(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024 년 5 월 2 일 (02.05.2024)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2024/090980 A1

(51) 국제특허분류:
A23L 33/17 (2016.01) *A61K 35/64* (2006.01)
A23L 2/38 (2006.01) *A61P 19/08* (2006.01)
A23K 10/20 (2016.01) *C12N 5/077* (2010.01)
A61K 38/10 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2023/016621

(22) 국제출원일: 2023 년 10 월 25 일 (25.10.2023)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

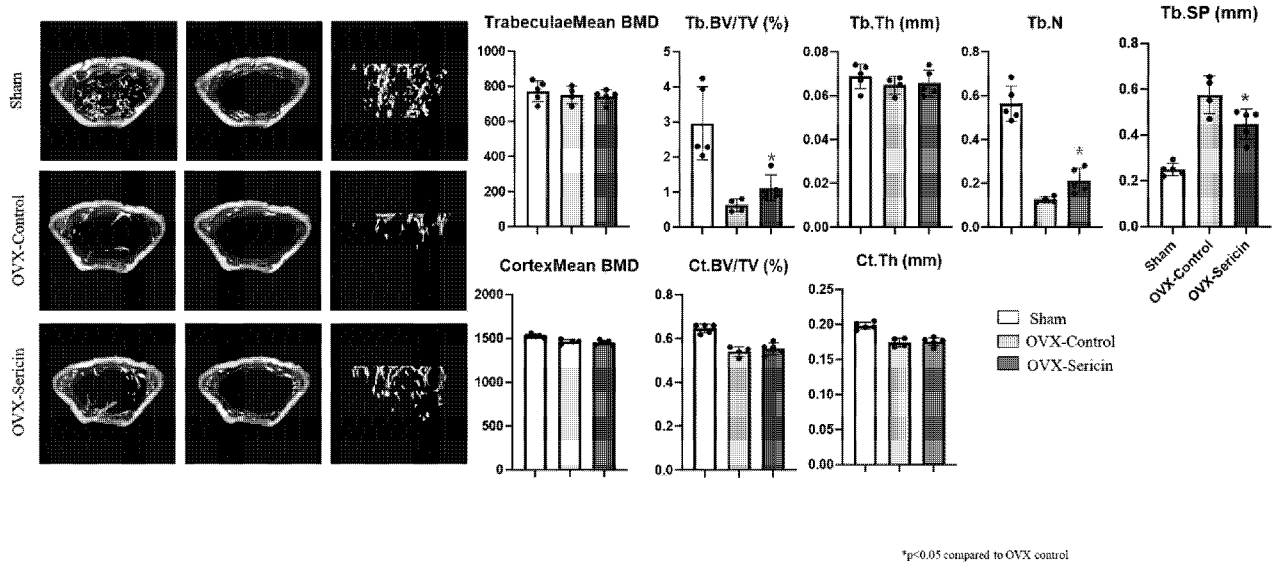
(30) 우선권정보:
10-2022-0138404 2022 년 10 월 25 일 (25.10.2022) KR

(71) 출원인: 대한민국(농촌진흥청장) (**REPUBLIC OF KOREA(MANAGEMENT : RURAL DEVELOPMENT ADMINISTRATION)**) [KR/KR]; 54875 전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300, Jeollabuk-do (KR). 경북대학교 산학협력단 (**KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 41566 대구광역시 북구 대학로 80, Daegu (KR).

(72) 발명자: 권해용 (**KWEON, Hae Yong**); 55365 전라북도 완주군 이서면 농생명로 166, Jeollabuk-do (KR). 이지혜 (**LEE, Ji Hae**); 55365 전라북도 완주군 이서면 농생명로 166, Jeollabuk-do (KR). 최제용 (**CHOI, Je Yong**); 41593 대구광역시 북구 옥산로 103, 205동 803호, Daegu (KR). 차상국 (**CHE, Xiangguo**); 41948 대구광역시 중구 달구벌대로443길 25-16, 206호, Daegu (KR). 김한 (**JIN, Xian**); 41948 대구광역시 중구 달구벌대로447길 34-35, 205호, Daegu (KR). 최푸름 (**CHOI, Poo Reum**); 06586 서울특별시 서초구 방배로26길 41, 101동 1002호, Seoul (KR). 김현주 (**KIM, Hyun Ju**); 42094 대구광역시 수성구 범어로 75, 101동 1802호, Daegu (KR). 이동교 (**LEE, Dong Kyo**); 51537 경상남도 창원시 성산구 정동로162번길 78, Gyeongsangnam-do (KR). 최영 (**CUI, Ying**); 41942 대구광역시 중구 동성로4길 16, Daegu (KR).

(54) **Title:** COMPOSITION FOR IMPROVING BONE FUNCTION COMPRISING SERICIN AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭:** 세리신을 포함하는 골 기능 개선용 조성물 및 이의 용도



(57) **Abstract:** The present invention relates to a composition for improving bone function comprising sericin, and use thereof. The sericin of the present invention is a protein derived from a natural material, and thus not only is safe, has less denaturation, and is biocompatible, but is also excellent for improving bone function. In particular, a drink-type health functional food for improving bone function comprising the sericin of the present invention as an active ingredient solves the inconvenience of treatment methods compared to existing injectable or tablet therapeutic agents as preparations for improving bone function and curing bone disease damage, and can not only be a great alternative to the existing injectable or tablet therapeutic agents, but also can contribute to economic growth and social benefits by recycling sericin that is discarded as a by-product of silk protein.

WO 2024/090980 A1

[다음 쪽 계속]

(74) 대리인: 특허법인 정진 (JUNGJIN IP LAW FIRM); 08381 서울특별시 구로구 디지털로 29길 38, 505, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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 제21조(3))

(57) 요약서: 본 발명은 세리신을 포함하는 골 기능 개선용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 세리신은, 천연 물질로부터 유래된 단백질이므로 안전하고 변성이 적으며 생체적합할 뿐만 아니라 골 기능 개선 효과가 탁월하다. 특히, 본 발명의 세리신을 유효 성분으로 하는 드링크제 유형의 골 기능 개선 건강 기능 식품은 종래 골기능 개선 및 골질환 손상 치료 관련 제제인 주사용 치료제나 정제 치료제보다 치료 방법의 불편함을 해소하고 이를 대체할 수 있는 훌륭한 대안이 될 수 있을 뿐만 아니라, 실크 단백질의 부산물로 폐기되고 있는 세리신을 재활용함으로써 경제적 성장 및 사회적 이익에도 기여할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 세리신을 포함하는 골 기능 개선용 조성물 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 세리신을 포함하는 골 기능 개선용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[2] 골다공증은 폐경에 의한 에스트로겐의 급격한 감소로 파골세포(osteoclast)의 사멸이 저하되고 수명이 길어지며 골흡수 활성이 증가되어 나타나는 질환이다. 이러한 골다공증으로 인한 골절은 정상적인 회복이 매우 힘들며 심각한 활동장애에 이르게 하며, 고관절 골절의 경우 약 15-35%의 높은 사망률과 관련되어, 골다공증성 골절이 발생하기 이전에 골다공증의 예방과 조기진단 및 치료가 매우 중요하다.

[3] 또한, 뼈와 연관성이 있는 질환으로는 골다공증 이외에도 대표적으로 골관절염(osteoarthritis)과 골결손질환 등이 있으며, 골관절염은 관절의 연골이 변성 또는 손상되면서 국소적으로 퇴행성 변화가 나타나는 질환으로 퇴행성 관절염이라고도 한다. 골관절염의 발생원인은 크게 두 가지로 1) 과도한 부하 또는 염증인자의 노출에 의한 연골의 변성과 2) 골재형성의 불균형으로 파골세포의 활성이 증가하여 연골하골의 재형성으로 인한 골돌기 형성으로 연골이 받는 부하의 불균형으로 인한 연골의 손상과 파괴가 있다.

[4] 골결손 질환은 인체의 여러 부위에서 나타날 수 있는데, 그 주된 원인으로 골질손실을 동반한 급성 외상, 수술 중 조직제거로 인한 골손실을 동반한 급성외상, 골 절제(boneresection)를 수반한 만성 감염, 분절성 골결손을 동반한 만성 불유합 등을 들 수 있다.

[5] 실제로, 이와 같은 골질환 치료와 관련되어 전세계적으로 약 1,300억 달러 이상의 시장이 형성되어 있으며 그 규모는 향후 계속적으로 증가할 것으로 예상되기 때문에 세계적인 각 연구 기관과 제약회사에서는 골질환 치료제 개발에 많은 투자를 하고 있다.

