 위한 접골공진단을 포함하는 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 녹용, 당귀, 산수유, 홍화자, 접골목 및 침향 추출물의 조골세포 및 골세포 분화 유도 및 골 형성 관련 유전자와 단백질 발현 촉진으로 인한 골 재생 및 골 세포 분화 촉진 효과에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 국내에서의 뼈, 연골을 치료하기 위한 시장은 약 900억원의 큰 시장의 규모를 형성하고 있다. 이에, 많은 관련 제품과 이식재료에 대하여 다양한 연구와 개발이 진행되고 있다. 또한, 고령화가 되면서 노인환자들에게 골절이 빈번하게 일어나고 있고, 장년이나 청년에 비해 회복의 시기가 늦어짐으로써 그로 인한 합병증과 더불어 경제적 부담도 매우 크기 때문에, 기존의 골 재생을 위해 치료약을 복용하는 방법과 함께, 골절부위에 scaffold나 membrane에 encapsulation을 해서 전달하는 것을 병행함으로써 과도한 약물 복용으로 인한 부작용의 가능성을 줄이고 효과적인 전달을 통해 회복의 시기를 단축시키기 위한 목적으로 TGF-beta, BMP 등의 성장인자, 이를 이용한 전달방법 및 전달 재료에 대해서도 많은 연구가 진행되고 있다.

[0003] 골 재생의 일반적인 회복과정을 살펴보면 골절이 된 후 빠르게 일주일 이내에 염증반응이 일어나게 된다. 손상된 혈관에서 염증성 삼출액이 분비되며 골절된 뼈 주의조직은 괴사가 일어나게 된다. 이때, 파골세포(osteoclasts)들은 괴사된 뼈 주변 조직을 제거한다. 그 다음 부드러운 캘러스 단계가 진행되어, 통증과 부종이 가라앉으면서 캘러스 층이 생기고, 섬유성 조직 및 연골의 생성과 더불어서 혈관이 자라나기 시작한다. 캘러스 내의 모세혈관의 성장은 혈류를 증가시키며 캘러스를 통하여 mesenchymal progenitor cell들이 확산되고 여러 세포들의 상호작용과 함께 재생을 하기 시작한다. 그리고 단단한 캘러스 단계로 넘어가게 되어, 연골 내 골화로 인해 연부조직 내 틈은 원래의 코엑스를 이어주는 woven 골로 대체된다. 그리고 리모델링이 일어나는데 이 과정은 몇 년 동안에 걸쳐 골절부위에서 일어나는 모든 과정과 더불어서 회복과정을 의미한다.

[0004] 뼈는 mineralized connective tissue로서, 이들 tissue에 조골세포(osteoblasts), 골표면세포(bone lining cells), 골세포(osteocytes), 파골세포(osteoclasts) 등 다양한 세포들이 존재하여야만 만들어질 수 있다. 이러한 조골세포 및 골세포들은 뼈의 세포 외 기질(Extra Cellular Matrix, ECM)을 collagenous matrix로 만들고 나서 mineralization화 하기 위해 crystalline hydroxyapatite들을 골의 ECM에 축적한다. 뼈의 mineralized tissue ECM에 조골세포들은 다양한 상태로 존재하게 되며, apoptosis를 하거나 골표면세포, 골세포로 분화된다. 분화된 골세포들은 골 mineralized tissue ECM에서 항상성을 유지하기 위해 조골세포들과 파골세포들을 자극하는 기능을 한다. 그러므로 골세포로의 분화 유도는 골 재생을 위한 가장 효과적인 방법으로 이용된다.

[0005] 한편, 골 세포로의 분화를 확인하기 위한 실험에서는 Saos-2 세포가 사용되고 있다. 골육종 세포(osteosarcoma cells)인 Saos-2 세포는 조골세포와 유사한(osteoblast-like) 성격을 가지고 있으며, 특히, osteogenic markers, ALP(alkaline phosphatase), OPN(osteopontin), COL1(Collagen type1), BMP(Bone morphogenetic protein) 등 골 분화와 형성에 중요한 유전자 및 단백질들의 발현이 나타나므로, 골세포 분화실험들에서 유전자들의 발현 양을 상대적으로 비교하기 위해서 많이 이용되고 있다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 골분화 유도 시기를 단축시킬 수 있는 새로운 골질환 치료제를 개발하기 위한 연구를 수행한 결과, 여러 한약재들을 조합한 추출물이 Saos-2 세포에서 조골세포에서 골세포로의 분화를 유도하고, 골형성 관련 유전자들 및 단백질의 발현을 증가시켜 골 분화를 촉진시킬 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1193540호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 녹용, 당귀, 산수유, 홍화자, 접골목 및 침향을 포함하는 접골공진단 추출물이 골분화를 유도하고 ALP, COL 및 OPN의 유전자 발현 및 BMP-2 단백질 발현을 증가시켜 골형성을 촉진하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 녹용, 당귀, 산수유, 홍화자, 접골목 및 침향 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물, 건강기능식품 조성물 및 건강식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0014] 본 발명은 녹용, 당귀, 산수유, 홍화자, 접골목 및 침향 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 녹용, 당귀, 산수유, 홍화자, 접골목 및 침향 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0016] 아울러, 본 발명은 녹용, 당귀, 산수유, 홍화자, 접골목 및 침향 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따르면, 녹용, 당귀, 산수유, 홍화자, 접골목 및 침향을 혼합하여 제조된 접골공진단 추출물은 조골세포에서 골세포로의 분화를 유도하고, 골형성(osteogenesis) 관련 ALP, OPN 및 COL1 유전자들의 발현 및 BMP-2 단백질 발현을 촉진하며, 골형성 및 골세포 분화를 촉진하는 효과를 나타냄으로써, 골 관련 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 접골공진단 추출물 처리에 의한 조골세포-유사 세포주 Saos-2의 세포 생존율을 확인한 결과이다.

