



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년10월14일
(11) 등록번호 10-1663254
(24) 등록일자 2016년09월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/045 (2006.01) A61K 31/01 (2006.01)
A61K 31/05 (2006.01) A61K 36/48 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/045 (2013.01)
A61K 31/01 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0053871
(22) 출원일자 2015년04월16일
심사청구일자 2015년04월16일
(56) 선행기술조사문헌
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,
2014, vol. 24, pp. 2664~2668*
CN103396299 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경
희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김은철
서울특별시 강남구 영동대로128길 15, 1동 802호
(삼성동, 홍실아파트)
윤형문
서울특별시 성북구 월곡로14길 26, 109동 1603호
(하월곡동, 월곡래미안루나밸리아파트)
박경란
서울특별시 성북구 월곡로14길 26, 109동 1603호
(하월곡동, 월곡래미안루나밸리아파트)
(74) 대리인
특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 7 항

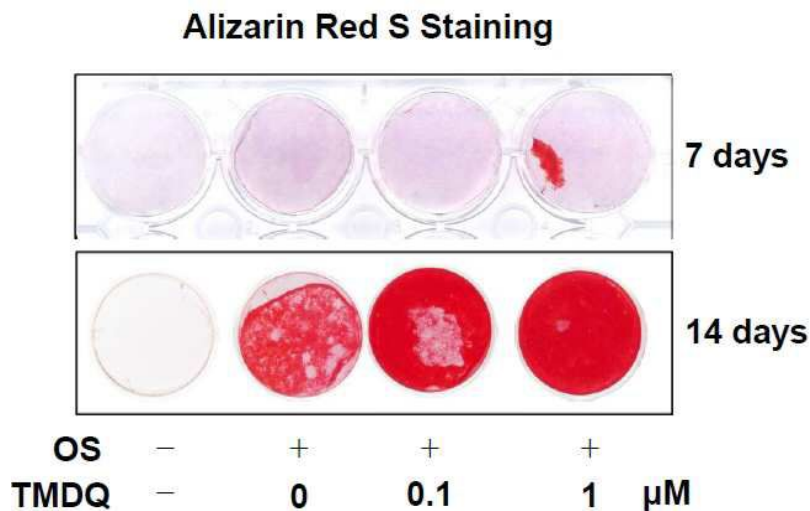
심사관 : 강덕희

(54) 발명의 명칭 신규의 벤젠 유도체를 포함하는 골 형성 촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 신규의 벤젠 유도체를 포함하는 골 형성 촉진용 조성물에 관한 것으로, 신규의 벤젠 유도체 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는 골 형성 촉진용 조성물이 제공된다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 31/05 (2013.01)

A61K 36/48 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A5A2051384

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터지원사업

연구과제명 치아와 치주질환 병리기전 규명 및 제어기술 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2012.09.01 ~ 2016.08.31

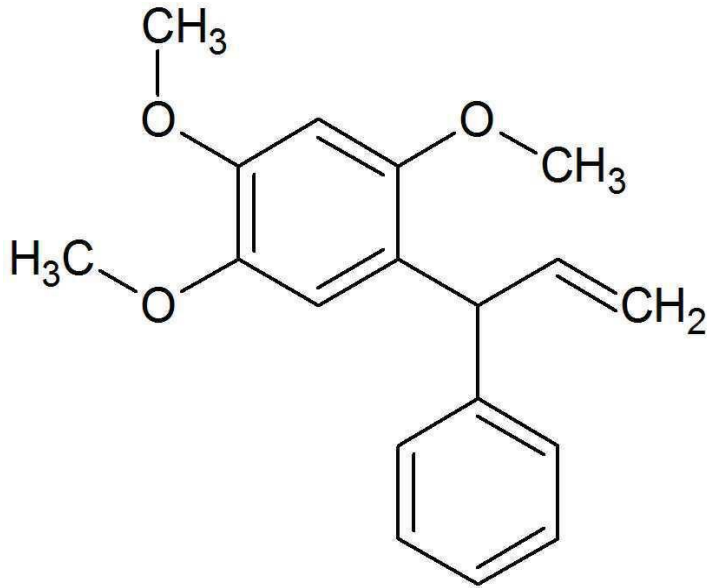
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 2의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는 골 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 2]



청구항 2

제1항에 있어서,

BMP 및 Wnt 신호 경로를 활성화하는 골 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화학식 2의 화합물은 강진향 추출물로부터 분리된 골 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 골 질환은 골다공증, 골 형성 부전증, 골연화증, 골량 감소증, 골절, 골 결손 및 고관절 감소증으로 이루

어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 골 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

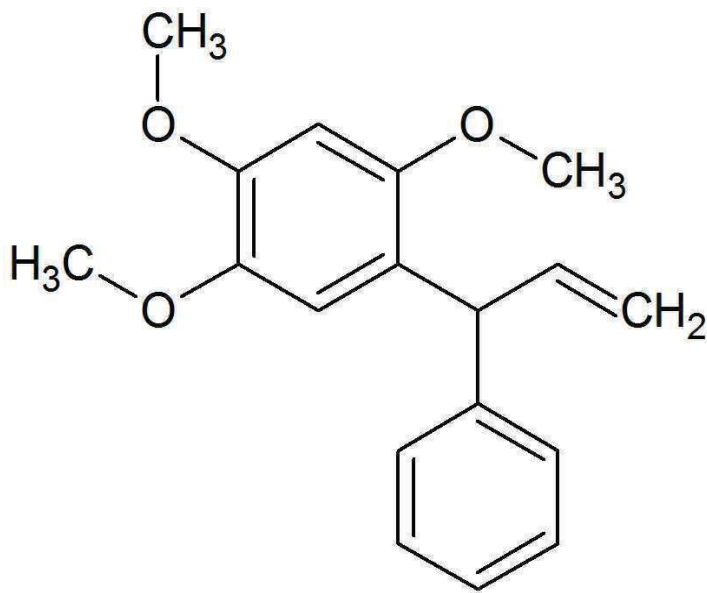
제1항에 있어서,

인공골, 인공관절, 골 고정재, 골 대체재, 골 수복재, 골 충전재 및 골 이식재로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질에 사용되는 골 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

하기 화학식 2의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는 치주질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 2]



