(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0099300
(43) 공개일자 2016년08월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/50 (2015.01) *A61K 9/16* (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01) *A61K 9/48* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/50 (2013.01)
A61K 9/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0021590
(22) 출원일자 2015년02월12일
심사청구일자 2015년02월12일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
송재준
서울특별시 서초구 신반포로3길 19 73동 504호 (반포동, 주공아파트)
고윤영
서울특별시 양천구 목동서로 100, 322동 308호 (목동, 목동신시가지아파트3단지)
(74) 대리인
특허법인충현

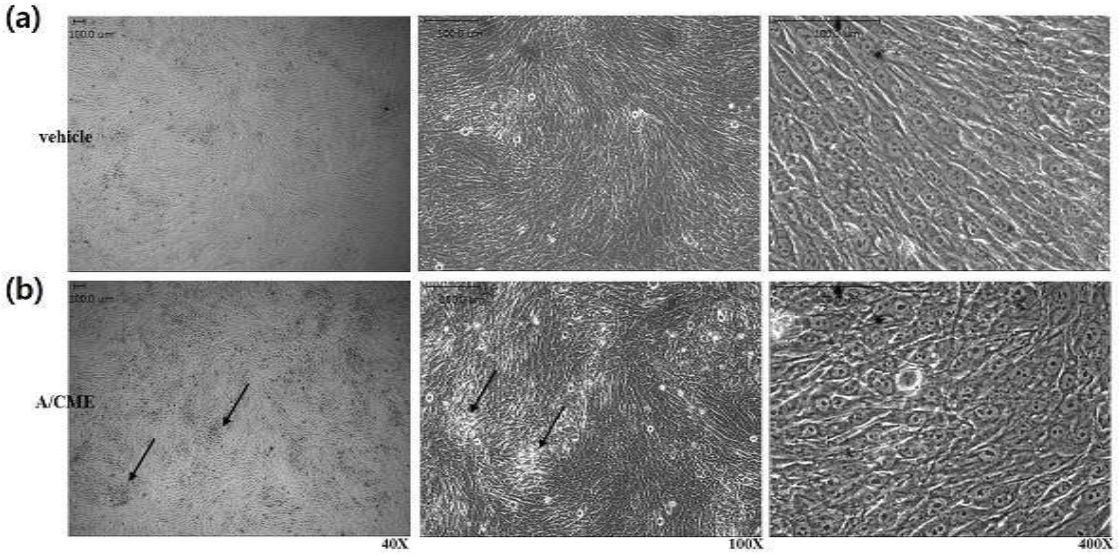
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **양막 및 융모막의 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 골형성 촉진용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 양막 및 융모막의 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 골형성 촉진용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 골형성 촉진 유전자의 발현을 촉진하여 골형성을 촉진하고, 골질환, 예컨대 골결손, 골다공증, 골다공증성 골절, 당뇨병성 골절, 불유합골절, 골형성 부전증, 골연화증 및 이로 인한 골절, 골형성 장애, 퇴행성 골질환 또는 부정교합 및 골형성 또는 골재생에 의해 치료가능한 임의의 질병 예방 또는 치료 효과를 나타낸다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 9/20 (2013.01)
A61K 9/48 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

양막 및 융모막의 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 골형성 촉진용 약학적 조성물.

청구항 2

양막 및 융모막의 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 골질환은 골결손, 골다공증, 골다공증성 골절, 당뇨병성 골절, 불유합골절, 골형성 부전증, 골연화증 및 이로 인한 골절, 골형성 장애, 퇴행성 골질환 또는 부정교합 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 복합추출물은 양막 및 융모막 추출물을 1:9 내지 9:1의 중량비로 혼합한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 복합추출물은 양막 및 융모막 추출물을 1:9 내지 4:6의 중량비로 혼합한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 복합추출물은 양막 및 융모막 추출물을 6:4 내지 9:1의 중량비로 혼합한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액으로 제형화된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 양막 및 융모막의 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 골형성 촉진용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 뼈는 인체의 연조직과 체중을 지탱해주고 내부기관을 둘러싸서 내부 장기를 외부의 충격으로부터 보호한다. 또한 근육이나 장기를 구조적으로 지탱할 뿐만 아니라 체내의 칼슘이나 다른 필수 무기질 즉 인이나 마그네슘과 같은 물질을 저장하는 인체의 중요한 부분 중 하나이다. 따라서 성장이 끝난 성인의 뼈는 오래된 뼈는 제거하고 새로운 뼈로 대체하는 생성과 흡수 과정을 지속적으로 반복 재생하면서 균형을 유지하게 되는데, 이를 골재형성

(bone remodeling)이라고 한다(Yamaguchi A. et al., Tanpakushitsu Kakusan Koso., 50(6Suppl);664-669(2005)). 이러한 뼈의 순환은 성장과 스트레스에 의해 일어나는 뼈의 미세한 손상을 회복시키고 그 기능을 유지하는데 필수적이다. 성인에서는 매년 골격의 약 10-30%가 골흡수-골형성의 리모델링을 통하여 재형성된다.

[0003] 골재형성에는 뼈를 생성하는 조골세포(osteoblast) 및 뼈를 파괴하는 파골세포(osteoclast)가 관여하며 서로 밀접한 연관성으로 골의 항상성이 유지된다. 예를 들어, 조골세포는 RANKL(receptor activator of nuclear factor-κB ligand), 및 그의 유도 수용체인 OPG(osteoprotegerin)과 같은 물질의 부비를 통해 골흡수를 담당하는 파골세포의 분화를 조절함으로써 체내의 골 항상성을 유지한다.