도 2는 접골공진단 추출물 처리에 의한 Saos-2의 세포 모양 변화를 확인한 결과이다.

도 3은 접골공진단 추출물 처리에 의한 Saos-2 세포에서의 골분화 관련 유전자(ALP, OPN 및 COL1)의 발현 변화를 확인한 결과이다; (a) ALP 유전자 Fold changes 측정 결과, (b) OPN 유전자 Fold changes 측정 결과 및 (c)

COL1 유전자 Fold changes 측정 결과.

도 4는 접골공진단 추출물 또는 공진단 추출물 처리에 의한 Saos-2 세포에서의 골형성 관련 단백질 BMP-2의 발현을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

골 관련 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물

본 발명은 녹용, 당귀, 산수유, 홍화자, 접골목 및 침향 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 상기 녹용(*Cervi Parvum Cornu*)은 사슴과 사슴속(*Cervidae*)에 속한 매화록(*Cervus nippon Temminck*), 마록(*C. elaphus Linne*) 또는 대록(*C. canadensis Erxleben*)의 숫사슴의 털이 밀생하고 아직 골질화되지 않았거나 약간 골질화 된 어린 뿔을 자른 다음 말린 것이다. 동의보감에서 '녹용은 오장을 강건하게 하고 음위(정력)를 보충해주며 허약체질 면역력 강화에 도움이 된다' 라고 전해오고 있다. 또한, 녹용은 조혈 작용과 혈행 개선 작용을 하며, 혈중 콜레스테롤을 낮춰 동맥경화증 예방과 심혈관 질환을 예방한다.

본 발명의 상기 당귀(*Angelicae gigantis Radix*)는 미나리과(*Umbelliferae*)에 속하는 당귀(*Angelica gigas N.*)의 뿌리이다. 당귀는 동의치료에서 진정약, 강장약으로 빈혈증, 월경불순에 사용하며, 자궁에 대하여 쌍방향 조절작용이 있어 자궁의 근육수축을 강화시킬 수도 있고 이완시킬 수도 있다. 산후회복, 보혈, 양혈의 중요한 약재이며, 기타 부인병에 뛰어난 효과가 있다. 그리고 대장균, 디푸스균 등에 대하여 억제작용을 하는 것으로 알려져 있다.

본 발명의 상기 산수유(*Corni fructus*)는 층층나무과에 속하는 산수유나무(*Cornus officinalis*)의 과육으로, 가을에 성숙한 붉은색 열매의 씨를 제거한 건조한 과육을 산수유라 하며, 예로부터 우리나라를 비롯하여 중국과 일본 등에서 중요한 한약재로 많이 사용되어 왔다. 산수유는 그 맛이 시고 성질은 따뜻하며, 다뇨증, 요통, 이명 및 폐결핵 등의 치료제로 사용되어 왔으며, 그 과실은 자양, 강장, 음위 및 이조에 약효가 있고, 간경화와 신경에 좋고, 이뇨작용, 혈압강화작용, 항암 및 항균 작용 등의 약리작용이 있다고 한방자료에 기록되어 있다.

본 발명의 상기 홍화자(*Carthami Semen*)는 홍화(*Carthamus tinctorius L.*)의 씨로 잇꽃의 종자가 성숙한 여름철에 채취하고 별에 건조하여 약제로 쓰는데, 성질이 따뜻하고 맛이 달다. 홍화자에 대한 한방의 기록은 홍화의 약능과 같은 이혈작용에 관하여 알려져 있으며, 최근에는 관상 동맥 확장 및 혈압을 낮추는 작용이 있으며 고콜레스테롤혈증을 향상시키고 혈전을 치료하는 효과가 있다고 보고된 바 있고, 미백 및 피지분비조절 효과가 있는 것으로도 알려져 있다.