청구항 9

제8항에 있어서,

Runx2의 발현을 상향 조절하는 치주질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규의 벤젠 유도체를 포함하는 골 형성 촉진용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 천연 유래의 강진향 추출물에서 분리된 신규의 벤젠 유도체를 포함하여 골 형성 촉진 능력이 우수할 뿐만 아니라, 신체 독성이 낮아 골 관련 질환의 치료 및 예방에 유용하게 사용될 수 있는 골 형성 촉진용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 뼈는 일생동안 지속적으로 변화하는 활동적인 조직이다. 뼈는 육안으로 외부의 피질골(치밀골)과 내부의 소주골(해면골, 스폰지뼈)로 구분하는데, 피질골은 물리적인 강도가 강하여 신체를 보호하고 지지하는 역할을 하고, 소주골은 충격을 흡수하거나 칼슘의 변화를 일정하게 유지하는 역할을 주로 한다.
- [0003] 뼈의 성장이 중단된 후에도 오래된 뼈는 파괴되어 없어지고(골 흡수), 새로운 뼈가 없어진 곳을 메우는 고정(골 형성)이 일생동안 반복되는, 이러한 현상을 뼈의 재형성(remodeling)이라 한다. 조골세포와 파골세포 사이의 상호작용이 균형을 이루어 골 흡수와 골 형성이 균형을 이루어야 뼈의 항상성이 유지되고 혈액 속의 칼슘 농도가 일정하게 유지되는데, 혈액에 칼슘이 부족하게 되면 이를 보충하기 위하여 골 흡수가 증가되어 뼈의 칼슘을 혈액으로 방출하게 되며, 골 흡수가 지속되면 뼈가 약해져 골다공증과 같은 질환이 발생한다.
- [0004] 특히, 골다공증은 폐경에 따른 급격한 호르몬의 변화에 의한 파골세포(osteoclast)의 활성화에 따른 골 흡수 증가로 나타나는 폐경 후 골다공증 및 노화에 의해 조골세포(osteoblast)의 기능이 감소하여 골형성이 감소하는 노인성 골다공증으로 분류할 수 있다. 상기 골다공증으로 인한 골절은 신체활동을 저해하고, 고관절 골절은 약 15-35%의 높은 사망률로 이어지므로, 골다공증성 골절이 발생하기 이전에 골다공증의 진단과 치료가 중요하다.
- [0005] 세계보건기구(WHO)는 미국에서 폐경기 이후 여성의 약 30%가 골다공증을 겪을 뿐만 아니라, 약 50%가 골감소증의 현상을 나타내며, 약 2,600만 명이 골다공증에 의한 골절 위험성을 내재하고 있는 것으로 보고하였다. 또한, 미국에서 골다공증 환자는 매년 약 2%씩 증가할 것으로 예상되고 급속한 노령화가 진행되는 국내에서도 골다공증 환자가 급증하고 있다.
- [0006] 골다공증 치료제는 골 흡수 저해제(antiresorptive drug)와 골 형성 촉진제로 분류된다. 골 흡수 저해제는 파골세포의 형성과 활성을 조절하는 치료제로서 비스포스포네이트, 선택적 에스트로겐 수용체 조절자(SERMs), 칼시토닌 등이 있으며, 골 형성 촉진제로서는 부갑상선 호르몬제(PTH), 불소제 등이 있다. 골다공증 치료제 시장에서 가장 큰 시장을 차지하고 있는 비스포스포네이트 치료제는 식전 공복에 복용해야 하고 복용시 식도염, 식도 천공 등의 부작용이 발생하며 체내 흡수율이 낮다는 단점이 있다. 선택적 에스트로겐 수용체 조절자로는 라록시펜, 드롤록시펜, 라소폭시펜 등이 있으나, 이들 치료제는 유방암 및 자궁암 유발 위험성을 증가시키는 부작용이 있다. 또한, 칼시토닌 치료제는 고가이며 투여방법이 어렵고 칼슘 제제는 부작용은 적지만 골다공증 치료보다는 예방에 국한된다는 단점이 있다.
- [0007] 현재까지 개발된 골다공증 치료제들은 부갑상선 호르몬제를 제외하고는 골 형성 작용이 미미하여 치료효과보다는 증상의 진행을 예방하는 효과에 그치고 있다. 또한, 골 형성 효과를 갖는 부갑상선 호르몬제의 경우는 골 형성을 촉진하여 치료효과를 얻을 수 있지만 장기 사용에 대한 안전성이 확립되지 않아 그 사용이 제한되고 있다. 따라서 골다공증의 근본적인 치료를 위해서는 소실된 골량에 대한 회복이 필수적으로 요구되며, 골다공증 치료를 위한 저분자(small molecule) 골 형성 약물의 개발이 절실하다.
- [0008] 본 발명자들은 골 형성, 골절 회복 및 치아성장과 발달과정에 필수적으로 요구되는 조골세포의 분화를 촉진하는 저분자 화합물 개발을 위한 연구를 진행하였으며, 천연 식물 유래의 신규 화합물을 분리하고, 본 화합물의 우수한 골 형성 효과를 확인하였다.

발명의 내용

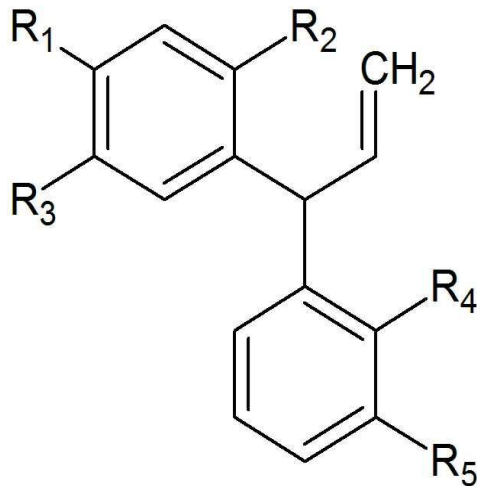
해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 전술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여 골 형성에 반드시 필요한 조골세포 분화를 증가시켜 골 형성을 촉진할 수 있는 신규 화합물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 신규 화합물을 포함하는 골 질환 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 일 측면에 따르면, 하기 화학식 1의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는 골 형성 촉진용 조성물이 제공된다.

[0012] [화학식 1]



[0013]

[0014] 상기 화학식 1에서 R1 내지 R5는 서로 독립적으로, C1-C4 알킬기, C1-C4 알콕시기, 히드록실기, 아세틸기 및 수소로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0015] 일 실시예에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물은 1,2,4-트리메톡시-5-(1-페닐프로프-2-에닐)벤젠일 수 있다.

[0016] 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 골 질환 예방 및 치료용일 수 있다.

[0017] 일 실시예에 따르면, 상기 골 질환은 대사성 골 질환 또는 정형외과적 골 질환일 수 있다.

[0018] 일 실시예에 따르면, 상기 골 질환은 골다공증, 골 형성 부진증, 골연화증, 골량 감소증, 골절, 골 결손 및 고관절 감소증으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0019] 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 인공골, 인공관절, 골 고정제, 골 대체제, 골 수복제, 골 충전제 및 골 이식재로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질에 사용될 수 있다.

[0020] 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 치주질환 예방 및 치료용으로 사용될 수 있다.

[0021] 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 경구적 전달, 비경구적 전달의 형태로 투여될 수 있다.

[0022] 일 실시예에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물은 강진향 추출물로부터 분리될 수 있다.

[0023] 본 발명의 다른 측면에 따르면, (a) 알코올을 용매로 하여 강진향 추출물을 제조하는 단계; (b) 알코올 추출물을 유기용매 및 물로 분배 추출하는 단계; (c) 상기 (b)단계의 유기 용매 분획을 아세톤 및 n-헥산을 용리액으로 사용하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피하는 단계; (d) 상기 (c)단계에서 수득된 용출액을 n-헥산 및 다이클로로메탄을 용리액으로 사용하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피하는 단계; 및 (e) 상기 (d)단계에서 수득된 용출액을 n-헥산 및 에틸아세테이트를 용리액으로 사용하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피하는 단계;를 포함하는 상기 화합물을 수득하는 방법이 제공된다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따르면, 상기 골 형성 촉진용 조성물은 천연 유래의 화합물을 포함하여 체내 독성이 낮고, 골 형성 촉진 능력이 우수하므로, 골 질환 예방 및 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

[0025] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 TMDQ(2,4,5-Trimethoxydalbergiquinol) 처리에 따른 MTT assay를 세포 생존도를 측정한 것이다.