[6] 특히, 골다공증을 예로 들어 살펴보면, 기존에 알려진 골다공증 치료제로는 비스포스포네이트(bisphosphonate)계열의 약물이 있는데, 비스포스포네이트는 골의 무기질 성분에 침착되며, 비스포스포네이트가 침착된 골을 파골세포가 탐식할 경우 가수분해되지 않는 ATP 유사체(analogue)를 형성하여 세포에 독성을 나타내거나 파골세포 내에서 다양한 방식으로 파골세포의 활성 감소 및 세포사멸(apoptosis)을 초래해 골 흡수를 줄이고 이를 통해 골량을 증가시키는 것으로 알려져 있다.

[7] 이러한 약물들은 비교적 안전한 것으로 알려져 있으나, 최근 장기간 사용시 정상적인 골 흡수 및 골 형성에 의한 골의 재형성(remodeling)이나 골절 이후 골 재생(healing)과정에 영향을 주어 골의 탄성이 떨어져 오히려 골 강도에 좋지 않은 영향을 줄 수 있다는 우려들이 제기되고 있으며, 실제로 이로 인해 많은 환자에서 피로 골절을 일으킨다는 보고가 있다.

[8] 이에, 골다공증 발병과 관련된 새로운 골대사 기전의 발견 및 골다공증 예방 또는 치료제 개발의 필요성이 절실하게 요구되고 있는 실정이다.

[9] 더욱이, 골다공증은 약물의 단기 투여만으로는 치료할 수 없으며 약물의 장기 투여가 필수적이다. 따라서, 약물을 장기 투여할 때에도 상기와 같은 부작용이 없고 기존의 치료물질을 대체할 수 있을 만큼 우수한 약효를 갖는 새로운 물질의 개발이 요구되고 있다.

[10] 한편, 세리신(sericin)은 실크 피브로인을 둘러싸고 있는 접착성 물질로서 누에가 방사하는 고치실의 20~30%를 차지하고 있는 중요한 천연 자원이다. 실크 섬유의 정련 과정에서 세리신을 제거하게 되면, 외형적인 구조 변화에 따라 광택이 향상되고 촉감이 부드러워 의복 재료로서 상업적으로 우수한 가치를 갖게 된다. 이러한 이유로, 오랫동안 실크 산업에서 세리신은 버려지는 폐기물로 간주되어 왔다. 즉, 실크를 구성하는 구성요소로서 정련과정에서 부산물로 발생되는 세리신은 천연 성분임에도 상대적으로 섬유나 각종 기능성 식품 및 의약용도로서 가치를 인정받은 피브로인과 달리 다양한 용도에 사용되지 못하고 폐기물로서 별도의 과정을 통해 처분하고 있는 실정이다.

[11] 따라서, 실크 단백질의 부산물로 폐기되고 있는 세리신이 안전한 천연물의 활성 성분을 이용한 대체요법에 재활용된다면 현저한 경제적 성장과 사회적 이익에 기여할 수 있을 것이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 이에, 본 발명자들은 안전하면서도 효과적인 골 기능 개선 및 골대사 질환 예방용 물질을 개발하기 위해 예의 연구 노력한 결과, 종래 실크 단백질의 부산물로 폐기되고 있는 세리신이 조골세포의 분화 활성에 우수한 효과가 있으며, 골다공증 동물 모델인 난소 절제 마우스를 대상으로 한 동물실험에서 탁월한 골량 개선 효과가 있음을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

[13] 따라서, 본 발명의 일 목적은 골기능 개선용 식품 조성물을 제공하는 데 있다.

[14] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 골기능 개선용 건강기능식품을 제공하는 데 있다.

[15] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[16] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 골질환의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[17] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 골기능 개선용 사료 조성물을 제공하는 데 있다.

[18] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 세리신을 유효성분으로 포함하는 조골세포의 분화 촉진 및 파골세포의 분화 억제용 배지 조성물을 제공하는 데 있다.

[19] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 세리신을 유효성분으로 포함하는 골기능 개선용 식품 조성물의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

[20] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 유효량의 세리신을 포함하는 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 골질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 데 있다.

과제 해결 수단

[21] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[22] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[23]

[24] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[25]

[26] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 세리신을 유효성분으로 포함하는 골기능 개선용 식품 조성물 및 이의 제조방법을 제공한다.

[27] 본 발명의 세리신은 실크에서 유래된 것이다.

[28] 본 명세서에서 용어 "실크"는 견사 곤충이 토사하여 만든 섬유를 의미하며, 바람직하게는 누에(Bombyx mori)가 토사하는 가잠사를 의미한다. 실크 단백질은 피브로인 및 세리신으로 이루어져 있고, 피브로인과 세리신은 각각 평균 75%와 25%의 비율로 존재한다.

[29] 본 명세서에서 용어 "세리신"은 10 kDa부터 300 kDa 까지의 넓은 분자량 대와 18개의 아미노산으로 구성된 고분자 단백질을 의미한다. 세리신은 생사 상태에서 외층으로부터 내층으로 갈수록 아미노산 함량이나 용해성 정도가 달라진다.

[30] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 세리신은 누에고치를 30 내지 100℃에서 30 분 내지 3 시간 동안 용매 추출하여 수득된 것으로, 조골세포의 분화 촉진 및 파골세포의 분화 억제 활성을 나타내는 것을 특징으로 한다.

[31] 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한, 상기 세리신의 추출에 이용되는 용매의 종류 및 비율은 제한되지 않는다.

[32] 상기 용매는 물, 탄소수 1 내지 4개의 알코올 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상이며, 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한, 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 물이다.

[33] 상기 탄소수 1 내지 4개의 저급 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 및 이소부탄올로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[34] 상기 물, 탄소수 1 내지 4개의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용액은 세리신의 중량을 기준 1~10배 부피를 사용할 수 있다.

[35] 본 발명에서는 세리신을 가공하여 가공물 형태로 제조하여 약학적 조성물 또는 식품조성물(건강기능식품)의 유효성분으로 사용할 수 있다.

[36] 상기 세리신은 바람직하게는 누에고치를 70℃에서 1 시간 동안 열수 추출하여 제조하는 것이 특징이다.

[37] 즉, 70℃ 미만의 열로 1 시간을 초과하여 제조할 경우에는 제조시간이 너무 길어 오히려 누에고치 자체가 갖고 있는 유효성분들이 파괴될 우려가 있으며, 70℃를 초과하여 1 시간 미만으로 제조할 경우에는 온도가 너무 높아 이 또한, 누에고치 자체가 갖고 있는 유효성분들에 악영향을 미칠 우려가 있기 때문이다.

[38] 따라서, 본 발명의 세리신은 70℃에서 1 시간 동안 열수 추출하여 제조된 세리신인 것이 바람직하고, 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한, 0.001 내지 10%(v/v)의 농도로 조성물에 포함되는 것이 바람직하며, 본 발명의 일 실시예에서는 0.01%(v/v)의 농도로 포함된다.

[39] 상기 식품 조성물은 건강 기능 식품(health functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 식품 첨가제(food additives), 특수의료용도 식품(Special medicinal food) 및 식이보조제 등의 모든 형태의 식품에 대한 조성물을 포함한다.

[40] 본 발명에 있어서, 건강기능식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병 방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다.

[41] 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 예로는 드링크제, 유제품, 제과물, 조미료, 음료, 스낵, 캔디류, 아이스크림 및 냉동용 디저트, 아침 곡물류, 영양바, 스낵 바 초콜렛 제품, 가공 식품, 곡물 제품, 파스타, 스프, 소스 및 드레싱, 과자 제품, 오일 및 지방제품, 유제품 음료(dairy drink), 우유 음료, 두유, 콩 유제품(soy dairy-like product), 냉동식품, 조리 음식, 대체음식, 육류 제품, 치즈, 요

구르트, 빵, 롤빵, 효모 제품, 케이크, 쿠키 및 크래커로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나 이에 한정되지는 않으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[42] 본 발명에 있어서 식품 조성물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조 시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품 조성물의 제형 또한 식품 조성물로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다.

[43] 본 발명에 따른 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 또한 식품에는 특수영양식품 (예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류 (예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조식품, 조미식품 (예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류 (예, 스넥류), 캔디류, 초코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품 (예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품 (각종 김치류, 장아찌 등), 음료 (예, 과실 음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료 (예, 라면 스프 등), 식품첨가제 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[44] 본 발명의 조성물을 건강기능식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 건강기능식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 바람직하게는 50 중량부 이하, 보다 바람직하게는 25 중량부 이하의 양으로 첨가할 수 있다. 그러나, 건강 조절 및 위생을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안정성 면에서 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용할 수 있다.