본 발명의 상기 접골목(*Sambuci Lignum*)은 인동과 식물인 딱총나무(*Sambucus williamsii*) 또는 동속 근연식물의 줄기 및 가지를 말린 것이다. 한방과 민간에서는 신경통, 발한, 이뇨, 폐염, 수종, 해열, 신경염 등에 사용하는 약재로 알려져 있다. 접골목은 혈액순환을 좋게 하며 통증을 멎게 하는 효능이 있고, 두드러기 및 피부 가려움증에도 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다.

본 발명의 상기 침향(*Aquilariae Resinatum Lignum*)은 침향 나무(*Aquilaria agallocha Roxburgh*)에 천연적으로 분비된 수지가 침착하여 침향나무의 심재부위에 조직학적으로 단단한 덩어리 모양을 이루고 있는 부분을 말한다. 침향은 한국, 중국, 일본 등에서는 예로부터 피부 소양, 복통, 천식 등의 치료에 사용되어 왔으며 진정, 건위, 소화불량, 식욕부진 등에 전통약재로 사용되고 있다. 최근 연구에서 항알러지, 항균, 항산화 등의 효능이 보고되었다.

본 발명에서, 상기 추출물은 침향 1.0 중량부를 기준으로 녹용 6 내지 10 중량부, 당귀 6 내지 10 중량부, 산수유 6 내지 10 중량부, 홍화자 0.1 내지 4.0 중량부 및 접골목 0.1 내지 4.0 중량부를 혼합한 혼합물을 추출한 것일 수 있다. 바람직하게는, 침향 1.0 중량부를 기준으로 녹용 7 내지 9 중량부, 당귀 7 내지 9 중량부, 산수유 7 내지 9 중량부, 홍화자 1 내지 3 중량부 및 접골목 1 내지 3 중량부를 혼합한 혼합물을 추출한 것일 수 있다. 본 발명의 일실시예에서는, 침향 1 중량부를 기준으로 녹용 8 중량부, 당귀 8 중량부, 산수유 8 중량부, 홍화자 2 중량부, 접골목 2 중량부를 혼합하여 환 형태로 제조한 것을 '접골공진단(Jeobgolgongjindan)'이라 명명

하였고, 상기 접골공진단을 추출하여 접골공진단 추출물을 제조하였다. 상기 접골공진단은 녹용, 당귀, 산수유 및 침향으로 제조되는 것으로 알려진 공진단에 홍화자 및 접골목을 더 혼합한 것을 의미하는 것일 수 있다.

[0034] 본 발명에서 사용되는 용어 "추출물(extract)"은 생약을 적절한 침출액으로 짜내고 침출액을 증발시켜 농축한 제제를 의미하는 것으로, 이에 제한되지는 않으나, 추출처리에 의해 얻어지는 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 이들의 조정제물 또는 정제물일 수 있다. 상기 추출물은 통상의 기술분야에 공지된 일반적인 추출방법, 분리 및 정제방법을 이용하여 제조할 수 있다. 상기 추출방법으로는, 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게 열탕 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 방법을 사용할 수 있다.

[0035] 본 발명에서, 상기 추출용매는 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매 등을 사용할 수 있으며, 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 4의 알코올이나, 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매, 헥산 또는 디크로로메탄의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매를 사용할 수 있다. 또한, 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 탄소수 4의 알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 에탄올을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 용매로서 100% 에탄올을 이용하여 추출한 뒤 감압 농축한 추출물을 제조하였다.

[0037] 본 발명에 따른 상기 추출물은 골형성(osteogenesis) 관련 유전자와 단백질들의 발현을 촉진시키는 것을 특징으로 할 수 있고, 조골세포(osteoblast) 및 골세포(osteocyte)로의 분화를 촉진시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0038] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 골 질환의 예방 또는 치료는 골형성 관련 유전자와 단백질들의 발현 증가 및 조골세포에서 골세포로의 분화 촉진으로 인한 골 재생 및 골 분화 유도를 통해 달성될 수 있다.

[0039] 본 발명의 일 실시예에서는 접골공진단 추출물 처리에 의해 조골세포 유사 세포 Saos-2가 조골세포 또는 골세포로의 분화가 유도됨을 확인하였으며(실험예 2 및 도 2 참조), 골형성 관련 유전자 ALP, COL 및 OPN의 발현이 증가하는 것을 확인하였고(실험예 3 및 도 3 참조), 골형성 관련 단백질 BMP-2 발현이 증가하는 것을 확인함으로써(실험예 4 및 도 4 참조), 본 발명의 접골공진단 추출물이 골형성 관련 유전자와 단백질들의 발현을 촉진시키고, 골형성 및 골세포 분화를 촉진시킴으로써, 골 관련 질환을 예방 또는 치료할 수 있음을 확인하였다.