도 2는 TMDQ 처리에 따른 ALP(alkaline phosphatase) 활성을 측정한 것이다.

도 3은 TMDQ 처리에 따른 ALP staining 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 TMDQ 처리에 따른 Alizarin red staining 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 광학 밀도를 통해 TMDQ 처리에 따른 Alizarin red staining의 정도를 측정한 것이다.

도 6은 TMDQ 처리에 따른 mRNA 발현 정도를 측정한 것이다(RT-PCR).

도 7은 TMDQ 처리에 따른 mRNA 발현 및 단백질의 활성을 측정한 것이다(RT-PCR / Western blot).

도 8은 TMDQ 처리에 따른 mRNA 발현 및 단백질의 활성을 측정한 것이다(RT-PCR / Western blot).

도 9은 TMDQ 처리에 따른 mRNA 발현 및 단백질의 활성을 측정한 것이다(RT-PCR / Western blot).

도 10은 TMDQ 처리에 따른 p-Smad1/5/8 및 β -catenin 핵내 이동을 나타낸 것이다(면역형광법).

도 11은 Wnt 저해제(DKK1) 및 BMP 길항제(noggin) 전처리에 따른 ALP 활성을 측정 및 ALP staining 결과를 나타낸 것이다.

도 12은 Wnt 저해제(DKK1) 및 BMP 길항제(noggin) 전처리에 따른 Alizarin red staining 및 광학 밀도를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

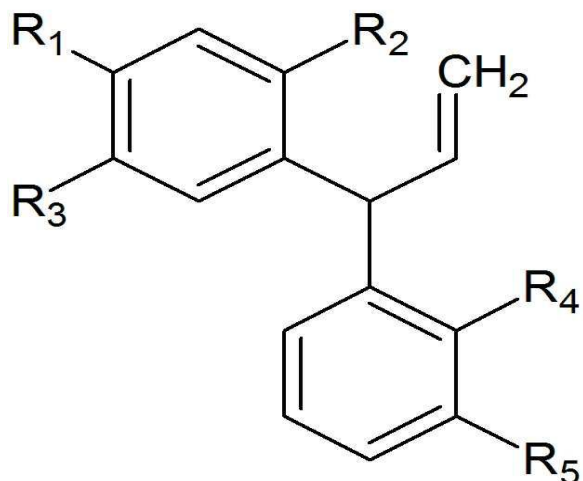
도 13은 TMDQ 처리에 따른 Runx2 단백질의 발현 정도를 측정한 것이다.

도 14는 Wnt 저해제(DKK1) 및 BMP 길항제(noggin) 전처리에 따른 Runx2 단백질의 발현 정도를 측정한 것이다(Western blot).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 하기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 또한, 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략될 수 있다.
- [0029] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 부재를 사이에 두고 "간접적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0030] 이하 도면을 참조하여 본 발명을 더욱 상술한다.
- [0031] 본 발명의 일 측면에 따르면, 하기 화학식 1의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는 골 형성 촉진용 조성물이 제공된다.

[0032] [화학식 1]



[0033]

[0034] 상기 화학식 1에서 R_1 내지 R_5 는 서로 독립적으로, C1-C4 알킬기, C1-C4 알콕시기, 히드록실기, 아세틸기 및 수소로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0035] 상기 "알킬"은, 단일 원자(single atom)에 의해 분자의 나머지 부분에 부착된 탄소 원자의 특정 수를 갖는 직쇄 또는 분지된 지방족 탄화수소 그룹을 의미하며, 예컨대, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 t-부틸 일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0036] 상기 "알콕시"는 알킬기가 산소와 결합된 형의 1가의 원자단을 의미하며, 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, 이소프로폭시, n-부톡시, 이소부톡시 또는 t-부톡시일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0037] 상기 화학식 1의 화합물은 약제학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용할 수 있다.

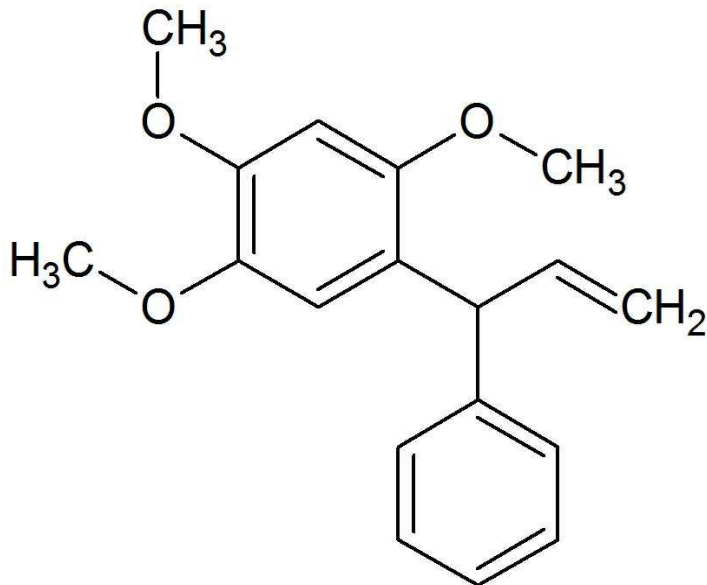
[0038] 상기 화학식 1의 화합물은 당해 기술 분야에서 통상적인 방법에 따라 약제학적으로 허용되는 산 부가염을 형성할 수 있다. 유리산은 유기산 및 무기산이 사용될 수 있으며, 예컨대, 상기 무기산은 염산, 브롬산, 황산, 또는 인산 일 수 있으며, 상기 유기산은 구연산 (Citric acid), 초산, 젖산, 주석산 (Tartaric acid), 말레인산, 푸마르산 (Fumaric acid), 포름산, 프로피온산 (Propionic acid), 옥살산, 트리플루오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콜산, 숙신산 (Succinic acid), 4-톨루엔설폰산, 벤젠설폰산, 살리실산, 니코틴산, 이소니코틴산, 피콜린산, 글루탐산 또는 아스파르트산일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 일 실시예에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물은 1,2,4-트리메톡시-5-(1-페닐프로프-2-에닐)벤젠일 수 있다.

[0040] 상기 1,2,4-트리메톡시-5-(1-페닐프로프-2-에닐)벤젠[1,2,4-trimethoxy-5-(1-phenylprop-2-enyl)benzene]은 2,4,5-트리메톡시달버그퀴놀(2,4,5-trimethoxydalbergiquinol)이라고도 불리운다.

[0041] 상기 1,2,4-트리메톡시-5-(1-페닐프로프-2-에닐)벤젠은 상기 화학식 1에서 R_1 내지 R_3 가 메톡시기 이고, R_4 및 R_5 는 수소일 수 있으며, 하기 화학식 2의 구조를 가질 수 있다.

[0042] [화학적식 2]



[0043]

[0044] 일 실시예에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물은 강진향 추출물로부터 분리될 수 있다.