[45] 본 발명의 식품 또는 건강기능식품 조성물은 유효성분인 본 발명의 세리신을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[46] 또한, 상기 식품 조성물은 본 발명의 세리신 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산

화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[47] 본 발명의 세리신은 골기능 개선 효과를 나타내므로, 예컨대, 노년층의 건강기능식품 또는 성장층의 성장 촉진용 건강기능식품으로 유용하게 사용될 수 있다. 동시에 골기능 감소로 고통받는 환자의 특수의료용 식품(Special medicinal food)로 사용될 수 있다.

[48] 이때, 상기 세리신은 본 발명의 식품 조성물에 0.01~100 중량%로 하여 사용될 수 있다. 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다. 예를 들면, 건강식품으로는 세리신이 함유된 껌, 비타민 복합체, 차, 주스 및 드링크제 형태로 제조할 수 있으며, 세리신을 유효성분으로 하는 식품 조성물을 과립화, 캡슐화 또는 분말화하여 섭취할 수 있다. 본 발명의 기능성 식품 조성물은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함할 수 있다.

[49] 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 세리신 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[50] 상기 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 추출물을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[51] 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취인 경우, 본 발명의 식품 조성물은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 장기간 복용이 가능하다.

[52]

[53] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 세리신을 유효성분으로 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 및/또는 수의학 조성물을 제공한다.

[54] 또한, 본 발명은 상술한 세리신을 유효성분으로 포함하는 조골세포의 분화 촉진 및 파골세포의 분화 억제용 배지 조성물을 제공할 수도 있다.

[55] 또한, 본 발명은 누에고치에 70℃에서 1 시간동안 열수 추출하여 세리신을 수득하는 단계를 포함하는, 세리신을 유효성분으로 포함하는 골기능 개선용 식품 조성물의 제조 방법을 제공한다.

[56] 본 발명의 세리신은 누에고치를 30 내지 100℃에서 30 분 내지 3 시간 동안 용매 추출하여 수득된 것으로, 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한, 상기 세리신의 추

출에 이용되는 용매의 종류 및 비율은 제한되지 않으나, 바람직하게는 누에고치를 70℃에서 1 시간 동안 열수 추출하여 제조하는 것이 특징이다.

[57] 본 발명의 조성물은 조골세포의 분화 촉진 및 파골세포의 분화 억제 활성을 통해 골량을 증진시켜 뼈의 재형성을 촉진할 수 있으며 뼈의 결손 부위에 충진되는 경우 뼈의 손상 및 결손 부위를 빠르게 골 재생시킬 수 있다.

[58] 본 명세서에서 용어 "골 재생" 또는 "뼈의 재생"은 뼈가 파골세포에 의해 파괴 및 흡수되고 이어서 조골세포에 의해 뼈가 다시 형성되는 과정을 의미한다.

[59] 상기 골질환은 골다공증, 골관절염, 류미티스 관절염, 골연화증, 구루병, 섬유성 골염, 무형성 골질환, 대사성 골질환, 골결손질환 및 뼈의 손상으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1 종 이상일 수 있으며, 골 재생 효과가 발휘하는 한, 이에 제한되지 않는다.

[60] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[61] 본 명세서에서 사용된 용어, "약학적으로 또는 수의학적으로 허용되는 담체"는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[62] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

[63] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.

[64] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 약학적 조성물의 1일 투여량은 0.0001-1000 ㎎/㎏이다.

[65] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적 유효량을 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질 중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[66] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 또는 수의학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 용어 "약학적으로 또는 수의학적으로 유효한 양"은 의학적 및/또는 수의학 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 상기 약학 및/또는 수의학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[67] 본 명세서에서 사용된 용어, "약학적 또는 수의학적 유효량(therapeutically effective amount)"은 투여되는 세리신의 양이 치료하고자 하는 질환인 골 질환의 하나 또는 그 이상의 증상을 어느 정도 경감하는 것을 의미한다. 따라서, 약학적 유효량은, (1) 골 질환의 진행 속도를 역전시키거나 (2) 골 질환의 그 이상의 진행을 어느 정도 정지시키게 하는 것을 의미하며, (3) 골 질환과 관련된 하나 또는 그 이상의 증상을 어느 정도 경감(바람직하게는, 제거)하는 효과를 가지는 양을 의미한다.

[68] 또한, 본 발명은 세리신을 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 의약외품 조성물을 제공한다.

[69] 본 발명에서 사용되는 용어 '의약외품'은 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 개선, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 물품들 중 의약품보다 작용이 경미한 물품들을 의미한다. 예를 들어, 약사법에 따른 의약외품은 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람/동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는 제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않는 제품 등이 포함된다.

[70] 본 발명에 따른 상기 조성물을 의약외품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 또한 의약외품은 피부외용제를 포함할 수 있으며, 상기 피부외용제는 연고제, 로션제, 스프레이제, 패치제, 크림제, 산제, 현탁제, 젤제 또는 젤의 형태로 제조되어 사용될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[71] 또한, 본 발명은 상술한 유효량의 세리신을 포함하는 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 골질환의 예방 또는 치료 방법을 제공할 수 있다.

[72] 본 발명의 조성물 및 방법은 상술한 세리신을 유효 성분으로 포함하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[73]

[74] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 세리신을 유효성분으로 포함하는 골기능 개선용 사료 조성물을 제공할 수 있다.

[75] 상기 세리신은 상기 약학적 조성물이나 식품 조성물의 경우와 동일하게 준비될 수 있다.

[76] 본 발명의 사료 조성물은 사료첨가제 또는 배합사료일 수 있다.

[77] 본 발명의 세리신은 골기능의 향상으로 인하여 전체적인 개선 효과를 나타내므로 동물이나 가축의 성장 촉진제로서 사료 조성물에 포함될 수 있다.

[78] 구체적으로 본 발명에 따른 세리신을 유효성분으로 포함하는 사료는 당업계에서 공지된 다양한 형태의 사료로 제조 가능하며, 바람직하게는 농후사료, 조사료 또는 특수사료가 포함될 수 있다.

[79] 농후사료에는 밀, 귀리, 옥수수 등의 곡류를 포함하는 종자 열매류, 곡물을 정제하고 얻는 부산물로서 쌀겨, 밀기울, 보릿겨 등을 포함하는 겨류, 콩, 유체, 깨, 아마인, 코코야자 등을 채유하고 얻는 부산물인 깻묵류와 고구마, 감자 등에서 녹말을 뺀 나머지인 녹말찌꺼기의 주성분인 잔존녹말질류 등의 찌꺼기류, 어분, 물고기찌꺼기, 어류에서 얻은 신선한 액상물을 농축시킨 것인 피시솔루블(fish soluble), 육분, 혈분, 우모분, 탈지분유, 우유에서 치즈, 탈지유에서 카제인을 제조할 때의 잔액인 훼이(whey)를 건조한 건조훼이 등의 동물질사료, 효모, 클로렐라, 해조류 등이 있다.

[80] 조사료에는 야초, 목초, 풋베기 등의 생초 사료, 사료용 순무, 사료용 비트, 순무의 일종인 루터베어거 등의 뿌리채소류, 생초, 풋베기작물, 곡실 등을 사일로에 채워 놓고 젖산발효시킨 저장사료인 사일리지(silage), 야초, 목초를 베어 건조시킨 건초, 종축용 작물의 짚, 콩과 식물의 나뭇잎 등이 있다.

[81] 특수사료에는 패각, 암염 등의 미네랄 사료, 요소나 그 유도체인 디우레이드이소부탄 등의 요소사료, 천연사료 원료만을 배합했을 때 부족하기 쉬운 성분을 보충하거나, 사료의 저장성을 높이기 위해서 배합사료에 미량으로 첨가하는 물질인 사료첨가물, 식이보조제 등이 있다.

[82] 본 발명에 따른 사료 조성물은 다양한 사료 첨가제를 포함할 수 있다.

[83] 본 발명에서 용어 "사료 첨가제" 란 영양소 보충 및 체중감소 예방, 사료 내 섬유소의 소화 이용성 증진, 유질개선, 번식장애 예방 및 수태율 향상, 하절기 고온 스트레스 예방 등 다양한 효과를 목적으로 사료에 첨가하는 물질을 말한다. 본 발명의 사료첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당하며, 탄산수소나트륨(중조), 벤토나이트 (bentonite), 산화마그네슘, 복합광물질 등의 광물질제제, 아연, 구리, 코발트, 셀레늄 등의 미량 광물질인 미네랄제제, 케로틴, 비타민 E, 비타민 A, D, E, 니코틴산, 비타민 B 복합체 등의 비타민제, 메티오닌, 리이산 등의 보호아미노산제, 지방산 칼슘염 등의 보호지방산제, 생균제(유산균제), 효모배양물, 곰팡이 발효물 등의 생균, 효모제 등이 추가로 포함될 수 있다.