[0004] 이러한 대사는 물리적 영향, 호르몬 체계 및 국소 인자에 의해 조절되는데, 여러 요인에 의해 골 흡수가 골 형성을 초과하여 골량이 한계 이하로 감소하게 되면 각종 골질환이 발생한다. 골다공증(osteoporosis)은 뼈의 질량이 일정 수준 이하로 감소하고 뼈 조직의 미세구조 퇴화로 골절 위험이 지속적으로 증가하는 질환으로 뼈를 구성하는 미네랄과 기질이 감소한 상태이며, 골재형성의 균형이 깨져서 파골작용이 조골작용보다 증가된 상태에서 발생한다(Iqbal MM., South Med J., 93(1):2-18(2000)). 골관절염은 골과 연골을 침범하는 관절염의 가장 일반적인 형태로서, 염증반응에 의해 파골세포의 분화를 과도하게 촉진하게 된다. 이는 IL-1, TNF-α, MMP와 같은 골흡수 활성화 인장의 발현을 증가시켜 결국 골손실과 연골손상을 유도한다. 암세포의 골전이는 유방암, 전립선암 또는 다발성 골수종의 경우 빈번하게 발생하는데, 특히 골 용해성 골전이(osteolytic metastasis)는 유방암 세포 등이 파골 세포를 활성화시킴으로써 일어나는 것으로 알려져 있다(Boyde A. et al., Scan Electron Microsc., 4:1537-1554(1986)). 활성화된 파골세포는 뼈 주위의 미세 환경의 균형을 파괴시켜 골용해 및 이로 인한 병적 골절, 백혈구 감소증, 뼈의 기형, 고칼슘혈증, 통증, 신경압박 증후군 등 뼈와 관련된 질환을 발생시킨다(Roodman GD., N Engl J Med., 350:1655-1664(2004)).

[0005] 이러한 골조직 손상을 동반한 질환의 치료와 관련하여 과거에는 주로 골 무기질, 즉 칼슘과 인의 대사 이상만을 중심으로 연구가 진행되어 왔으며, 그 기전 규명에 있어서 진전을 보지 못하였다. 일반적으로, 골다공증의 치료 및 예방을 위하여 칼슘이 함유된 식이요법이 추천되며, 폐경기의 여성들에게는 에스트로겐 또는 비타민 D 투여가 추천되고 있다. 그 외에, 포사맥스(Fosamax, 성분명: alendronate)와 악토넬(Actonel, 성분명: risedronate)과 같은 비스포스포네이트(bisphosphonate) 계열이 파골세포를 억제하고 사멸을 유도하는 골흡수 억제제로 서 새로운 대체 치료제로 주목받고 있다.

[0006] 그러나, 골질환 치료제로 널리 사용되는 칼슘보강제는 부갑상선 호르몬의 분비를 억제하며 골흡수에 의한 골량 감소를 방지하나, 골량 유지의 개인 차이가 심한 것으로 알려져 있다(Heandy R.P. principles of bone biology, Academic press, 1007-1017, 1996). 또한, 에스트로겐이나 칼시토닌을 이용한 호르몬 요법의 경우 골밀도를 증가시키고 직장암의 발생을 감소시킨다는 보고도 있으나, 유방암, 심근경색, 정맥 혈전증 등의 부작용이 보고된 바 있다(Nelson, H.D et al., JAMA, 288:872-881, 2002; Lemay, A., J.Obstet. Bynaecol. Can., 24:711-7152-3). 또한, 비스포스포네이트 제제의 경우, 최근 복용하는 환자에서 턱뼈의 괴사, 중증 심방세동, 뼈나 관절의 무력화 또는 근골격의 통증이 발생하는 사례가 해마다 증가되고 있다(Coleman RE., Br J Cancer, 98:1736-1740(2008). 따라서 부작용 발현이 적으면서도 효과적으로 골흡수를 억제할 수 있는 새로운 골질환 치료제의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

[0007] 골질환 치료제에 관한 종래기술로서, 대한민국 공개특허 제10-2010-0081478호에는 마가목 및 현지초 추출물을 포함하는 파골세포 분화 억제용 또는 연골세포 분화 촉진용 조성물이 개시되어 있고, 대한민국 등록특허 제10-1306408호에는 진세노사이드 Rd를 유효성분으로 함유하는 골형성 촉진용 조성물이 개시되어 있다.

[0008] 한편, 양막(amnion membrane)과 융모막(amnion/chorion membrane)은 태반을 구성하고 있는 여러 층 중 가장 안쪽에 있는 막으로, 양수와 태아를 둘러싸고 있어 태아를 외부의 병원균으로부터 보호하고 양수와 태아의 생체항상성을 유지하여 태아사 정상적으로 성장/발달 할 수 있는 환경을 조성하는 역할을 한다. 양막/융모막은 각종 성장인자들(growth factors), 즉 표피세포 성장인자 (epidermal growth factor, EGF), 섬유아세포 성장인자 (fibroblast growth factor, FGF), 전환 성장인자 (transforming growth factor, TGF-b), 신경 성장인자 (nerve growth factor, NGF) 및 간장 성장인자 (hepatic growth factor, HGF)등을 포함하고 있는 것으로 알려져 있으며 그 자체로 콜라겐으로 구성된 세포외 기질과 상피세포로 구성되어 있으며 항염증 (anti-inflammation), 항균 (anti-bacterial) 성분을 포함하고 있으며 혈관생성 조절 성분 (angiogenic modulatory properties)들이 있다. 종래에는 태반 추출물을 다양한 약리학적 용도로 사용하는 것이 제안된 바 있으며, 예를 들어 대한민국 등록특허 제10-0756974호에는 히스타민, 면역글로불린 및 태반 추출물을 함유하는 알레르기 질환 및 만성 염증성 질환 치료용 약학적 조성물을 개시한바 있고, 대한민국 등록특허 제10-0725133호에는 자가혈청