[0045] 본 발명의 다른 측면에 따르면, (a) 알코올을 용매로 하여 강진향 추출물을 제조하는 단계; (b) 알코올 추출물을 유기용매 및 물로 분배 추출하는 단계; (c) 상기 (b)단계의 유기 용매 분획을 아세톤 및 n-헥산을 용리액으로 사용하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피하는 단계; (d) 상기 (c)단계에서 수득된 용출액을 n-헥산 및 다이클로로메탄을 용리액으로 사용하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피하는 단계; 및 (e) 상기 (d)단계에서 수득된 용출액을 n-헥산 및 에틸아세테이트를 용리액으로 사용하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피하는 단계;를 포함하는 상기 화학식 1의 화합물을 수득하는 방법이 제공된다.

[0046] 상기 “강진향”은 콩과에 속하는 낙엽교목인 강향단(*Dalbergia odorifera* T. Chen) 뿌리부분의 껍질을 제거한 심재를 의미하며, 강진(降眞) 혹은 강향(降香)으로 명명되기도 한다. 상기 강진향은 주성분으로, 달버진(dalbergin), 노르달버진(nordalbergin), 이소달버진(isodlbergin), 들베게논(dlbegone), 달버지크로민(dalbergichromene), 아크로닐린(acronylin), 아크로베스톤(acrovestone), 디메틸아크로베스톤 1(demethylacrovestone 1), 버갯텐(bergapten), 디타민(dictamnine), 스킴미아닌(skimmianine), 이볼리트린(evolitrine), 코쿠사기닌(kokusaginine), 바우레놀(baurenol) 등을 포함한다.

[0047] 상기 “강진향 추출물”은 상기 강진향을 물 또는 유기용매로 추출하여 수득한 추출물을 의미하며, 추출 방법을 특별히 제한되지 않으나 물, 탄소수 1 내지 6의 알코올, 헥산, 클로로포름, 메틸아세테이트, 또는 부탄올을 용매로 하여 추출될 수 있다.

[0048] 일 실시예에 따르면, 상기 강진향을 알코올로 추출할 수 있다. 상기 알코올은 탄소수 1 내지 6의 지방족 알코올일 수 있으며, 구체적으로는 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, 부탄올, 헥산 등이 사용될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0049] 상기 알코올 추출물은 유기용매 및 물로 분배 추출될 수 있다. 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 10의 지방족 탄화수소, 탄소수 1 내지 10의 지방족 할로젠화 탄화수소 및 탄소수 2 내지 10의 에스테르 중에서 선택될 수 있으나, 바람직하게는 에틸아세테이트를 사용할 수 있다.

[0050] 이어서, 상기 분배 추출된 에틸아세테이트 분획은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피를 통해 분리될 수 있다. 상기 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피는 n-헥산 및 다이클로로메탄의 혼합액을 용리액으로 사용할 수 있으며, 상기 혼합액의 부피비는 20:1에서 2:1까지 순차적으로 할 수 있다.

[0051] 또한, 상기 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 수득된 용출액은 n-헥산 및 다이클로로메탄을 용리액(1:2 내지 1:3 부피비)으로 사용하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피를 재차 수행할 수 있으며, 상기 수득된 용출액은 n-헥산 및 에틸아세테이트를 용리액(3:1 내지 5:1 부피비)으로 사용하여 최종적으로 상기 화학식 1의 화합물이 수득될 수 있다.

- [0052] 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 골 질환 예방 및 치료용일 수 있다.
- [0053] 일 실시예에 따르면, 상기 골 질환은 대사성 골 질환 또는 정형외과적 골 질환일 수 있다.
- [0054] 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.
- [0055] 상기 골 질환은 골다공증, 골 형성 부전증, 골연화증, 골량 감소증, 골절, 골 결손 및 고관절 감소증으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0056] 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 치주질환 예방 및 치료용으로 사용될 수 있다.
- [0057] 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.
- [0058] 상기 치주질환은 상기 병변부위의 영역에 따라 치은염(gingivitis)과 치주염(periodontitis)으로 구분될 수 있으며, 예컨대, 상기 치은염은 상기 병변부위가 연조직에 발생하는 증상을 나타내는 질환을 의미하고, 치주염은 상기 병변부위가 잇몸과 잇몸뼈 주변까지 확장된 부위에서 나타나는 질환을 의미할 수 있다.
- [0059] 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 인공골, 인공관절, 골 고정재, 골 대체재, 골 수복재, 골 충전재 및 골 이식재로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질에 사용될 수 있다.
- [0060] 상기 골 형성 촉진용 조성물은 골 질환 또는 치주질환의 예방 및 치료용으로 사용될 수 있으며, 인공골, 골 고정재, 골 대체재, 골 수복재, 골 충전재 또는 골 이식재에 적용되기 용이한 형태로 제조될 수 있다.
- [0061] 예컨대, 상기 골 이식재나 골 대체재는 협의로는 골 조직 내의 공간을 충전하기 위하여 사용될 수도 있고, 광의로는 뼈나 치아의 일부를 대체하는데 사용될 수 있으므로, 상기 골 형성 촉진용 조성물은 압착, 압축, 가압접촉, 패킹, 압박, 군힘 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 있다.
- [0062] 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 경구적 전달, 비경구적 전달의 형태로 투여될 수 있다. 상기 화학식 1의 화합물은 전신 또는 국소 투여할 수 있으며, 상기 투여는 경구 투여 및 비경구 투여를 포함할 수 있다. 상기 화합물이 조성물로서 투여되는 경우, 적절한 투여 형태를 제공하도록 적합한 양의 약학적으로 허용되는 비히클 또는 담체와 함께 제형화될 수 있다.
- [0063] 한편, 상기 화학식 1의 화합물을 포함하는 조성물은 약학 조성물의 제조에 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0064] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 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 또는 광물유를 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0065] 또한, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화하여 사용할 수 있다.
- [0066] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 적소 두 추출물과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제, 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스, 또는 젤라틴 등을 혼합하여 조제할 수 있다. 또한, 상기 부형제 이외에 마그네슘 스테arate, 탈크 같은 윤활제가 사용될 수 있다.
- [0067] 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0068] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 사용될 수 있다. 상기 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은

식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르가 사용될 수 있다. 상기 좌제의 기재로는 위텡솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴이 사용될 수 있다.

[0069] 이하 실시예를 통해, 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0070] 실시예: 2,4,5-trimethoxydalbergiquinol(TMDQ)의 분리

[0071] 건조된 강진향의 심재(1.65kg)를 1시간 동안 에탄올을 용매로 하여 유효성분을 추출하였다. 추출 이후 진공에서 농축되고, 상기 에탄올 추출물(200g)은 물에서 현탁 되었으며, 에틸아세테이트 분획(180g) 및 수용성 분획이 분리되었다. 상기 에틸아세테이트 분획은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피를 통해 분리되고, 아세톤(5 내지 50%까지 순차적으로) 및 n-헥산 혼합용매에 의해 용리되었으며, 메탄올로 세척되어 7개의 소분획물로 나뉘었다. 3번째 소분획물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피를 통해 분리되었으며, n-헥산 및 다이클로로메탄 혼합용매(1:2)에 의해 5개의 소분획물로 분리되었다. 4번째 소분획물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피를 통해 재차 분리되었으며 n-헥산 및 에틸아세테이트 혼합용매(4:1)에 의해 2,4,5-trimethoxydalbergiquinol(TMDQ) 10mg이 용리되었다. 상기 분리된 TMDQ는 용매를 제거하고, 세척하여 무정형의 황색파우더 형태로 수득되었다.