[84] 본 발명에 따른 사료 조성물은 전체적인 골기능 촉진을 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 것이든 적용 가능하다. 상기 개체는 동물, 예를

들어 비-영장류 (예를 들면, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트 및 마우스) 및 영장류 (예를 들면, 원숭이, 예를 들어 사이노몰구스 (cynomolgous) 원숭이 및 침팬지)를 비롯한 포유동물을 나타낸다. 상기 개체는 축산용 동물 (예를 들면, 말, 소, 돼지 등) 또는 애완용 동물 (예를 들면, 개 또는 고양이)이다.

[85] 본 발명에 따른 사료 조성물의 복용량은 동물의 종(species), 크기(size), 무게(weight), 나이(age)와 같은 다수의 요인들에 좌우될 것이다. 원칙적으로, 전형적인 복용량은 동물/일 당 0.001 내지 10 g의 범위일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[86]

[87] 종합적으로, 본 발명은, 새로운 형태의 식의약용 원료인 세리신을 가공하여 섭취할 경우 골기능을 탁월하게 개선시킬 수 있음을 규명한 것으로서, 본 발명을 이용한 건강 보조제 또는 의약품이 개발되어 시판될 것으로 예상되며, 이로 인하여 골기능 감소에 기인한 각종 질환으로 고통받는 수많은 국민들에게 세리신의 가치가 크게 부각되어 활용도 창출 및 고부가가치화로 양잠산업 및 농업 발전에 기여하는 효과가 클 것으로 기대된다.

발명의 효과

[88] 본 발명의 세리신은, 천연 물질로부터 유래된 단백질이므로 안전하고 변성이 적으며 생체적합할 뿐만 아니라 골 기능 개선 효과가 탁월하다. 특히, 본 발명의 세리신을 유효 성분으로 하는 드링크제 유형의 골 기능 개선 건강 기능 식품은 종래 골기능 개선 및 골질환 손상 치료 관련 제제인 주사용 치료제나 정제 치료제보다 치료 방법의 불편함을 해소하고 이를 대체할 수 있는 훌륭한 대안이 될 수 있을 뿐만 아니라, 실크 단백질의 부산물로 폐기되고 있는 세리신을 재활용함으로써 경제적 성장 및 사회적 이익에도 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[89] 도 1은 열수 추출법에 의한 세리신 추출 공정을 보여준다.

[90] 도 2는 다양한 조건 하에서 획득한 세리신에 의한 파골세포 분화 분석 결과를 보여준다.

[91] 도 3은 다양한 조건 하에서 획득한 세리신에 의한 조골세포 증식 분석 결과를 보여준다.

[92] 도 4A는 본 발명의 세리신 농도에 의한 조골세포 증식 분석 결과를 보여준다. 도 4B는 본 발명의 세리신에 의한 조골세포 분화 유전자 마커 발현 수준 분석 결과를 보여준다.

[93] 도 5A는 골다공증 동물 모델 제작 방법을 보여준다. 도 5B는 본 발명의 세리신 경구투여에 의한 골 관련지수의 변화를 보여준다.

[94] 도 6A은 골량 감소 분석용 동물모델 동물 모델 제작 방법을 보여준다. 도 6B는 본 발명의 세리신 경구투여에 의한 골량 감소 예방효과를 보여준다.

발명의 실시를 위한 형태

[95] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[96]

[97] **실험방법**

[98] **시약**

[99] Alkaline phosphatase (ALP) staining kit, ascorbic acid, benzoyl peroxide, Dimethyl sulfoxide (DMSO), ethanol, fast red violet LB, glycerol, naptol As-Mx phosphate, N,N-dimethylformamide, nitric acid, nonylphenyl-polyethyleneglycol acetate, Paraformaldehyde (PFA)에서 구입하였다. Acetone, formaldehyde solution, sodium acetate trihydrate, sodium tartrate dihydrate은 JUNSEI (Nihonbashi-honcho, Chuo-ku, Tokyo)에서 구입하였다. α-Minimum Essential Medium (α-MEM) Hyclone, permount는 Thermo scientific (Rockford, IL, U.S.A)에서 구입하였다. Fetal bovine serum (FBS)는 GIBCO (Grand Island, NY, U.S.A), Human Macrophage-Colony Stimulation Factor (M-CSF)는 PEPROTECH, INC. (Rocky Hill, NJ, USA), N,N-DIMETHYL-p-TOLUIDINE는 MP Biomedicals (Solon-Ohio, BC, U.S.A), penicillin/streptomycin는 Lonza (Rockland, ME, USA), 적혈구 용해액은 BioLegend (San Diego, CA, U.S.A), Receptor Activator for Nuclear Factor κB Ligand (RANKL)는 R&D systems (Minneapolis, MN, U.S.A)에서 구입하였다.

[100]

[101] **세리신 수득 방법**

[102] 누에고치(Cocoon)를 가위로 잘게 분쇄한 후, 다양한 조건(30℃, 70℃ 및 100℃에서 30 분, 1 시간, 3 시간) 하에서 정련 추출하여 세리신을 수득하였다(도 1).

[103]

[104] **세포배양**

[105] MC3T3-E1 (mouse calvaria osteoblast cell line) 세포주는 α-MEM에 10% (v/v) FBS, penicillin (100 units/㎖)과 streptomycin (100 units/㎖)을 넣고, 37℃, 5% (v/v) CO_2 항온항습배양기에서 배양하였다. 조골세포 분화실험은 조골모세포가 배양 접시에 100% 채웠을 때 ascorbic acid (50 ㎍/㎖)와 β-glycerophosphate (10 mM)를 첨가하여 유도하였다. 분화기간 동안 분화배지는 3일마다 교체하였다.

[106] 골수강 단핵구 (mouse bone marrow monocyte; mBMM)는 8주령의 생쥐 대퇴골과 경골에서 분리하였다. 경추 탈골한 생쥐에서 대퇴골과 경골을 분리하여 근육을 제거하고 양 말단을 자른 후 실린지를 이용하여 α-MEM를 통과시켜 골수 세포들을 분리하였다. 분리된 골수 세포들을 원심 분리 후 적혈구 용해액을 넣어 적혈구를 용혈 시킨 다음 배지 [α-MEM, 10% (v/v) FBS, penicillin (100 units/㎖), streptomycin (100 units/㎖)]를 넣고 37℃, 5% (v/v) CO_2 항온항습배양기에서 1일 동안 배양하였다. 배양 접시에 붙지 않고 떠있는 세포들만 모아 20 ng/㎖

의 M-CSF를 처리하고 3일간 배양하여 골수유래 단핵구 대식세포 (monocyte/macrophage)를 확보하였다. 대식 세포를 파골세포로 분화시키기 위해 20 ng/㎖의 M-CSF와 30 ng/㎖의 RANKL을 첨가하여 4일 동안 배양하였다. 분화를 유도하는 동안 배지는 2일마다 교체하였다.

[107]

[108] **Alkaline phosphatase (ALP) 염색**

[109] MC3T3-E1와 골수줄기 세포를 48-well multi plate에 $5X10^4$ cells/well 씩 심고 2일 뒤에 분화유도배지로 교체해 주면서 세리신을 농도별로 처리하여 7일 동안 배양하였다. 세포를 PBS로 3회 세척하고, 고정액 [citrate 혹은 citrate acid (5 ㎖) + acetone (13 ㎖) + formaldehyde solution (1.6 ㎖)]으로 45초간 고정하였다. PBS로 2회 세척하고, alkaline-dye mixture를 넣고 상온에서 빛을 차단하고 30분간 반응시켰다. 용액을 제거한 후 PBS로 수차례 세척하고, 현미경으로 관찰하였다.

[110]

[111] **Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 염색**

[112] 생쥐의 대퇴골과 경골에서 분리한 골수강 단핵구에 20 ng/㎖의 M-CSF를 처리하여 1일간 반응시켜 배양용기에 붙은 세포들을 모아서 96-well multi plate에 $5X10^4$ cells/well 씩 심고 파골세포 분화유도배지로 교체해 주면서 세리신을 농도별로 처리하여 4일간 배양하였다. 배지를 제거하고 PBS로 세척한 다음 10% Formaldehyde solution으로 고정한 세포에 TRAP 염색 용액 [Naphtol As-Mx, Fast red violet LB, N,N-dimethylformamide를 50 mM acetate buffer (pH 5.0)에 녹인 것]을 처리하고 37℃에서 30분간 염색시켰다. 용액을 제거하고 PBS를 이용하여 2회 세척한 다음, 현미경으로 관찰하였다.