과 태반추출물을 이용하여 콜라겐을 생성하는 세포인 섬유아세포(fibroblast)를 배양하는 방법 및 이를 이용한 피부 재생용 조성물을 개시한 바 있다. 그러나 이에는 태반을 구성하는 양막과 융모막의 복합 추출물을 포함하는 조성물이 골형성을 촉진하는 효능이 있다는 것에 대해서는 개시된바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 양막 및 융모막의 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 골형성 촉진용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 양막 및 융모막의 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 양막 및 융모막의 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 골형성 촉진용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 양막 및 융모막의 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 골질환은 골결손, 골다공증, 골다공증성 골절, 당뇨병성 골절, 불유합골절, 골형성 부전증, 골연화증 및 이로 인한 골절, 골형성 장애, 퇴행성 골질환 또는 부정교합 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 복합추출물은 양막 및 융모막 추출물을 1:9 내지 9:1의 중량비로 혼합한 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 복합추출물은 양막 및 융모막 추출물을 1:9 내지 4:6의 중량비로 혼합한 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 복합추출물은 양막 및 융모막 추출물을 6:4 내지 9:1의 중량비로 혼합한 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용 액으로 제형화되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 양막 및 융모막의 복합추출물은 우수한 골 형성 촉진 효과를 나타낸다. 따라서, 본 발명의 양막 및 융모막의 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 골형성 촉진 및 골질환, 예컨대 골결손, 골다공증, 골다공증성 골절, 당뇨병성 골절, 불유합골절, 골형성 부전증, 골연화증 및 이로 인한 골절, 골형성 장애, 퇴행성 골질환 또는 부정교합 및 골형성 또는 골재생에 의해 치료가능한 임의의 질병 예방 또는 치료 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 본 발명에 따른 양막 및 융모막의 복합추출물을 처리하지 않은 그룹(a)과 처리한 그룹(b)을 골 형성 유도 배지(osteogenesis induction medium, OIM)에서 배양 후 4 일째의 MG-63 세포의 형태를 나타낸 이미지이다.

도 2는 본 발명에 따른 양막 및 융모막의 복합추출물을 처리하지 않은 그룹과 처리한 그룹을 골 형성 유도 배지(osteogenesis induction medium, OIM)에서 배양 후 3일째와 7일째의 MG-63 세포의 ALP(alkaline phosphatase)의 활성을 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명에 따른 양막 및 융모막의 복합추출물을 처리하지 않은 그룹과 처리한 그룹을 골 형성 유도 배지(osteogenesis induction medium, OIM)에서 배양 후 3일째와 7일째의 MG-63 세포의 ALP(alkaline phosphatase)의 발현 정도를 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명에 따른 양막 및 융모막의 복합추출물을 처리하지 않은 그룹과 처리한 그룹을 골 형성 유도 배

지(osteogenesis induction medium, OIM)에서 배양 후 24일째의 MG-63 세포의 OCN(osteocalcin)(a)과 OPN(osteopontin)(b)의 발현 정도를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명에 따른 양막 및 융모막의 복합추출물을 처리하지 않은 그룹과 처리한 그룹을 골 형성 유도 배지(osteogenesis induction medium, OIM)에서 배양 후 24일째의 MG-63 세포의 칼슘함량을 나타낸 그래프이다.

도 6은 본 발명에 따른 양막 및 융모막의 복합추출물의 농도에 따른, 골 형성 유도 배지(osteogenesis induction medium, OIM)에서 배양 후 7일째의 MG-63 세포의 칼슘함량을 나타낸 그래프이다.

도 7은 본 발명의 복합추출물의 양막과 융모막 혼합 비율에 따른, 배양 후 7일째의 MG-63 세포의 ALP(alkaline phosphatase)의 활성을 나타낸 그래프이다.

도 8은 본 발명의 복합추출물의 양막과 융모막 혼합 비율에 따른, 배양 후 3, 7, 10일째의 MG-63 세포의 ALP(alkaline phosphatase)의 활성을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0021] 본 발명자들은 골 관련 질환의 치료를 위한 다양한 활성 물질을 검색한 결과, 놀랍게도 태반을 구성하고 있는 여러 층 중 가장 안쪽에 위치한 양막과 융모막의 복합추출물이 골형성 촉진 효과를 나타내는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0022] 본 발명은 양막 및 융모막의 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 골형성 촉진용 약학적 조성물을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 양막 및 융모막의 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0024] 이때, 골질환은 골결손, 골다공증, 골다공증성 골절, 당뇨병성 골절, 불유합골절, 골형성 부전증, 골연화증 및 이로 인한 골절, 골형성 장애, 퇴행성 골질환 및 부정교합 등을 포함하며, 골 형성 또는 골 재생에 의해 치료 가능한 모든 질병을 포함한다.

[0025] 상기 복합추출물은 태반 조직에서 박리한 양막/융모막 조직으로부터 제조할 수 있다. 또한, 상기 복합추출물은 양막 및 융모막 추출물을 1:9 내지 9:1의 중량비로 혼합하여 제조하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 복합추출물은 양막 및 융모막 추출물을 1:9 내지 4:6 또는 6:4 내지 9:1의 중량비로 혼합하여 제조하는 것이 더욱 바람직하다.

[0026] 본 발명의 약학적 조성물 내 복합추출물의 함량은 질환의 증상, 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 30 내지 80 중량%, 바람직하게는 50 내지 70 중량% 이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명의 약학적 조성물 내 유효성분으로 함유되는 복합추출물은 약제학으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제 등과 함께 제제화할 수 있다.

[0028] 본 발명에 따른 양막 및 융모막의 복합추출물을 함유하는 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용 액 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0029] 여기에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 물, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제, 기타 약제학적으로 허용가능한 첨가제를 포함할 수 있다.