[0041] 본 발명에서, 상기 골 관련 질환은 골다공증, 골 형성 부전증, 골연화증, 골량 감소증, 골절, 골 결손, 고관절 감소증, 골관절염, 퇴행성 관절염, 무릎관절증, 고관절증, 전신 홍반루푸스(SLE), 척추관절염, 류마티스성 다발성 근육통, 강직성 척추염, 라이터 증후군, 건선성 관절병증, 장병성 관절염, 류마티스 관절염, 신경병관절병증, 급성 류마티스 열, 통풍, 연골석회화증, 치조골 파괴에 의한 치주질환, 염증성 치조골 흡수질환, 염증성 뼈 흡수질환, 칼슘 수산화인회석 결정 침전 질환 및 라임 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게는 골다공증, 골 형성 부전증, 골연화증, 골량 감소증, 골절, 골 결손, 고관절 감소증 등을 포함하는 대사성 골 질환 또는 정형외과적 골 질환일 수 있으며, 골다공증인 것이 바람직하다.

[0042] 상기 "대사성 골 질환"은 파골세포의 과다한 생성 또는 활성으로 인해 나타나는 상태 또는 질병을 의미하는 것으로, 골량 저하 질환을 포함할 수 있다. 상기 골량 저하 질환이란 골밀도의 저하, 골조직의 연화 등의 증상을 수반하는 골량의 저하가 나타나는 상태 또는 질환을 의미한다.

[0043] 상기 "치주질환"은 치조골 또는 상기 치조골을 치은에 지지 및 결합시키는 치조골 주변조직에 영향을 미치는 질환을 포괄적으로 의미하며, 더욱 구체적으로, 상기 치조골 또는 치조골 주변조직에 감염된 치주균에 의하여 분비되는 병독성 대사산물에 의하여 치아의 구조와 치은의 세포조직이 손상되고, 치은조직의 면역력을 약화시키는 병변이 발생되며, 치주균이 증식하여 병변 부위가 반복적으로 확장되는 질환을 의미할 수 있다.

[0045] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 골 관련 질환의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 골 관련 질환의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

- [0046] 본 발명의 추출물은 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있으며, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.
- [0047] 상기 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스테레이트 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.
- [0048] 상기 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 일실시예에 따르면, 본 발명의 추출물은 환 형태로 제조하여 경구 투여되는 것일 수 있다(실시예 1 참조).
- [0050] 본 발명의 추출물의 인체에 대한 효과적인 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로 약 0.001-100 mg/kg/일이며, 바람직하게는 0.01-35 mg/kg/일이다. 몸무게가 70kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.07-7000 mg/일이며, 바람직하게는 0.7-2500 mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.
- [0052] 또한, 본 발명의 상기 약학적 조성물은 골 관련 질환의 예방 또는 치료를 위하여, 인공골, 골 고정제, 골 대체제, 골 수복제, 골 충전제 또는 골 이식재에 적용되기 용이한 형태로 제조될 수 있다.
- [0053] 예컨대, 상기 골 이식재나 골 대체체는 협의로는 골 조직 내의 공간을 충전하기 위하여 사용될 수도 있고, 광의로는 뼈나 치아의 일부를 대체하는데 사용될 수 있으므로, 상기 약학적 조성물은 압착, 압축, 가압접촉, 패킹, 압박, 굳힘 등의 방법을 사용하여 퍼티, 페이스트, 주형 가능한 스트립, 블록, 칩 등의 형태로 사용될 수 있고, 화학적 첨가물을 이용하여, 겔, 과립, 페이스트, 정제, 펠렛 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 분말 형태로도 사용될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0055] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 골 재생 또는 골 이식 보조제로 사용될 수 있다. 상기 골재생 또는 골이식 보조제는 본 발명의 추출물을 뼈의 세포 외 기질(Extra Cellular Matrix, ECM)을 재생할 수 있도록 하는 osteoblasts, osteocytes로의 조골세포와 골세포로의 분화를 유도하는 growth factors 대체제로 사용되는 것일 수 있고, scaffold나 membrane에 encapsulation하여 골절 부위에 부착하거나 implant 되어 전달체에 의해 전달되어 이식되는 형태로 사용되는 것일 수 있다.
- [0057] **건강기능성식품 및 건강식품 조성물**
- [0058] 본 발명은 녹용, 당귀, 산수유, 홍화자, 접골목 및 침향 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0059] 본 발명에서 사용되는 용어 "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 통상의 기술분야에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 건강기능식품의 제형은 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 건강기능식품은 골 관련 질환 치료제