[0072] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz): δ 5.15 (dt, 1.6, 10.4, H-2a), 4.87 (dt, 1.6, 16.8, H-2b), 6.26 (ddd, 6.4, 10.4, 17.2, H-3), 5.04 (br d, 6.4, H-4), 6.70 (s, H-5), 6.63 (s, H-8), 7.11 -7.24 (H-2', 3', 4', 5', 6'), 3.69 (s, 6- and 7-OCH₃), 3.82 (s, 9-OCH₃). $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100MHz) 111.16 (C-2), 141.98 (C-3), 48.66 (C-4), 115.86 (C-5), 144.76 (C-6), 150.00 (C-7), 99.8 (C-8), 153.1 (C-9), 124.9 (C-10), 144.2 (C-1'), 129.0 (C-2', 6'), 129.5 (C-3', 5'), 126.9 (C-4'), 56.7 (6-OCH₃), 56.9 (7-OCH₃), 57.6 (9-OCH₃).

[0073] 실험예 1: TMDQ의 조골 세포 분화 능력 측정

[0074] TMDQ의 세포독성 잠재력을 평가하기 위해, TMDQ의 생쥐 두개골 조골 세포의 생존성에 대한 효과를 측정하였다.

[0075] 도 1에 나타난 것과 같이, MTT assay를 수행한 결과, 10 μM 의 농도까지 세포독성은 관찰되지 않았다. 조골 세포는 50 $\mu\text{g/ml}$ L-ascorbic acid 및 10 mM β -glycerophosphate을 포함하는 골 형성 보충 배지(OS)에서 1일간 배양되었다.

[0076] 조골 세포의 분화에 영향을 미치는지 조사하기 위해, 골 형성 보충 배지(OS)에서 TMDQ(0.1 내지 1 μM)의 존재 및 부존재에 따른 효과를 관찰하였다.

[0077] 상기 조골 세포의 분화에 대한 TMDQ의 효과는 초기 반응에 대한 마커로서 초대 배양된 생쥐 조골 세포의 ALP 활성을 측정함으로써 평가되었다.

[0078] 조골 세포는 상기 배지에서 5일간 배양되었으며, 도 2에 나타난 것과 같이, TMDQ의 0.1 내지 1 μM 농도 범위에 따라, ALP 활성이 증가하였다.

[0079] 도 3에 나타난 것과 같이, 동일한 조건에서 ALP 활성에 대한 TMDQ의 효과는 ALP staining에 의해 시각화되었으며, ALP staining은 ALP 활성과 일치하였다.

[0080] 후기 반응에 대한 마커로서, 광화(mineralization) 정도는 Alizarin red staining에 의해 측정되었다. 조골 세포는 상기 배지에서 7일간 배양되었다.

[0081] 도 4 및 도 5에 나타난 것과 같이, TMDQ는 ALP 활성 및 ALP staining에 대한 효과와 동일하게 광화를 증가시켰으며, Alizarin red staining에 대한 정량 결과, TMDQ에 의한 증가효과는 농도에 비례하였다.

[0082] 또한, TMDQ는 위의 조골 세포 초기 배양에 있어서, 초기 반응 및 후기 반응에 대해 현저히 증가효과를 나타내었으므로, 조골 세포에 특이적인 유전자의 mRNA 발현 정도를 관찰하였다. 조골 세포는 상기 배지에서 TMDQ 농도를 달리하여 7일간 배양되었으며, 분리된 총 RNA는 RT-PCR에 의해 분석되었다.

[0083] 도 6에 나타난 것과 같이, TMDQ는 ALP, 오스테오칼신(OCN), 뼈 인단백질(BSP), 및 오스테오펀틴(OPN)의 mRNA 발현을 상향 조절하였다.

[0084] 즉, TMDQ는 ALP 활성을 촉진하고, 골 기질 단백질(ALP, OCN, OPN, BSP)를 상향 조절하며, 석회화 결절 형성을 증가시켰으며, 상기 결과는 초기 및 말기의 조골 세포 분화 및 성숙은 TMDQ에 의해 활성화됨을 시사한다.