[0031] 경구투여를 위한 고형제제로 제제화되는 경우, 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 가능하며, 이러한 고형제제는 양막 및 융모막의 복합추출물 이외에 적어도 한 가지 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴, 칼슘카보네이트 등을 혼합하여 제조될 수 있다.

[0032] 경구투여를 위한 액상제제로 제제화되는 경우, 현탁제, 내용액제, 시럽제, 유제 등이 가능하며, 흔히 사용되는

단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 외에 여러 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0033] 비경구 투여를 위한 제제로 제제화되는 경우, 멸균된 수용액, 비수성 용제, 유제, 현탁제, 동결건조제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌글리톨, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 좌제의 기제로는 위탭솔, 트윈 61, 라이린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위해 본 발명의 투여량은 유효성분인 양막 및 융모막의 복합추출물 함량을 기준으로 성인 남성 기준 1일 1 mg/kg 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 1 mg/kg 내지 60 mg/kg이다. 투여는 1일 1회 내지 수회 나누어 투여할 수 있으며, 환자의 나이, 성별, 체중, 식이, 배설율, 현재 복용중인 다른 약물에 따라 적절히 증감하여 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 유효량의 범위를 고려하여 제조하도록 하며, 이렇게 제형화된 단위투여형 제제는 필요에 따라 약제의 투여를 감시하거나 관찰하는 전문가의 판단과 개인의 요구에 따라 전문화된 투약법을 사용하거나 일정시간 간격으로 수 회 투여할 수 있다.

[0035] 본 발명의 약학적 조성물은 랫트, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로, 예를 들면 경구로 또는 복강내, 직장내, 정맥내, 근육내, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내로 주사 등에 의해 투여될 수 있다.

[0036] 본 발명의 약학적 조성물은 골질환, 예컨대 골결손, 골다공증, 골다공증성 골절, 당뇨병성 골절, 불유합골절, 골형성 부전증, 골연화증 및 이로 인한 골절, 골형성 장애, 퇴행성 골질환 및 부정교합 중에서 선택되는 하나 이상의 질환의 예방 또는 치료를 위하여 사용될 수 있다.

[0037] 따라서, 본 발명은 상기 열거한 질환의 예방 또는 치료를 위한 양막 및 융모막 복합추출물의 용도, 상기 열거한 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조를 위한 양막 및 융모막 복합추출물의 용도, 인간을 포함한 포유류에 약제학적으로 허용가능한 양의 양막 및 융모막 복합추출물을 투여하는 것을 포함하는 상기 열거한 질환의 예방 또는 치료를 위한 방법을 제공한다.

[0038] 이하에서는 바람직한 실시예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0039] <u>제조예.</u>

[0040] 내과, 산과 또는 외과 합병증의 증상을 보이지 않고 혈액 검사를 통해 HBV, HCV 그리고 HIV 바이러스가 감염되지 않은 정상 인간 태반(=37 주 임신)을 제왕절개술 이후 수득하였고, 공여자 모두로부터 동의를 받았다. 샘플의 수집 및 실험 목적으로의 사용은 고려대학교 의과대학으로부터 IRB 승인을 받았다. 각각의 태반으로부터 양막(Amnion membrane)과 융모막(Chorion)을 박리한 후, 이들의 혼합물을 PBS로 세척하고, 액체 질소로 동결시킨 뒤, 분쇄하였다. 분쇄물을 PBS 1 ㎖당 1 g의 비율로 혼합한 후, 4 ℃에서 1 시간 동안 균질화한 후에 원심분리하였다. 원심분리 후, 상등액을 취하여 본 발명에 따른 양막과 융모막의 복합추출물(A/CME)을 수득하였다.

[0041] <u>시험예. 양막 및 융모막 복합추출물의 골형성 촉진 효과 확인</u>

[0042] (1) 세포 배양

[0043] 본 발명에서 이용한 인간 골육종 세포주인 MG-63(한국세포주은행, KCLB)은 10%(v/v) FBS(Fetal bonine serum) 및 1%(w/v) 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 37 ℃, 5% CO_2 습한 환경에서 배양하였다.

[0044] (2) MG-63 세포의 형태 변화 관찰

[0045] 양막 및 융모막 복합추출물의 효과를 확인하기 위하여 골형성 유도 배지(osteogenesis induction medium, OIM)에서 MG-63 세포에 100 ㎍/㎖의 복합추출물(A/CME)를 처리한 후, 복합추출물을 처리하지 않은 대조군과 함께 현미경을 통해 형태변화를 관찰하였다.

[0046] 도 1은 본 발명에 따른 양막 및 융모막의 복합추출물을 처리하지 않은 그룹(a)과 처리한 그룹(b)을 골 형성 유도 배지(osteogenesis induction medium, OIM)에서 배양 후 4 일째의 MG-63 세포의 형태를 나타낸 이미지이다.

[0047] 측정 결과, 복합추출물을 처리한 군과 처리하지 않은 군은 다른 성장 패턴을 보이는바, 복합추출물을 처리한 군의 경우 세포 단층(monolayer)의 매트릭스 내에서 칼슘 침착이 관찰(화살표)되었는바, 석화작용(mineralization)이 증가하였음을 확인할 수 있었다.

[0048] **(3) 양막 및 융모막 복합추출물에 의한 ALP(alkaline phosphatase) 활성도 측정 실험**

[0049] ALP는 골형성시 초기 단계에 나타나는 골 형성의 지표 효소로 알려져 있다.

[0050] 양막 및 융모막 복합추출물의 효과를 확인하기 위하여 골형성 유도 배지(osteogenesis induction medium, OIM)에서 MG-63 세포에 100 ㎍/㎖의 복합추출물(A/CME)를 처리한 후, 복합추출물을 처리하지 않은 대조군과 함께 ALP 활성도를 측정하였다.