의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

- [0060] 본 발명의 조성물을 건강기능식품 조성물 또는 건강식품 조성물로 사용하는 경우, 상기 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상의 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 상기 조성물은 유효성분 이외에 식품학적으로 허용 가능한 식품보조첨가제를 포함할 수 있으며, 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다.
- [0061] 본 발명에서 사용되는 용어 "식품보조첨가제"란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 건강기능식품 또는 건강식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 식품보조첨가제의 예로는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의 식품보조첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.
- [0062] 또한, 본 발명의 조성물이 사용될 수 있는 건강기능식품 또는 건강식품의 종류에는 제한이 없다. 아울러 본 발명의 추출물을 활성성분으로 포함하는 조성물은 당업자의 선택에 따라 건강기능식품에 함유될 수 있는 적절한 기타 보조 성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림 류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 추출물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 상기 추출물은 천연 식물을 원료로 하므로 약학적 조성물 또는 식품 조성물로 사용할 경우에도 일반적인 합성 화합물에 비하여 부작용이 덜할 수 있으므로, 안전하게 약학적 조성물, 건강기능식품 및 건강식품에 포함되어 유용하게 사용될 수 있다.
- [0065] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.
- [0067] **<제조예 1> 공진단 및 공진단 추출물의 제조**
- [0068] 녹용, 당귀 및 산수유 각 16g, 침향 2g을 혼합하여 100mesh 이하의 크기로 분말화 한 뒤, 자동제환기를 이용하여 제환하여 공진단을 제조하였다.
- [0069] 제조된 상기 공진단은 100% 에탄올을 용매로 이용하여 20 내지 25℃의 온도에서 일주일 동안 추출한 후, -70 내지 -90℃의 온도에서 24 내지 48시간동안 감압농축하여 공진단 추출물을 제조하였다.
- [0071] **<실시예 1> 접골공진단 및 접골공진단 추출물의 제조**
- [0072] 녹용, 당귀 및 산수유 각 16g, 홍화자 및 접골목 각 4g 및 침향 2g을 혼합하여 100mesh 이하의 크기로 분말화한 뒤, 자동제환기를 이용하여 제환하여 접골공진단을 제조하였다.
- [0073] 제조된 상기 접골공진단은 100% 에탄올을 용매로 이용하여 20 내지 25℃의 온도에서 일주일 동안 추출한 후, -70 내지 -90℃의 온도에서 48시간동안 감압농축하여 접골공진단 추출물을 제조하였다.
- [0075] **<실험예 1> 접골공진단의 Saos-2 세포에 대한 세포 독성 확인**
- [0076] 상기 실시예 1에서 제조한 접골공진단 추출물의 골세포에 대한 독성 및 골세포분화에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 조골세포-유사(osteoblast-like) 세포인 Saos-2(한국세포주은행)를 100μl씩 96-웰 플레이트에 1×10⁴ 세포/웰이 되도록 분주하고, 37℃의 5% CO₂ 인큐베이터(MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)로 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후, 상기 실시예 1에서 제조한 접골공진단 추출물을 12.5, 25, 50, 100 및 200μg/mL 농도로 100μl씩 처리하고, 24시간 동안 인큐베이션 하였다. 인큐베이션한 세포에 EZ-Cytox 시약(DoGen)을 배지의 1/10인 10 μl 처리한 다음, 클린벤치의 불을 끄고 호일을 세포 플레이트에 씌우고 2시간 동안 인큐베이션하였고, 그 후,

마이크로플레이트 리더기(Bio-rad Model 680) 450nm에서의 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 확인하였다.

[0077] 그 결과, 접골공진단 추출물은 200 μ g/mL 농도 이하의 범위에서 Saos-2 세포에 독성이 없는 것으로 나타나, 안전한 약물임을 확인하였고, Saos-2 세포 생존율을 유의하게 증가시키는 것으로 나타나, 접골공진단 추출물 처리에 의해 Saos-2 세포의 활성화 증식이 일어나는 것을 확인하였다(도 1).

[0079] <실험예 2> 접골공진단에 의한 조골세포에서 골세포로의 분화 유도 효과 확인

[0080] 상기 실시예 1에서 제조한 접골공진단 추출물이 조골세포-유사 세포인 Saos-2 세포들에서의 조골세포(osteoblast)에서 골세포(osteocyte)의 분화에 영향을 미치는지 알아보기 위하여, Saos-2 세포들에 접골공진단 추출물을 처리한 후, 세포의 모양 변화를 확인하였다. 구체적으로, Saos-2 세포들에 접골공진단 추출물을 25, 50 및 100 μ g/mL 농도로 처리한 후, 0, 1, 2 및 14일째의 세포의 변화되는 모양을 현미경(ZEISS, Axio, Observer)으로 관측하였다. 이때, 배지는 2~3일마다 갈아주었다.

[0081] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 접골공진단 추출물 처리 후 1일부터 Saos-2 세포의 모양이 조골세포(osteoblast)의 특징인 방추형(spindle shape)으로 서서히 변화가 일어나는 것으로 나타났고, 접골공진단 추출물 처리 14일 후에는 세포들이 골세포(osteocyte)의 특징인 별모양(stellate shape)으로 변화되는 것으로 나타났다. 따라서, 접골공진단 추출물 처리에 의해 Saos-2 세포가 조골세포에서 골세포로의 분화가 유도됨을 확인하였다.