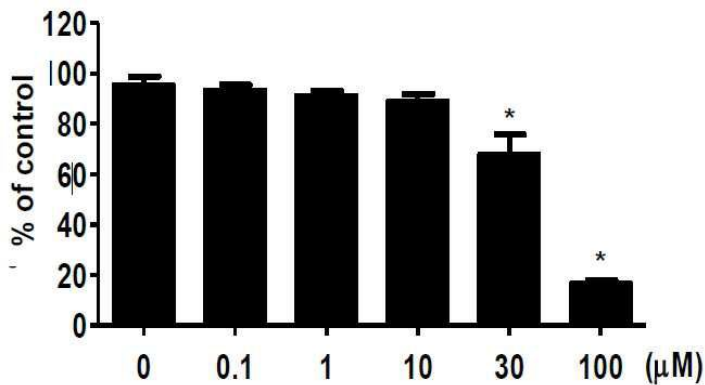
- [0085] 실험예 2: TMDQ의 BMP 및 Wnt/ β -catenin 신호 활성화
- [0086] TMDQ의 세포 분화 조절에 대한 신호 경로를 명확히 이해하기 위해, RT-PCR, 웨스턴블랏, 면역형광법(immunofluorescence)을 통해 MAPK(mitogen-activated protein kinase), BMP(bone morphogenetic proteins) 및 Wnt/ β -catenin 경로를 분석하였다.
- [0087] 도 7에 나타난 것과 같이, 30분간 TMDQ에 의해 처리된 조골 세포는 ERK1/2, JNK, 및 p38 MAPK의 인산화에 영향을 받지 않았다.
- [0088] BMP(bone morphogenetic proteins) 경로는 조골 세포 분화에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으므로, 본 발명자들은 TMDQ가 BMP 신호 전달에 영향을 미치는지 분석하였다. 조골 세포는 상기 배지에서 TMDQ 농도를 달리하여 2일간 배양되었으며, RT-PCR 및 웨스턴 블랏에 의해 mRNA 및 단백질 발현이 측정되었다.
- [0089] 도 8에 나타난 것과 같이, TMDQ는 쥐의 초기 배양 조골 세포에서 *Bmp2* 및 *Bmp4* mRNA의 발현뿐만 아니라, BMP의 다운스트림 신호 분자인 Smad1/5/8의 인산화를 증가시켰다.
- [0090] TMDQ가 Wnt/ β -catenin 신호에 영향을 미치는지 확인 하기 위해, TMDQ가 Wnt 리간드, GSK3의 인산화, 및 β -catenin 단백질의 mRNA 발현에 영향을 미치는지 조사하였다.
- [0091] 도 9에 나타난 것과 같이, TMDQ에 의해 처리된 쥐의 초기 배양 조골 세포는 Wnt1 및 Wnt3a Mrna, GSK3 인산화를 상향 조절하였으나, Wnt5a mRNA 발현은 영향을 받지 않았다. 마찬가지로, 초기 배양 두개골 조골 세포의 총 β -catenin 단백질 수준은 TMDQ 처리에 의해 증가되었다.
- [0092] TMDQ 처리 후, Smad1/5/8의 인산화 및 β -catenin의 핵내 이동을 분석하기 위해 형광면역법이 수행되었다.
- [0093] 조골 세포는 상기 배지에서 TMDQ 농도를 달리하여 2일간 배양되었으며, 도 10에 나타난 것과 같이, TMDQ 처리된 조골 세포의 면역 세포 화학(Immunocytochemical) 관찰 결과, p-Smad1/5/8 및 β -catenin의 빠른 핵내 이동이 나타났으나, 대조군에서는 상기 결과가 나타나지 않았다. 도 10에서 항 p-Smad1/5/8 및 β -catenin 항체는 녹색으로, DAPI 는 청색으로 표시되었으며, TMDQ 처리에 따른 p-Smad1/5/8 및 β -catenin의 핵 및 세포질 내 상대적인 분포를 나타낸다.
- [0094] 실험예 3: BMP 및 Wnt/ β -catenin 신호 및 조골 세포 분화의 관계 규명
- [0095] BMP 및 Wnt/ β -catenin 신호 경로의 활성화를 통해 TMDQ가 조골 세포의 분화를 촉진하는지 확인하기 위해, TMDQ 처리 전에, Wnt 저해제(DKK1) 및 BMP 길항제(noggin)로 1시간 동안 전처리하였다.
- [0096] 도 11 및 도 12에 나타난 것과 같이, BMP 길항제 전처리는 TMDQ 매개의 ALP staining, ALP 활성, 석회화 결절 형성(mineralized nodule formation)을 극적으로 저해하였으며, Wnt 저해제(DKK1)는 부분적으로 약화시켰다.
- [0097] 도 13에 나타난 것과 같이, BMP 및 Wnt/ β -catenin 경로 활성화 간의 관계를 규명하기 위해, 조골 세포 분화에 있어서 핵심 전사 인자인 β -catenin 다운스트림 표적 유전자(runt-related transcription factor 2, Runx2)에 대한 TMDQ의 영향을 조사하였다. Runx2의 발현은 TMDQ 처리에 의해 48시간 배양 이후 현저하게 증가되었다.
- [0098] 또한, 도 14에 나타난 것과 같이, Wnt 저해제(DKK1) 및 BMP 길항제(noggin)은 TMDQ에 의해 촉진되는 Runx-2 단백질 발현을 약화시켰다.
- [0099] 상기 실험 결과에 따르면, TMDQ는 생쥐 두개골 조골 세포의 초대 배양에서 BMP 및 Wnt/ β -catenin의 신호 경로를 통하여 조골 세포의 분화를 촉진하였으며, Runx2를 활성화하였다. 따라서, TMDQ는 골 형성 및 골 광화를 유도하므로 골다공증과 같은 골 질환 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0100] 또한, Runx2 유전자 활성화는 골 형성의 촉진뿐만 아니라, 치주질환과도 밀접한 관련이 있다고 알려진바 있으며, Runx2 유전자가 치조골의 리모델링을 조절하고 치주인대 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 보고된바 있다(Camilleri, S. et al., Eur J Oral Sci. 114(5):361-373, 2006).
- [0101] 따라서, 상기 TMDQ를 포함하는 골 형성 촉진용 조성물은 Runx2를 활성화함으로써 골 질환뿐만 아니라, 치주 질환 치료의 용도로도 유용하게 사용될 수 있다.

[0102] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

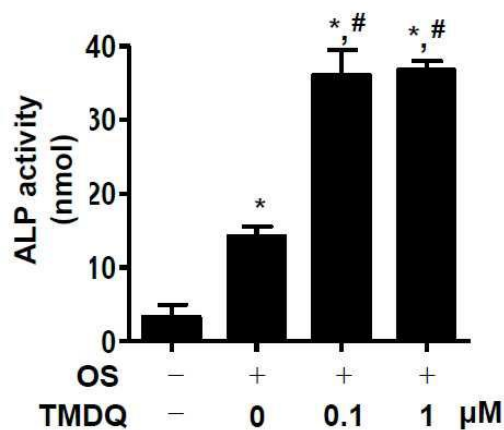
[0103] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