[0051] 구체적으로, 3일, 7일째의 시료를 취하여, 차가운 PBS buffer로 2회 세척한 다음, 0.1% Triton X-10이 첨가된 세포막 분해 용액(cell lysis buffer)로 용해(lysis) 시켰다. 용해된 세포를 섭씨 4도, 13000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 회수하여 브래드포드법으로 정량하고, 동량의 단백질을 ALP kit(아나스펙, Inc, Fermont, Canada)로 제조사의 지침에 따라 405 nm에서 ALP 활성도를 측정하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0052] 이를 통해, 양막 및 융모막 복합추출물을 처리한 군은 분화 7일째에 대조군에 비해 현저히 높은 ALP 활성도를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0053] **(4) 양막 및 융모막 복합추출물에 의한 골분화 촉진 유전자 발현 증가 효과 확인**

[0054] 분화 과정 중 유전자 변화를 확인해보기 위해 분화 단계별 세포로부터 전체 RNA를 트리졸 시약(인비트로젠, CA, USA)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 분리하였다. ALP는 골형성시 초기 단계에 나타나는 골 형성의 지표 효소로서, 3일째와 7일째의 세포로부터 전체 RNA를 얻어 실험을 수행하였고, OCN(osteocalcin)과 OPN(osteopontin)은 골분화 중후반 지표물질로서, 분화 24일째의 세포로부터 전체 RNA를 얻어 실험을 수행하였다. 배양된 세포를 차가운 PBS로 2회 세척한 다음 트리졸 시약 1 ml을 넣어 용해시켰다. 200 ㎕ 클로로포름을 넣어 섞어준 다음 섭씨 4도, 12000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액에 500 ㎕의 이소프로판올을 넣어 섞어준 다음 섭씨 4도, 12000 rpm으로 다시 원심 분리하였다. 상층액은 버리고 남은 펠렛을 70% 에탄올로 3회 세척한 다음 RNA를 분리하였다. RT-PCR을 위해 동량의 전체 RNA(5 ㎕)에 RT-PCR 증폭 키트를 넣어 섭씨 45도에서 60분간 반응시켜 cDNA를 제조하였다. cDNA는 각각 ALP, OCN, OPN에 특이적인 프라이머를 이용하여 실시간 PCR 방법으로 증폭하였다. 실시간 PCR은 cDNA에 SYBR 그린 시약(로슈, Basel, Switzerland)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 실시하였다. 구체적으로 동량의 cDNA에 2X SYBR 그린을 10 ㎕와 각각의 0.5 pmol/㎕ 프라이머를 1 ㎕ 넣은 후 95도에서 30초, 섭씨 60도에서 1 분씩, 40 회 반응을 시켜 증폭하였다.

[0055] RT-PCR 결과, 골분화 촉진 유전자의 발현 결과를 도 3(ALP), 도 4(OCN, OPN)에 나타내었다.

[0056] 도 3에서 확인되는 바와 같이, 골분화 과정 중 초기단계 지표물질인 ALP의 mRNA 발현은 양막 및 융모막 복합추출물을 처리한 군에서 분화 7일째에 대조군에 비해 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0057] 또한, 도 4에서 확인되는 바와 같이, 골분화 중후반 지표물질인 OCN과 OPN의 mRNA 발현은 양막 및 융모막 복합추출물을 처리한 군에서 분화 24일째에 대조군에 비해 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0058] **(5) 양막 및 융모막 복합추출물에 의한 석화작용(mineralization) 측정 실험**

[0059] 칼슘 침착 평가(석화작용)는 조골세포의 분화 중 중후반 지표로 널리 사용된다.

[0060] 양막 및 융모막 복합추출물의 효과를 확인하기 위하여 골형성 유도 배지(osteogenesis induction medium, OIM)에서 MG-63 세포에 100 ㎍/㎖의 복합추출물(A/CME)를 처리한 후, 복합추출물을 처리하지 않은 대조군과 함께 칼슘의 함량을 측정하였다.

[0061] 칼슘의 함량은 QuantiChromTM 칼슘 분석 키트(DICA-500)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0062] 이를 통해, 양막 및 융모막 복합추출물을 처리한 군은 분화 24일째에 대조군에 비해 현저히 높은 칼슘 함량을 나타었는바($^{*}P<0.05$), 양막 및 융모막 복합추출물이 석회화 작용을 현저히 증가시킴을 확인할 수 있었다.

[0063] **(6) 양막 및 융모막 복합추출물의 농도에 따른 석화작용(mineralization) 측정 실험**

[0064] 양막 및 융모막 복합추출물의 농도에 따른 효과를 확인하기 위하여 골형성 유도 배지(osteogenesis induction medium, OIM)에서 MG-63 세포에 25, 50, 100, 200, 400, 800 ㎍/㎖의 복합추출물(A/CME)를 처리한 후, 복합추출물을 처리하지 않은 대조군과 함께 칼슘의 함량을 측정하였다.

[0065] 칼슘의 함량은 QuantiChromTM 칼슘 분석 키트(DICA-500)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0066] 이를 통해, 양막 및 융모막 복합추출물이 농도 의존적으로 석회화 작용을 증가시킴을 확인할 수 있었다.

[0067] **(7) 양막과 융모막 함량비에 따른 ALP(alkaline phosphatase) 활성도 측정 실험**

[0068] 복합추출물의 양막과 융모막 혼합 비율에 따른 효과를 확인하기 위하여, 자연상태의 태반에서 분리한 양막과 융모막을 단순히 혼합하여 제조한 복합추출물(A/C)와, 양막과 융모막의 비율을 1:9 내지 9:1의 비율로 혼합하여 제조한 복합추출물의 ALP 활성도를 상기 (3)과 동일한 방법에 의해 측정하였으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0069] 측정 결과, 양막과 융모막의 혼합비율을 5:5로 한 경우, A/C의 활성도와 가장 가깝다는 것을 확인하였는바, 자연상태의 태반으로부터 분리한 양막과 융모막으로부터 제조된 A/C의 경우 양막과 융모막의 비율이 1:1에 가깝다는 것을 유추할 수 있었다.