[113]

[114] **micro-CT 분석**

[115] 생쥐대퇴골을 분리하여 근육을 제거한 후 4% PFA를 통하여 하루동안 4℃에서 고정하고, 다음날 PBS용액에 3번 세척 후 PBS에 보관하였다. 보관된 대퇴골은 Skysan 1272(bruker, Massachusetts, USA)모델로 성장판아래1.6mm부터2.3mm 구간을 6μm 단위로 scan하여 분석하였다. micro-CT를 이용하여 해면골의 골량(BV/TV), 해면골의 두께(Tb.Th), 단위면적당 해면골의 수(Tb.N), 해면골 사이의 거리 (Tb.Sp)과 해면골의 골밀도(BMD)를 측정하며 피질골의 골량(BV/TV)과 골밀도(BMD)를 측정하였다.

[116]

[117] **실시예 1. 파골세포 활성 억제 분석**

[118] 파골세포의 활성 및 분화는 골흡수에 중요한 부분을 차지하고, 골다공증의 주요 발생원인으로 알려져 있으므로, 본 발명자들은, 세리신이 파골세포의 분화에 주는 영향을 규명하기 위해, 누에고치로부터 다양한 조건(30℃, 70℃ 또는 100℃

에서, 30 분, 1 시간 또는 3 시간)으로 추출한 세리신을 농도별로 파골세포 분화 과정에 각각 처리하고 TRAP 염색을 실행하고 분석하였다.

[119] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 모든 추출 조건군들에서 세리신을 10^{-2} %(0.01%) 농도로 처리했을 때 가장 파골세포의 분화를 강력하게 억제함을 확인하였다.

[120]

[121] **실시예 2. 조골세포 분화 및 증식 분석**

[122] 가장 이상적인 골기능 개선 식품은 파골세포의 분화와 활성을 억제하는 동시에 조골세포의 분화와 활성을 증가시키는 것이다. 누에고치로부터 다양한 조건으로 추출한 세리신의 조골세포의 분화와 활성에 주는 영향을 확인하기 위하여 본 발명자들은, 조골세포주인 MC3T3E1에, 누에고치로부터 다양한 조건(30℃, 70℃ 또는 100℃에서, 30 분, 1 시간 또는 3 시간)으로 추출한 세리신을 농도별로 각각 처리하고 ALP 염색을 실행하였다.

[123] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 세리신이 조골세포의 분화에 주는 영향을 관찰하기 위하여 ALP 염색을 실행했을 때, 70℃에서 1시간 동안 인큐베이션하여 수득된 세리신의 골 형성 효능이 10^{-2}% 농도에서 다른 대조군보다 현저히 우수한 것을 확인하였다.

[124] 따라서, 상기 결과들은, 70℃에서 1시간 동안 인큐베이션하여 수득된 세리신을 10^{-2}%로 처리했을 때 파골세포의 분화를 억제하고 조골세포의 분화를 촉진하여 가장 이상적인 골기능 개선 효과를 나타냄을 확인하였다.

[125]

[126] **실시예 3. 세리신(70 °c /1시간)이 조골세포 증식 및 골분화 표지유전자 발현에 미치는 영향 분석**

[127] 본 발명자들은, 상기 실시예 2에서 확인한 바와 같이, 본 발명의 최적 조건인 70℃에서 1시간 동안 인큐베이션하여 수득된 세리신이 조골세포의 증식과 골분화 표지유전자 발현에 주는 영향을 관찰하기 위하여, MTS 어세이와 qRT-PCR를 실시하였다.

[128] 그 결과, 도 4A에 나타낸 바와 같이, 70℃에서 1시간 동안 인큐베이션하여 수득된 세리신은 다양한 농도에서 조골세포의 증식에는 영향을 주지 않았다.

[129] 반면, 도 4B에 나타낸 바와 같이, 70℃에서 1시간 동안 인큐베이션하여 수득된 세리신은 다양한 농도에서 골분화 표지 유전자 중 핵심으로 알려진 Runx2, Osterix 및 Col1의 발현이 확인되었다.

[130]

[131] **실시예 4. 골다공증 동물 모델에서의 골량 개선 분석**

[132] 본 발명자들은, 본 발명의 최적 조건에 따라 추출된 세리신에 의한 실제 골 기능 개선 효과를 규명하기 위해, 골다공증 동물 모델인 난소 절제 마우스를 제작하여 이용하였다.

[133] 간략하게는, 도 5a에 나타낸 바와 같이, 12주령 암컷 마우스를 이용하여 난소절제술을 시행하여 골다공증 모델을 제작하고, 백옥잠 누에고치를 70℃에서 1시간 추출한 세리신을 0.9% NaCl에 녹여 제조한 세리신 드링크(250㎍/20g 또는 500㎍/20g)를 8주간 주당 5회 경구투여하였다. 세리신 드링크 투여 8주 후 마우스를 희생하여, 해면골의 골량 (BV/TV), 해면골의 두께(Tb.Th), 단위면적당 해면골의 수(Tb.N), 해면골 사이의 거리 (Tb.Sp)과 해면골의 골밀도(BMD)를 측정하며 피질골의 골량(BV/TV)과 골밀도(BMD)를 측정하였다.

[134] 그 결과, 도 5b에 나타낸 바와 같이, 세리신을 투여한 시험군에서는 해면골의 골량(BV/TV), 해면골의 수(Tb.N)가 골다공모델 동물보다 증가하였으며, 해면골 사이의 거리(Tb.Sp)는 감소하였다. 유의적으로 골 관련 지수가 증가하는 것으로 확인되었다. 세리신을 처리한 그룹에서 골량과 골수가 증가하는 것을 확인하였고, 이는 실크 세리신이 우수한 골기능 개선효과가 있음을 입증한다.

[135]

[136] 또한, 본 발명자들은, 본 발명의 최적 조건에 따라 추출된 세리신에 의한 실제 골 감소 예방 효과를 규명하기 위해, 골다공증 동물 모델인 난소 절제 마우스를 제작하여 이용하였다.

[137] 간략하게는, 도 6a에 나타낸 바와 같이, 6주령 암컷마우스에 4주간 세리신을 구강투여하고 10주간 째에 난소 절제를 실시하여 골다공증을 유도하였다. 골다공증 유도 6주 후 마우스를 희생하여 골 분석을 하였다.

[138] 그 결과, 도 6b에 나타낸 바와 같이, 해면골의 골량(BV/TV)과 해면골의 수(Tb.N)가 골다공증 유발 모델보다 유의적으로 증가하고, 해면골 사이의 거리(Tb.SP)도 줄어드는 것을 확인하였다. 이는 실크 세리신이 갱년기 여성의 골 감소 예방 효과도 있음을 입증한다.

[139]

[140] 상기의 실험 결과들을 종합하면, 세리신은 골대사에 영향을 미치는 세포인 조골세포에는 이의 분화 활성을 유도할 뿐만 아니라, 파골세포에는 이의 활성을 억제하는 것을 확인할 수 있었으며, 난소 절제 마우스를 대상으로 한 실험에서 골량 증진 효과 및 골 감소에 대한 예방 효과를 발휘하는 것을 확인하였다.

[141]

[142] 따라서, 세리신은 조골세포 분화 유도 및 파골세포 분화 억제를 통해 뼈 형성과 관련된 질환의 예방 및 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[143]

[144] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

[청구항 1] 세리신을 유효성분으로 포함하는 골기능 개선용 식품 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 세리신은 누에고치를 30 내지 100℃에서 30 분 내지 3 시간 동안 용매 추출하여 수득된 것을 특징으로 하는, 골기능 개선용 식품 조성물.

[청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 용매는 물, 탄소수 1 내지 4개의 알코올 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는, 골기능 개선용 식품 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 세리신은 조골세포의 분화 촉진 및 파골세포의 분화 억제 활성을 가지는 것을 특징으로 하는, 골기능 개선용 식품 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 세리신은 0.001 내지 10%(v/v)의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는, 골기능 개선용 식품 조성물.

[청구항 6] 세리신을 포함하는 골기능 개선용 건강기능식품.

[청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 건강기능식품은 드링크제, 유제품, 제과물, 조미료, 음료, 스낵, 캔디류, 아이스크림 및 냉동용 디저트, 아침 곡물류, 영양바, 스낵 바 초콜렛 제품, 가공 식품, 곡물 제품, 파스타, 스프, 소스 및 드레싱, 과자 제품, 오일 및 지방제품, 유제품 음료(dairy drink), 우유 음료, 두유, 콩 유제품(soy dairy-like product), 냉동식품, 조리 음식, 대체음식, 육류 제품, 치즈, 요구르트, 빵, 롤빵, 효모 제품, 케이크, 쿠키 및 크래커로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는, 건강기능식품.