[0083] <실험예 3> 접골공진단에 의한 골형성 관련 유전자 발현 증가 효과 확인

[0084] 접골공진단 추출물 처리에 따른 조골세포-유사 세포주 Saos-2 세포들에서의 ALP, COL 및 OPN의 유전자 발현 정도를 알아보았다. 상기 유전자들은 골형성(osteogenesis)을 촉진하는 것으로 알려진 유전자이다.

[0085] 먼저, Saos-2 세포들을 6-웰 플레이트에 2×10^5 세포/웰로 분주하고, 접골공진단 추출물을 50 μ g/mL 농도로 처리한 다음, 7 및 14일 뒤에 원래 있던 배지를 모두 버리고 세포들에 트리졸(Trizol) 1mL를 넣고 lysis시켰다. 5분 동안 RT(37 $^{\circ}$ C)에서 두고, 5분 동안 최대의 속도로 센트리퓨즈를 돌린 다음, 세포찌거기는 버리고 상층액은 새 튜브로 옮겨 상층액과 클로로포름을 섞어 다시 센트리퓨즈를 돌려서 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액과 70% 에탄올을 섞은 용액을 Qiagen kit의 column tube를 이용해서 prep을 실시하였다. Kit 내에 버퍼를 이용해서 워싱과 RNase free water를 넣고 purified 된 RNA를 회수하였고, 회수된 RNA의 1 μ g을 Prime Script Reverse Transcriptase with Prime ScriptTM 1st strand cDNA Synthesis Kit(Takara, Otsu, Shiga, Japan)을 이용해서 cDNA로 합성하였다.

[0086] 상기 합성된 cDNA 0.5 μ g, 2.5 unit의 Taq 중합효소(TaKaRa TaqTM, Takara, Japan), 1.5 mM dNTP, 1 $\times$ 완충액(10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1 % Triton X-100), 유전자 각각의 정방향(forward) 및 역방향(reverse) 프라이머쌍 20 pmol씩을 섞고 증류수로 총 부피를 10 μ L로 맞춘 다음 기계(TaKaRa Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 PCR 반응을 실시하였다.

[0087] PCR 반응에 이용한 각 프라이머의 시퀀스(sequence)는 하기 표 1에 나타낸 바와 같다. PCR 증폭은 stage1은 95 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 한 사이클을 실시하였고, stage 2는 95 $^{\circ}$ C 5초 및 60 $^{\circ}$ C 10초 변성 과정을 40 사이클을 실시하였으며, stage3은 95 $^{\circ}$ C 15초, 60 $^{\circ}$ C 1분 및 95 $^{\circ}$ C 15초 실시하는 조건으로 수행하였다.

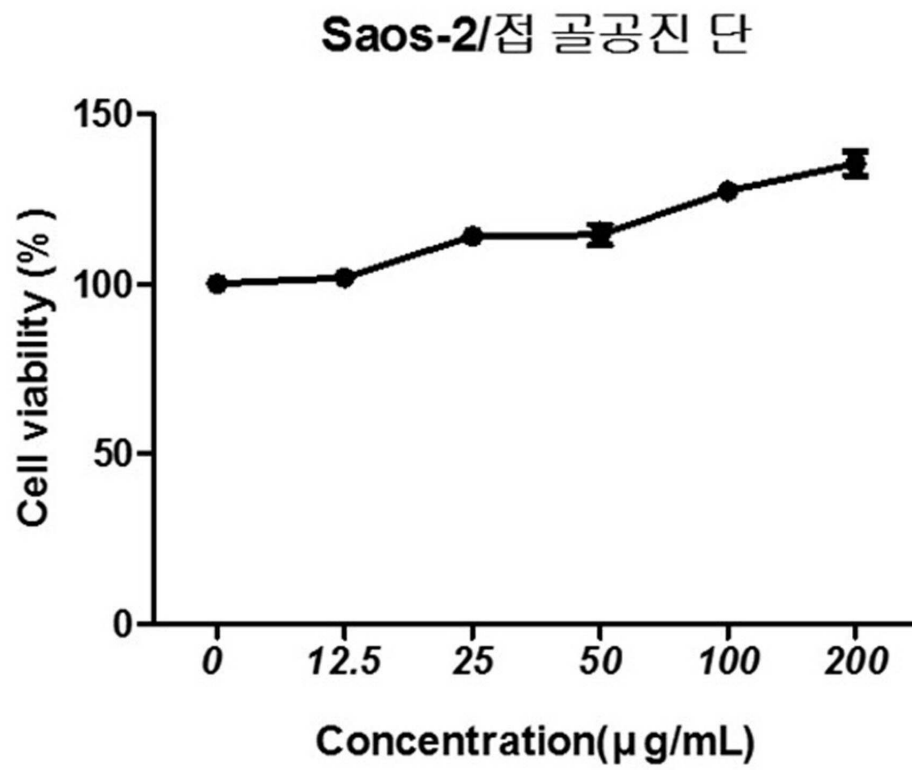
표 1

유전자		프라이머 염기서열(시퀀스)	서열번호
OPN	정방향	5' CAGCCATGAATTTACAGCC-3'	1
	역방향	5' -GGGAGTTTCCATGAAGCCAC-3'	2
CoL1	정방향	5' -TGACCTCAAGATGTGCCACT-3'	3
	역방향	5' -GGGAGTTTCCATGAAGCCAC-3'	4
ALP	정방향	5' -CCTACACGGTCCTCTATAC-3	5
	역방향	5-GGGACACTCAGGGAGCAGTG-3	6