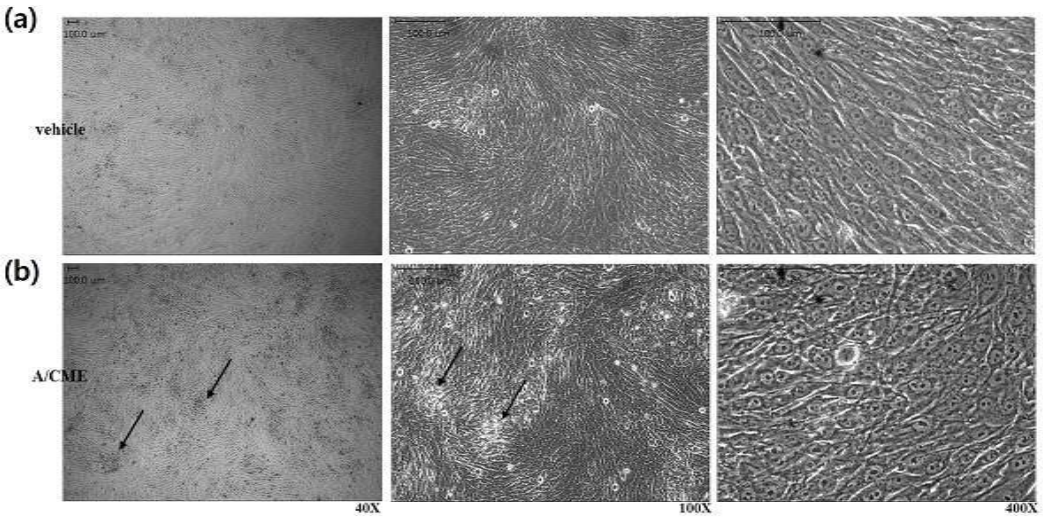
[0070] 또한, 양막과 융모막의 혼합비율이 9:1인 경우 가장 높은 ALP 활성도를 나타내었으며, 혼합비율이 1:9 내지 4:6 또는 6:4 내지 9:1인 경우 1:1로 혼합한 추출물에 비해 ALP 활성도가 증가함을 확인할 수 있었다.

[0071] 상기의 결과를 통해 양막과 융모막의 혼합 비율이 1:9, 9:1인 경우 ALP 활성도가 가장 높은 것으로 관찰되었다. 따라서, 양막과 융모막을 단순히 혼합하여 제조한 복합추출물(A/C), 양막 추출물(AME), 융모막 추출물(CME), 융모막 추출물의 동결건조물(CME동)과, 양막과 융모막의 혼합 비율이 1:9, 9:1인 경우의 ALP 활성도를 분화 3, 7, 10일째로 나누어 상기 (3)과 동일한 방법에 의해 측정하였으며, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

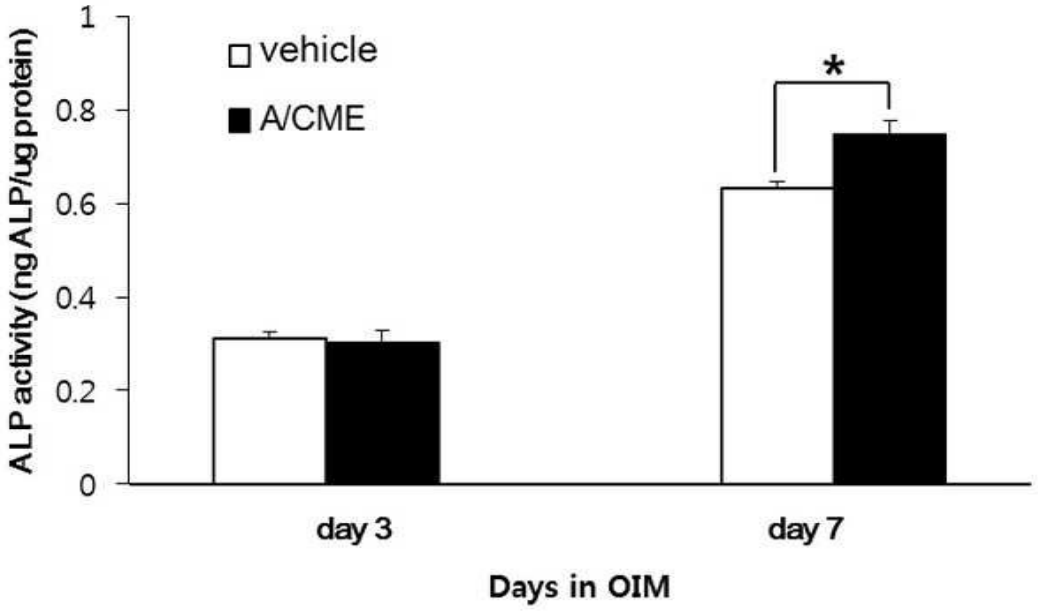
[0072] 측정 결과, 양막과 융모막의 혼합비율이 1:9, 9:1인 경우 골분화 과정 중 초기단계 지표물질인 ALP 활성도가 분화 7일째 가장 높게 측정되었는바, ALP 활성도를 증가시키는 것과 동시에, 10일째 이미 ALP 활성도가 떨어지는 것으로 보아 석회화 반응을 시작했음을 알 수 있다. 즉, 골형성을 조기에 촉진시키는 효과가 현저히 향상됨을 확인할 수 있었다.