[청구항 8] 세리신을 유효성분으로 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 골질환은 골다공증, 골관절염, 류미티스 관절염, 골연화증, 구루병, 섬유성 골염, 무형성 골질환, 대사성 골질환, 골결손질환 및 뼈의 손상으로 이루어진 그룹에서 선택되는 1 종 이상인 것을 특징으로 하는, 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 10] 제8항에 있어서,
상기 세리신은 누에고치를 30 내지 100℃에서 30 분 내지 3 시간 동안 용매 추출하여 수득된 것을 특징으로 하는, 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 11] 제10항에 있어서,

상기 용매는 물, 탄소수 1 내지 4개의 알코올 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는, 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 12] 제8항에 있어서,
상기 세리신은 조골세포의 분화 촉진 및 파골세포의 분화 억제 활성을 가지는 것을 특징으로 하는, 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 13] 제8항에 있어서,
상기 세리신은 0.01%(v/v)의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는, 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 14] 세리신을 유효성분으로 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물.

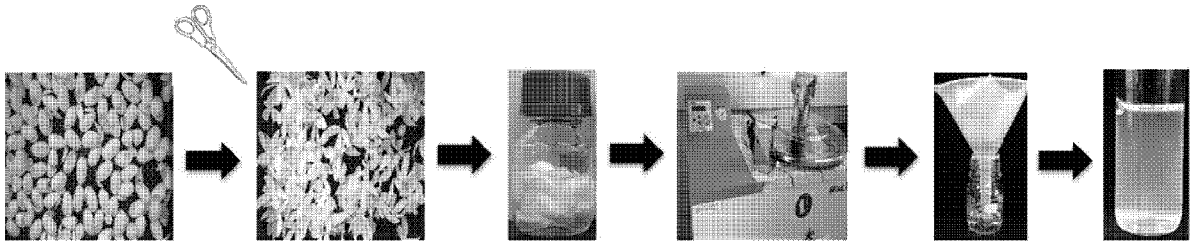
[청구항 15] 세리신을 유효성분으로 포함하는 골기능 개선용 사료 조성물.

[청구항 16] 세리신을 유효성분으로 포함하는 조골세포의 분화 촉진 및 파골세포의 분화 억제용 배지 조성물.

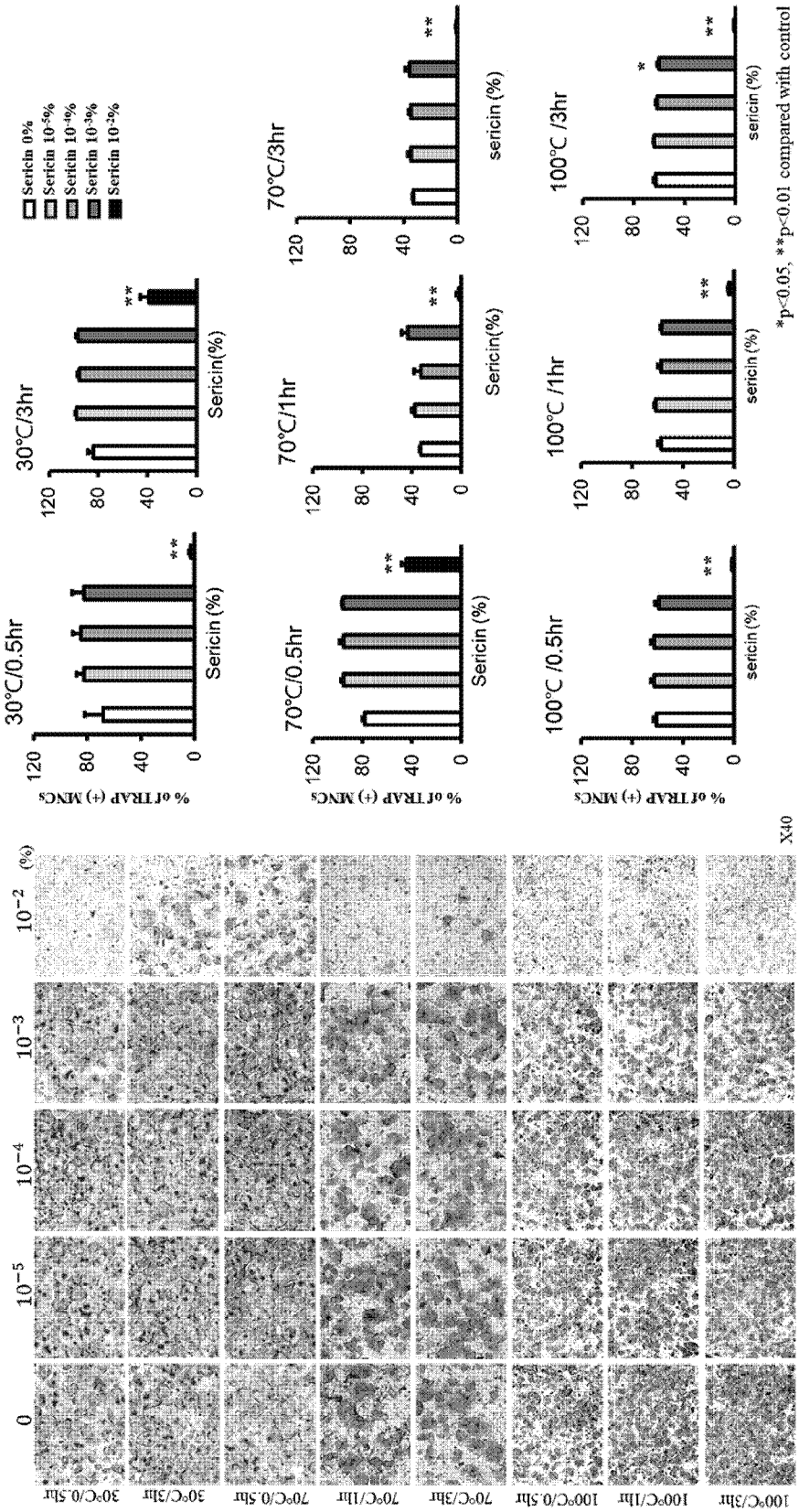
[청구항 17] 누에고치를 30 내지 100℃에서 30 분 내지 3 시간 동안 용매 추출하여 세리신을 수득하는 단계를 포함하는, 세리신을 유효성분으로 포함하는 골기능 개선용 식품 조성물의 제조 방법.

[청구항 18] 유효량의 세리신을 포함하는 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 골질환의 예방 또는 치료 방법.

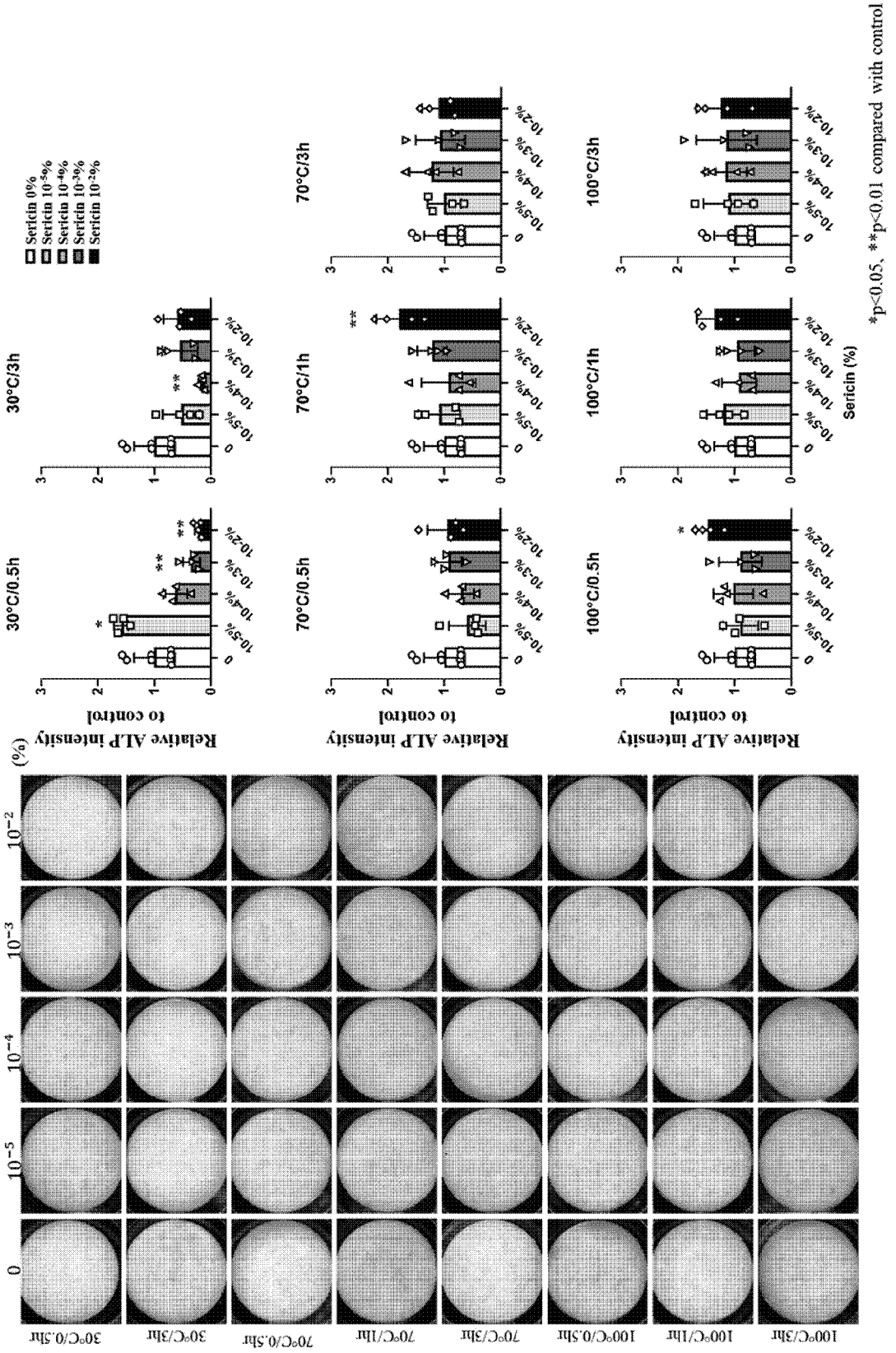
[도1]