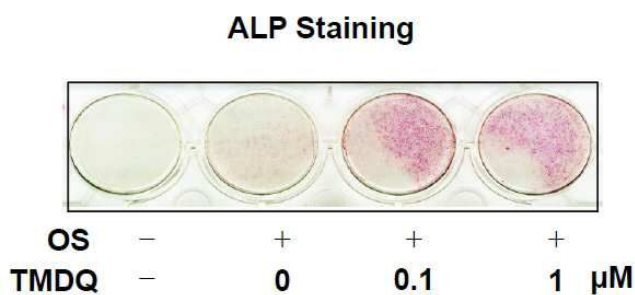
도면1



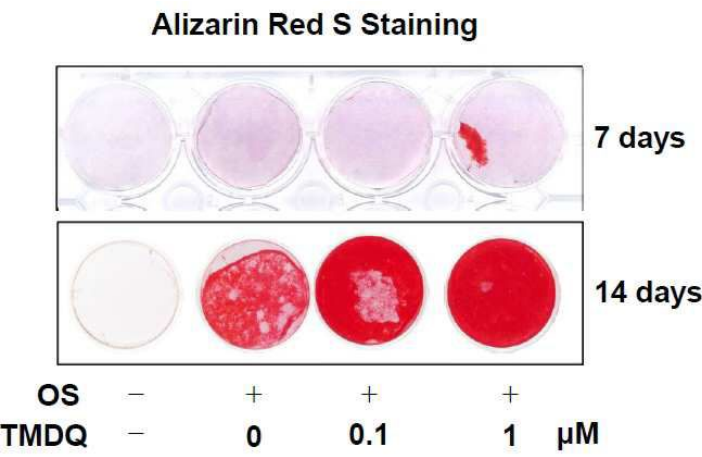
도면2



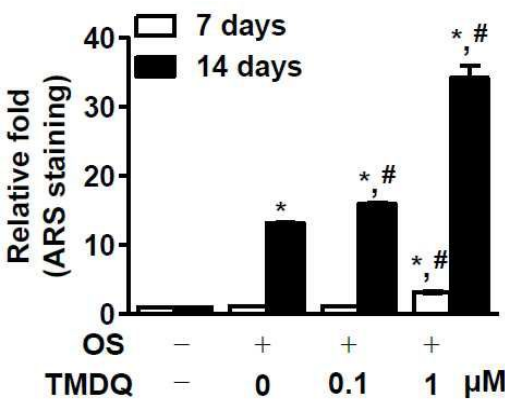
도면3



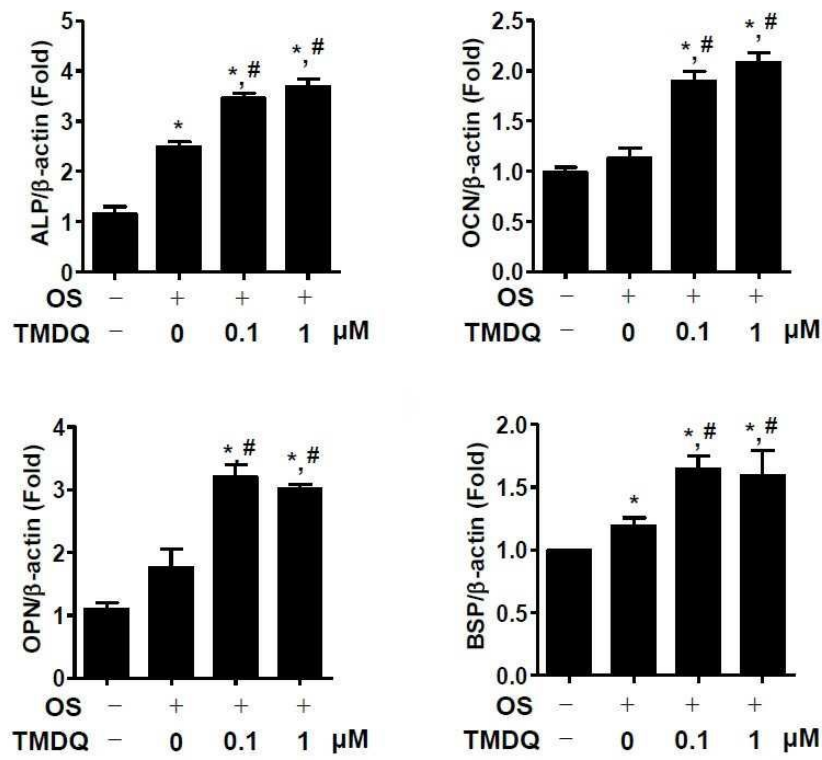
도면4



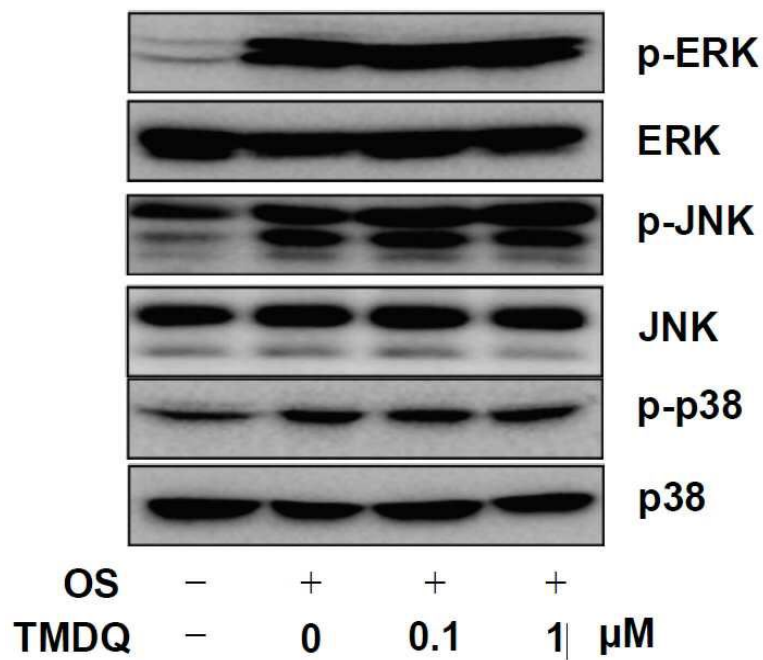
도면5



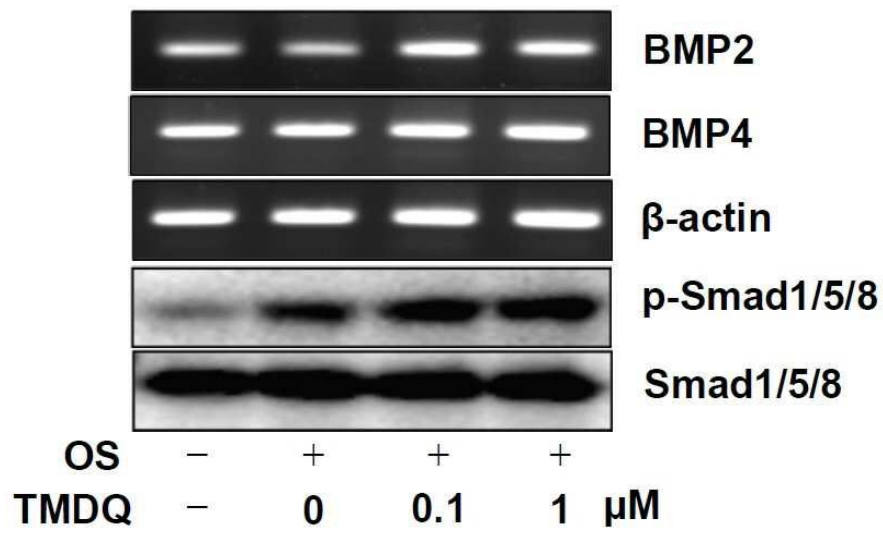
도면6



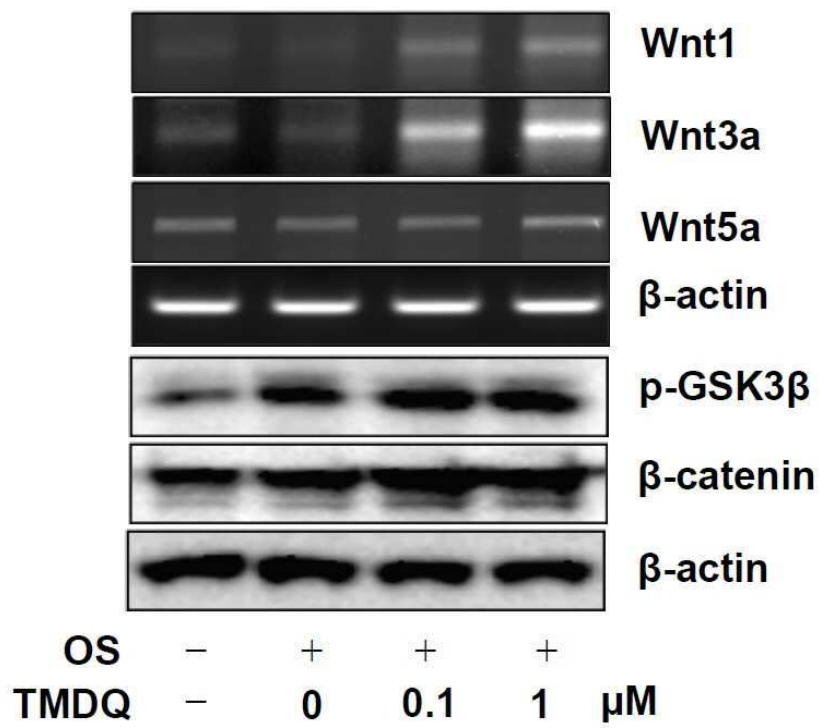
도면7



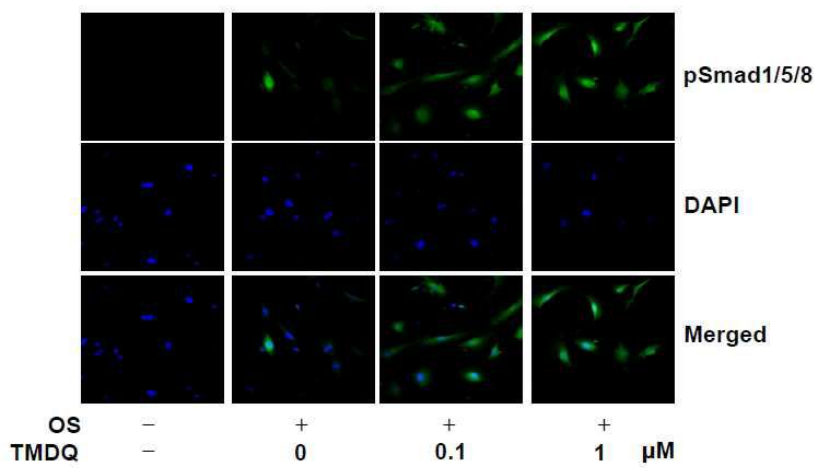