도면

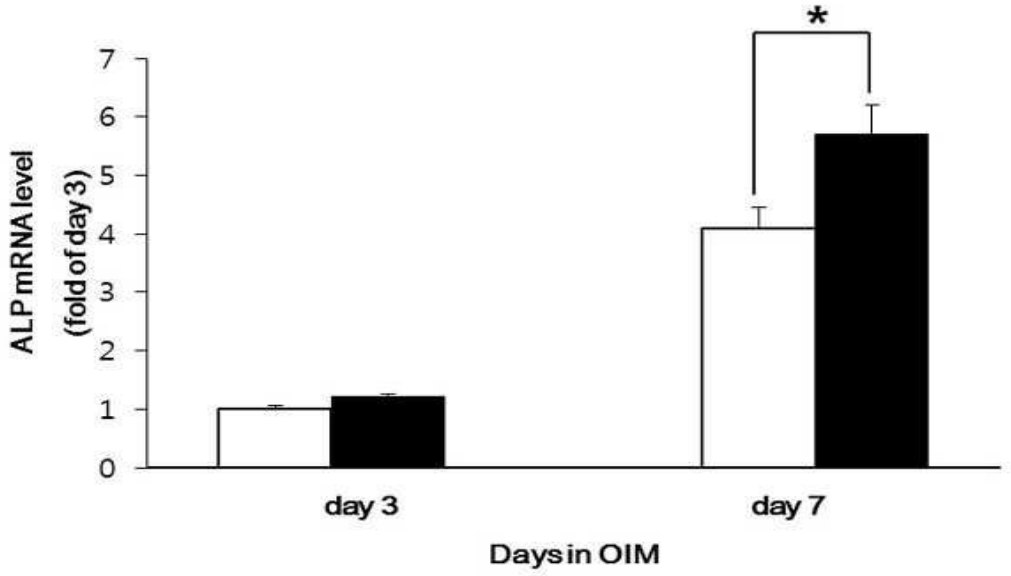
도면1


(a)
vehicle
(b)
A/CME
40X
100X
400X

도면2

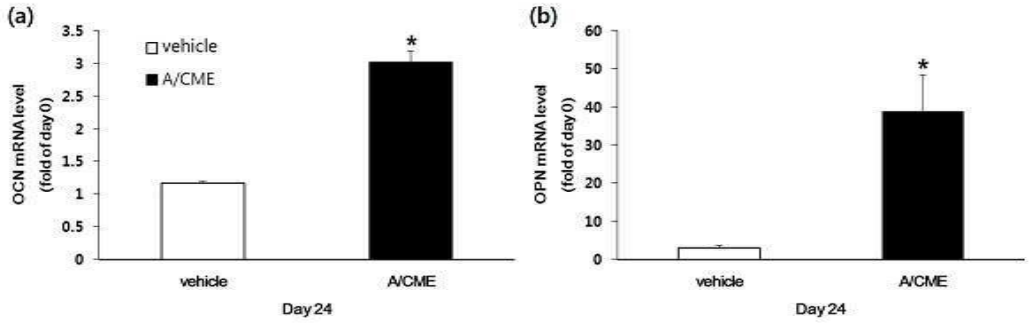

ALP activity (ng ALP/ug protein)
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
vehicle
A/CME
*
day 3
day 7
Days in OIM

도면3



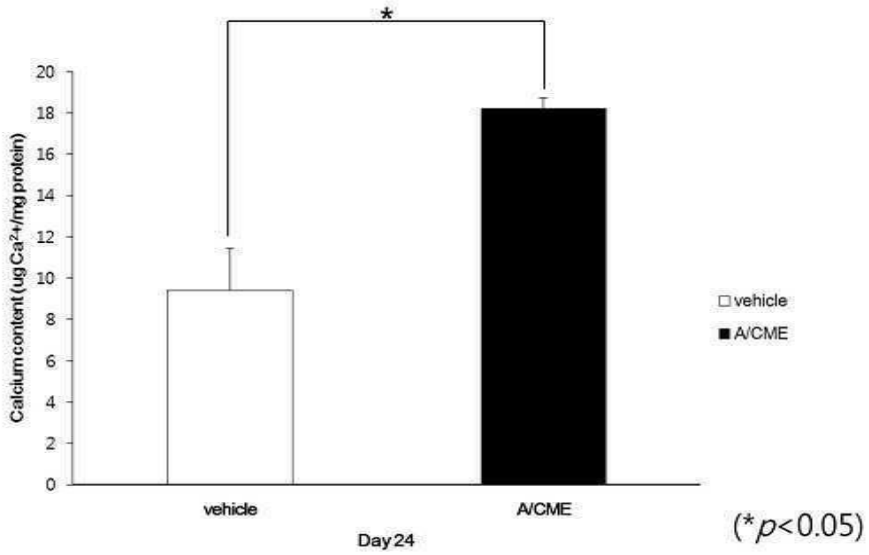
(*p<0.05)