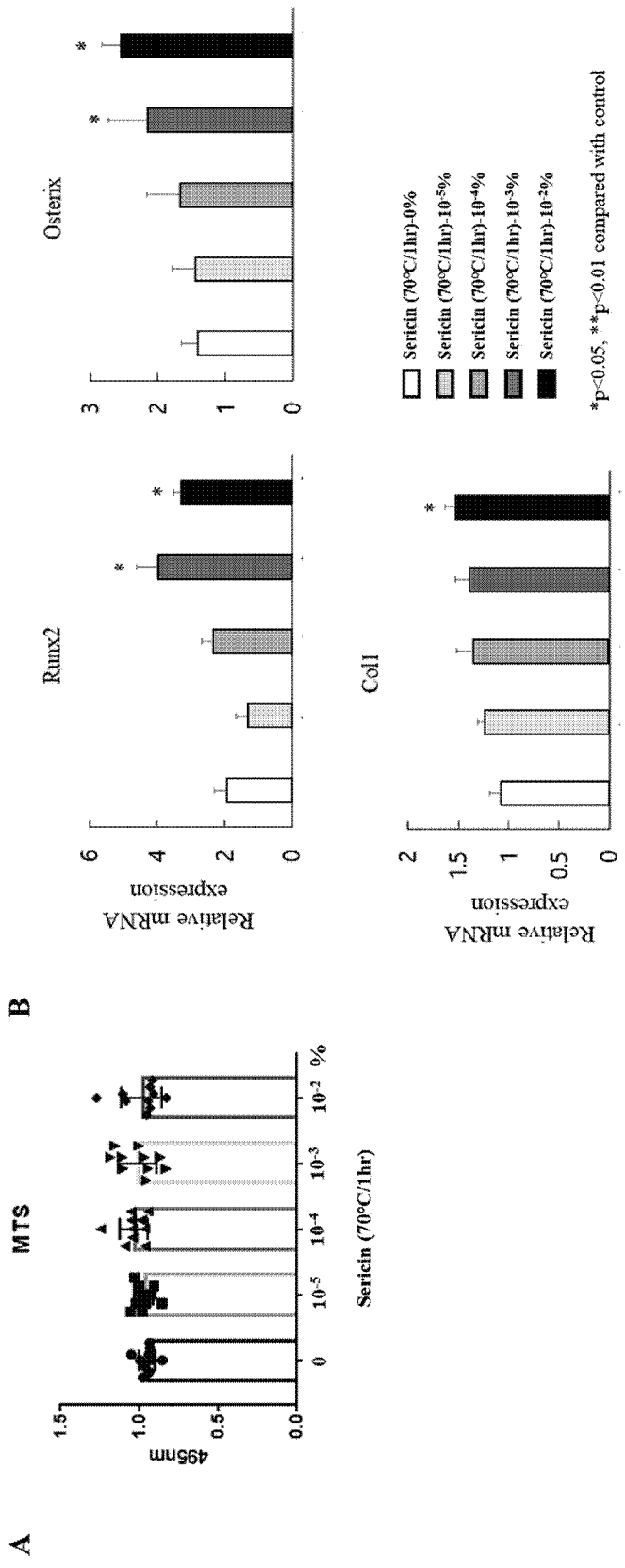
[도2]


Sericin 0%
Sericin 10-5%
Sericin 10-4%
Sericin 10-3%
Sericin 10-2%
30℃/0.5hr
30℃/3hr
70℃/0.5hr
70℃/1hr
70℃/3hr
100℃/0.5hr
100℃/1hr
100℃/3hr
% of TRAP (+) MNCs
Sericin (%)
sericin (%)
*p<0.05, **p<0.01 compared with control
0
10-5
10-4
10-3
10-2 (%)
X40

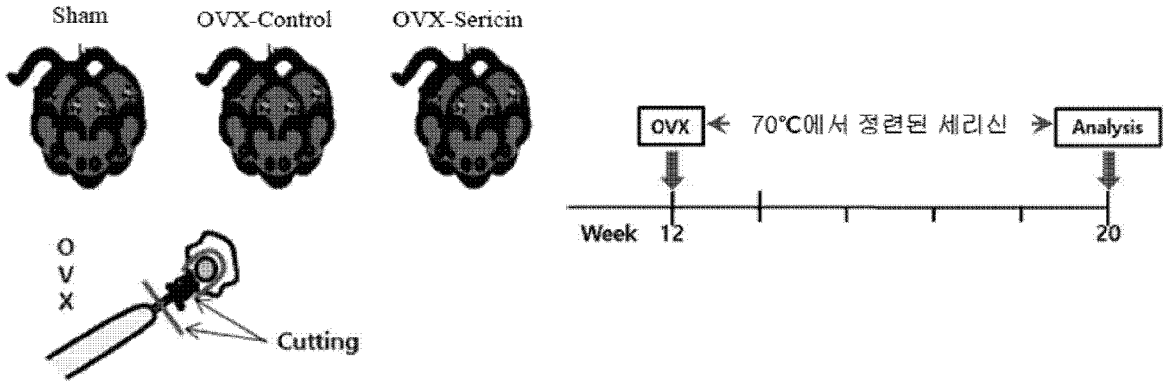
[도3]


Sericin 0%
Sericin 10-5%
Sericin 10-4%
Sericin 10-3%
Sericin 10-2%
30°C/3h
70°C/3h
100°C/3h
30°C/0.5h
70°C/1h
100°C/1h
Relative ALP intensity to control
Sericin (%)
*p<0.05, **p<0.01 compared with control
0
10-5
10-4
10-3
10-2
(%)
30°C/0.5hr
30°C/3hr
70°C/0.5hr
70°C/1hr
70°C/3hr
100°C/0.5hr
100°C/1hr
100°C/3hr