도면8



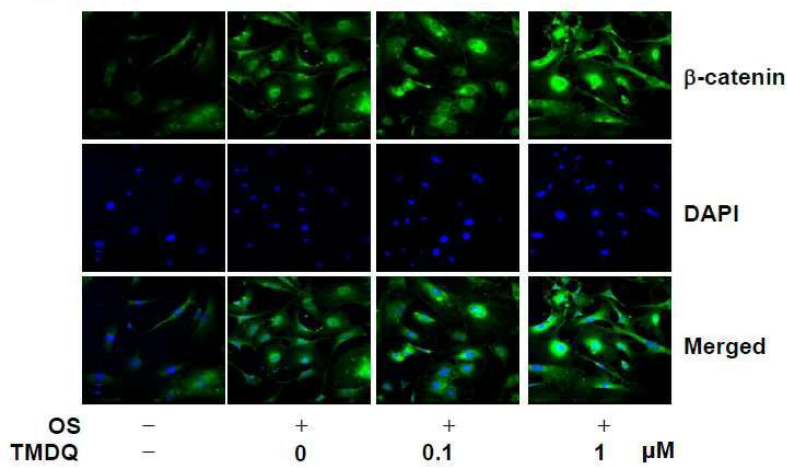
도면9



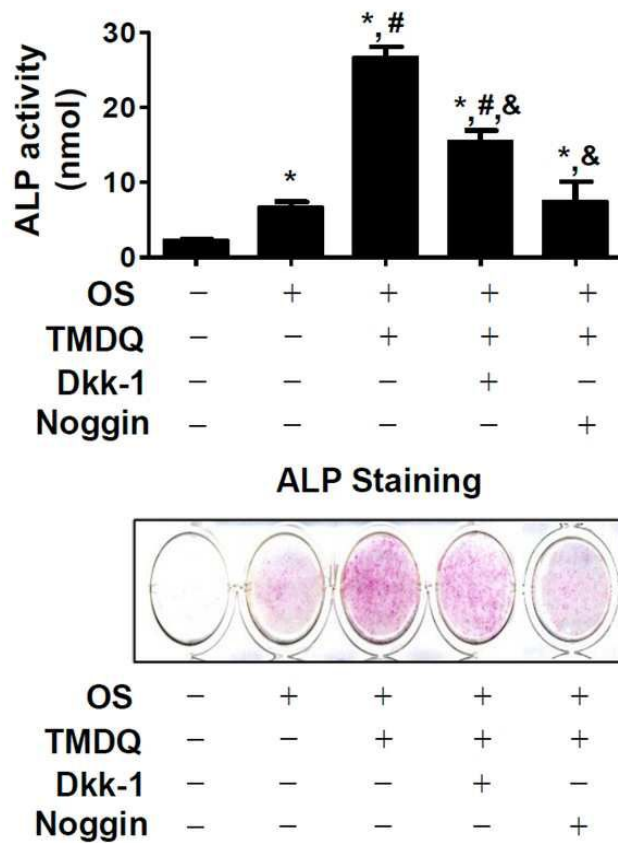
도면10



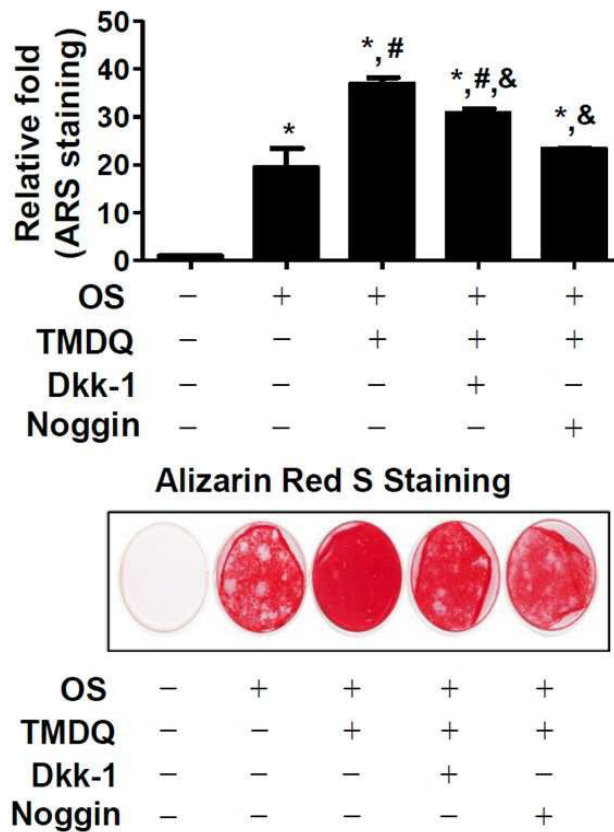
B



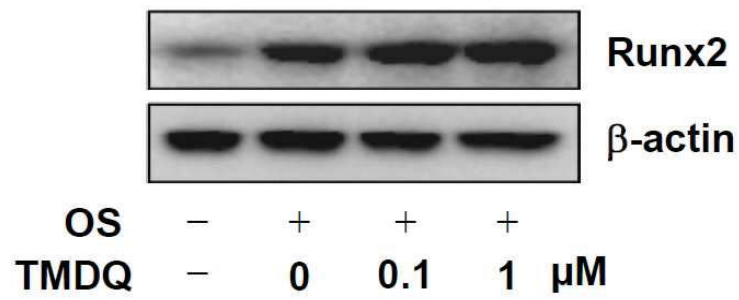
도면11



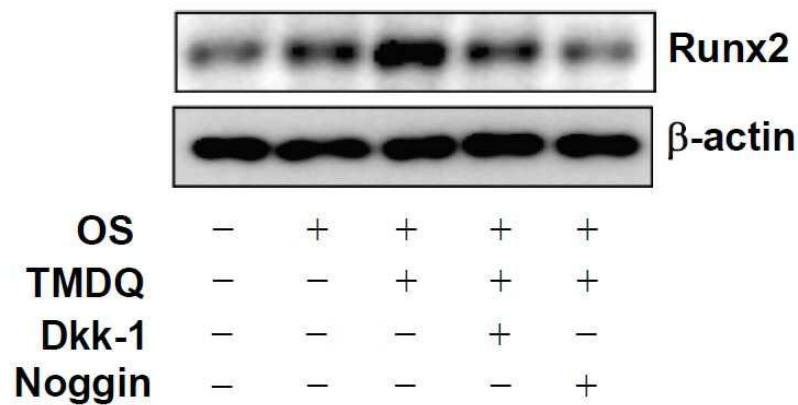
도면12



도면13



도면14



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1 내지 3, 6 내지 9

【변경전】

예방 및 치료용

【변경후】

예방 또는 치료용