도면4

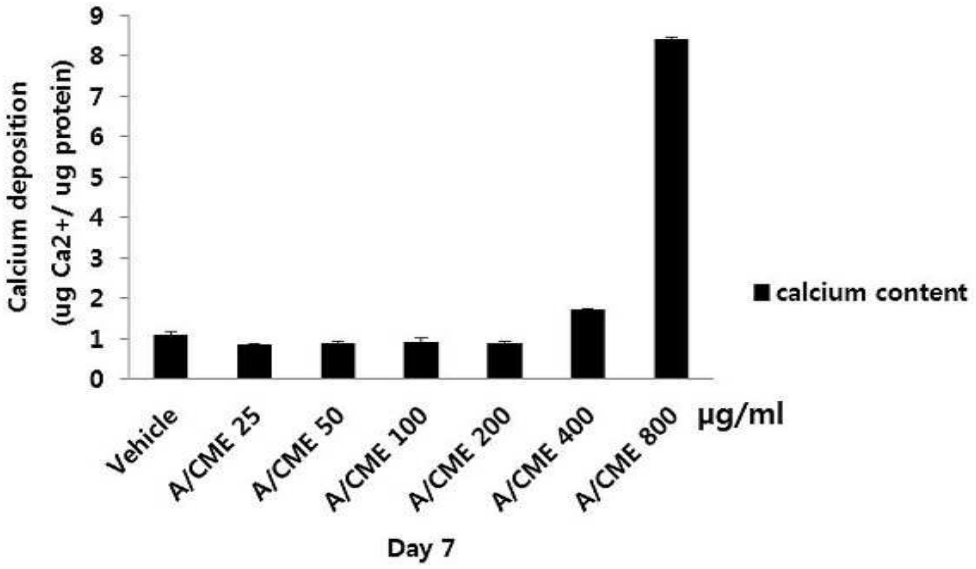


(*p<0.05)

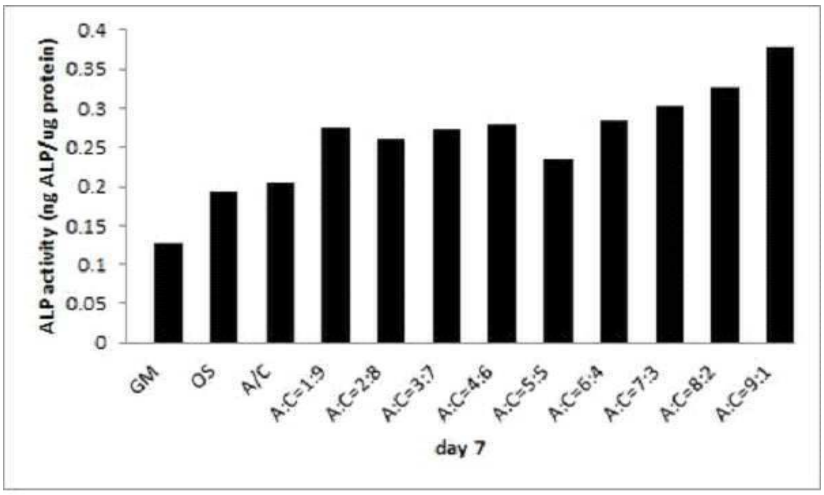
도면5


*
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Calcium content (ug Ca2+/mg protein)
vehicle
A/CME
Day 24
vehicle
A/CME
(*p<0.05)

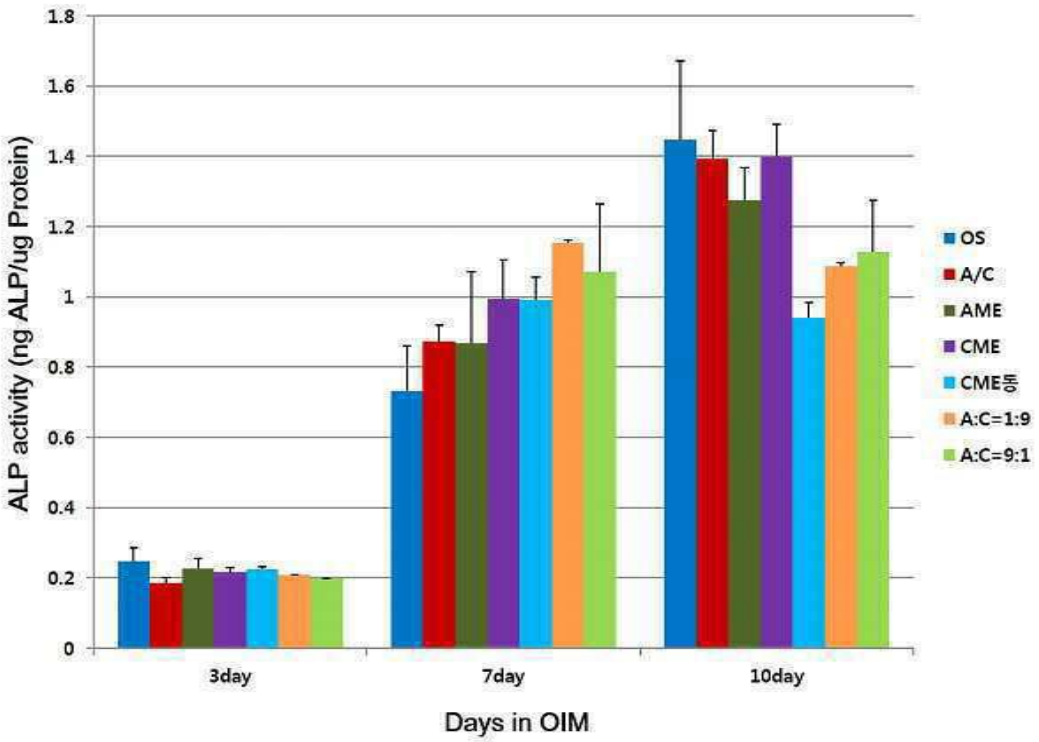
도면6


9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Calcium deposition
(ug Ca2+/ ug protein)
calcium content
Vehicle
A/CME 25
A/CME 50
A/CME 100
A/CME 200
A/CME 400
A/CME 800
μg/ml
Day 7

도면7


ALP activity (ng ALP/ug protein)
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
GM
OS
A/C
A:C=1:9
A:C=2:8
A:C=3:7
A:C=4:6
A:C=5:5
A:C=6:4
A:C=7:3
A:C=8:2
A:C=9:1
day 7

도면8


ALP activity (ng ALP/ug Protein)
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
3day
7day
10day
Days in OIM
OS
A/C
AME
CME
CME동
A:C=1:9
A:C=9:1