- [0090] PCR의 결과분석은 접골공진단 추출물로 인한 골형성관련 유전자들의 발현의 차이를 비교하였다. 접골공진단 추출물을 처리하지 않은 대조군과 접골공진단 추출물을 처리한 실험군에서 발현차이를 비교 분석하는 fold change를 이용하였다.
- [0092] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 접골공진단 추출물 처리 14일 후에 Saos-2 세포들에서 골분화에 중요한 ALP, OPN 및 COL1 유전자들의 발현이 모두 증가된 것으로 나타났다.
- [0093] 따라서, 본 발명에 따른 접골공진단은 골형성(osteogenesis) 관련 유전자들의 발현을 촉진하며, 골형성 및 골세포 분화를 촉진함을 확인할 수 있었다.
- [0095] <실험예 4> 접골공진단에 의한 골형성 단백질 발현 증가 효과 확인
- [0096] 접골공진단 추출물 처리에 따른 조골세포-유사 세포주 Saos-2 세포들에서의 골형성 단백질 BMP2의 발현 정도를 알아보았다. 상기 단백질은 골형성(osteogenesis)을 촉진하는 것으로 알려진 단백질이다.
- [0097] Saos-2 세포들을 2×10^5 세포/웰로 계산하여 2ml의 배양배지와 함께 6웰에 분주한 후 24시간 배양하였다. 다음날 안정적으로 세포가 부착한 것을 확인한 다음, 상기 실시예 1의 접골공진단 추출물과 제조예 1의 공진단 추출물을 각각 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리한 후, 0, 7 및 14일 동안 배양하였다. 0, 7 및 14일 각 회수 시기마다 배지를 모두 버리고, DPBS로 워싱 한 뒤, scarper를 이용해서 세포들을 회수하였다. 세포들로부터 원하는 단백질들을 분리해 내기 위해 lysis 과정을 실시하였다. 먼저, lysis buffer(RIPA buffer 20mM Tris-Hcl(pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM NaEDTA, 1mM EGTA, 1% NP-40, 1% sodium pyrophosphate, 1mM β -glycerophosphate, 1mM Na_3VO_4 및 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin(Cell signaling)을 $100 \mu\text{l}$ 씩 각각 처리하였다. vortex를 이용하여 10분 간격으로 30분간 3번씩 세포를 파쇄하였고, 이 때, 세포들로부터 분리되어서 나오는 단백질들의 분해를 막기 위해 얼음에 박아두고 진행하였다. 각 샘플들을 $15,520 \times \text{g}$ 에서 15분동안 원심분리를 하여 세포찌꺼기와 단백질들을 분리하였다. 그 다음, western blot으로 단백질들의 크기에 따라 분리한 후, 원하는 단백질을 확인하기 위해, BMP-2(sc-137087) 1차 항체(anti-body)를 붙여서 24시간 처리하고 나서 TBST Buffer로 워싱하였다. 워싱은 15분마다 두 번 TBST Buffer를 갈아주는데 워싱 과정마다 동일하게 진행하였으며, 2차 항체는 1시간 처리하고 나서 다시 TBST Buffer로 워싱하였다. 분리 회수된 단백질들을 RC DCTM Protein Assay Kit II(protein assay kit, Bio-rad, USA)를 이용하여 정량하였다.
- [0098] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, Saos-2 세포에서 공진단 추출물 및 접골공진단 추출물 처리 7일 후에는 BMP-2 단백질 발현 정도가 각각 2배 및 3배 증가된 것으로 나타났고, 14일 후에는 각각 7배 및 14배 증가된 것으로 나타나, 접골공진단 추출물이 공진단 추출물보다 BMP-2 단백질 발현을 더 촉진시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0099] 따라서, 본 발명에 따른 접골공진단은 골형성(osteogenesis) 관련 단백질 BMP-2의 발현을 증가시키며, 일반 공진단보다 더 우수한 골형성 촉진 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.
- [0101] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

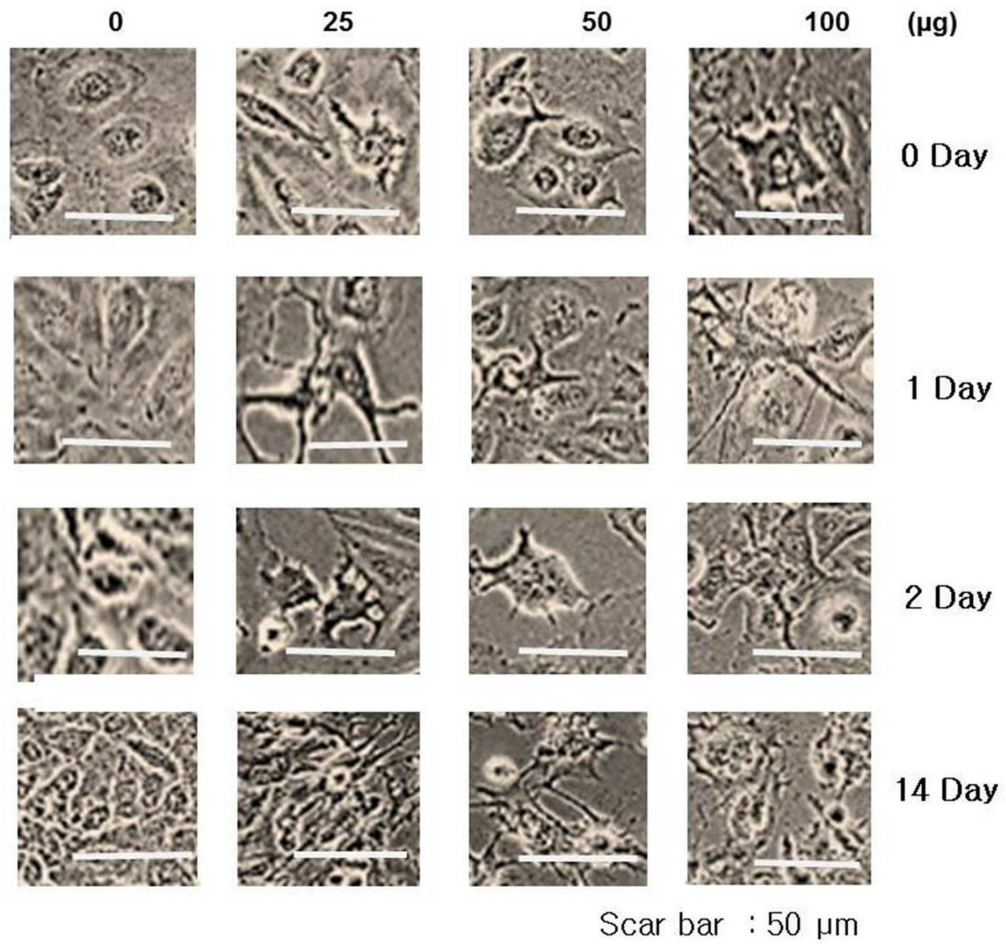
도면

도면1

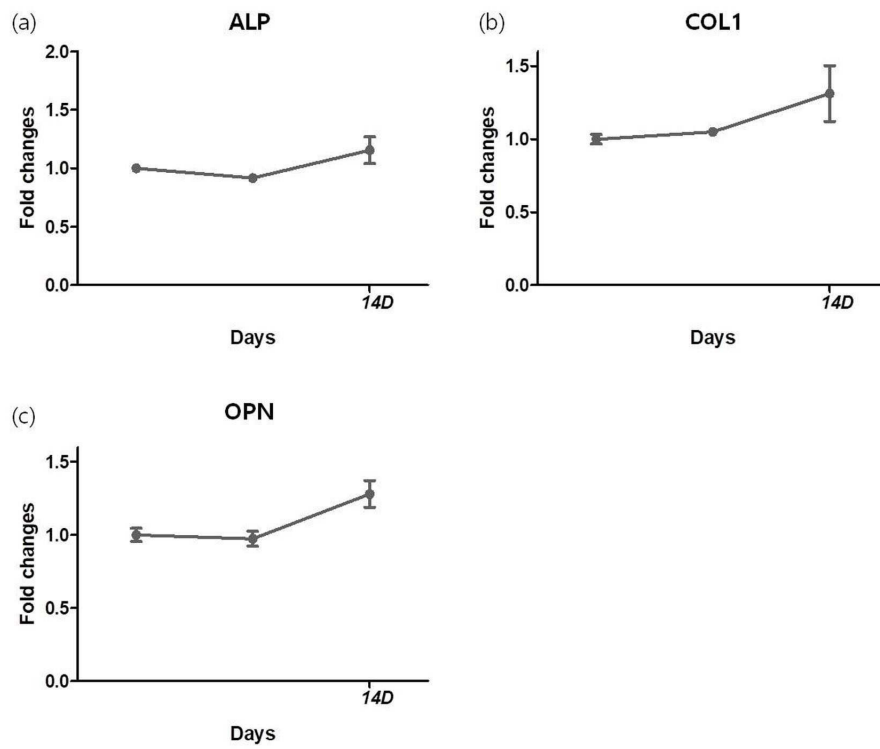


도면2

접골공진단



도면3



도면4

Saos-2