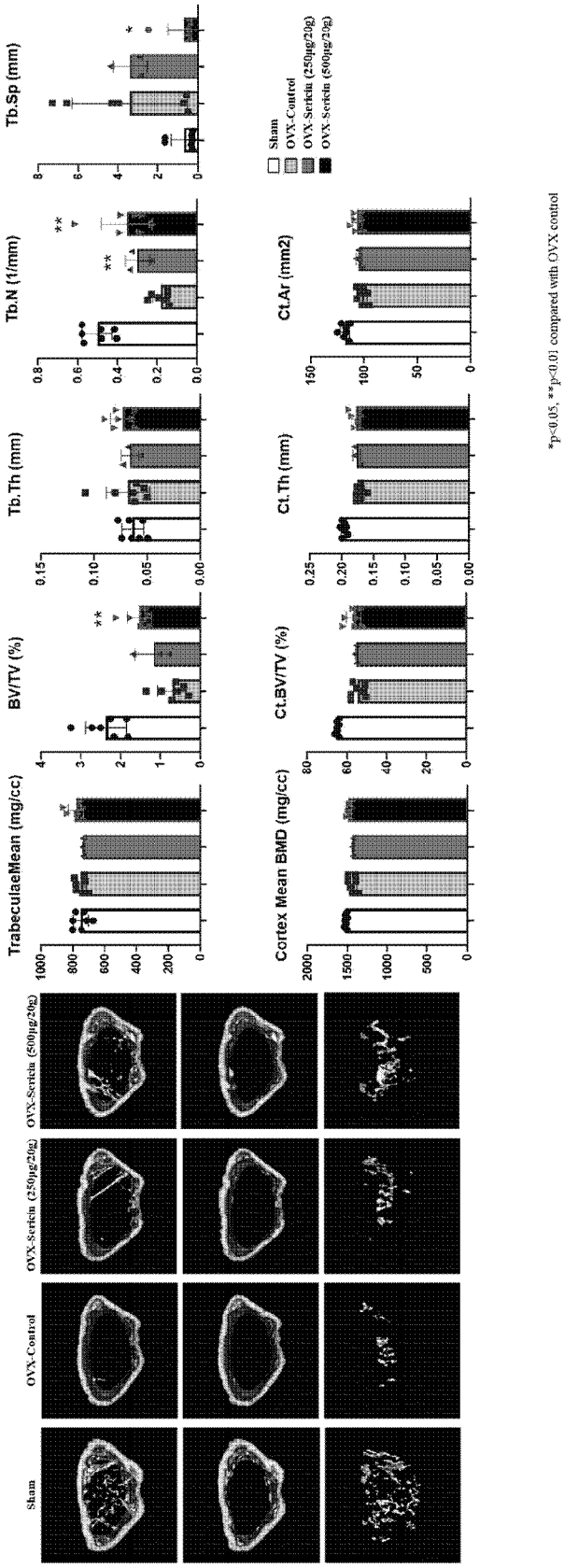
[도4]


A
MTS
495nm
Sericin (70°C/1hr)
B
Osterix
Runx2
Col1
Relative mRNA expression
Sericin (70°C/1hr)-0%
Sericin (70°C/1hr)-10⁻⁵%
Sericin (70°C/1hr)-10⁻⁴%
Sericin (70°C/1hr)-10⁻³%
Sericin (70°C/1hr)-10⁻²%
*p<0.05, **p<0.01 compared with control

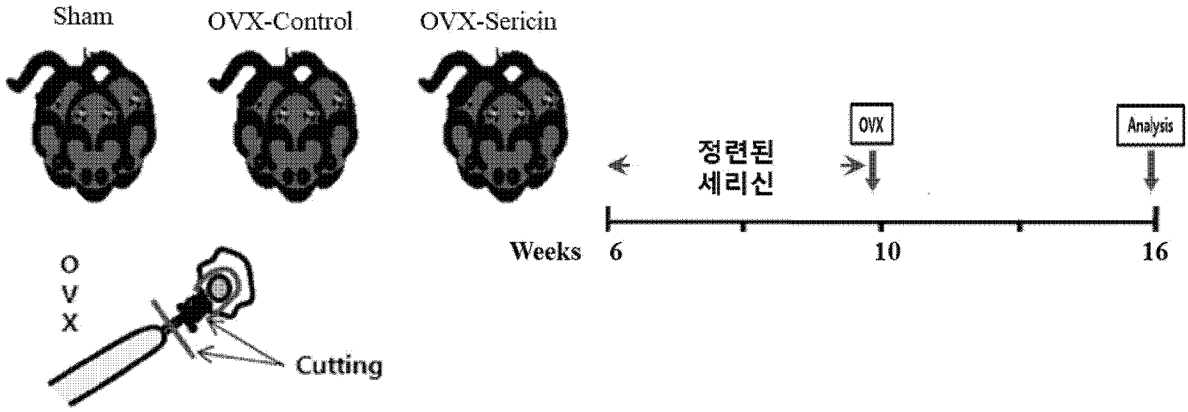
[도5a]


Sham
OVX-Control
OVX-Sericin
OVX
Cutting
OVX
70℃에서 정련된 세리신
Analysis
Week
12
20

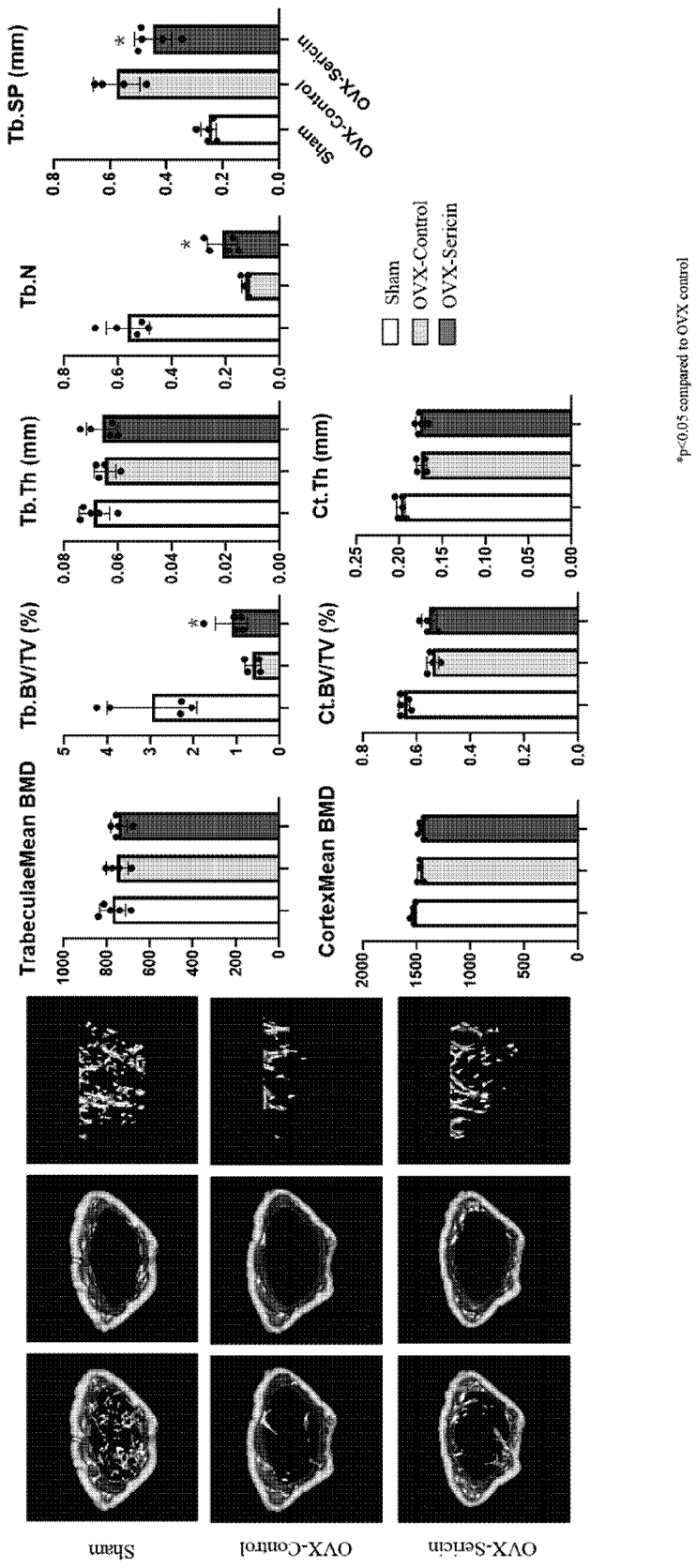
[도5b]


Sham
OVX-Control
OVX-Sericin (250μg/20g)
OVX-Sericin (500μg/20g)
TrabeculaeMean (mg/cc)
BV/TV (%)
Tb.Th (mm)
Tb.N (1/mm)
Tb.Sp (mm)
Cortex Mean BMD (mg/cc)
Ct.BV/TV (%)
Ct.Th (mm)
Ct.Ar (mm2)
*p<0.05, **p<0.01 compared with OVX control

[도6a]


Sham
OVX-Control
OVX-Sericin
정련된
세리신
OVX
Analysis
Weeks
6
10
16
O
V
X
Cutting

[도6b]


Sham
OVX-Control
OVX-Sericin
TrabeculaeMean BMD
Tb.BV/TV (%)
Tb.Th (mm)
Tb.N
Tb.SP (mm)
CortexMean BMD
Ct.BV/TV (%)
Ct.Th (mm)
Sham
OVX-Control
OVX-Sericin
*p<0.05 compared to OVX control

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/016621

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23L 33/17(2016.01)i; **A23L 2/38**(2006.01)i; **A23K 10/20**(2016.01)i; **A61K 38/10**(2006.01)i; **A61K 35/64**(2006.01)i; **A61P 19/08**(2006.01)i; **C12N 5/077**(2010.01)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)

A23L 33/17(2016.01); A23J 1/00(2006.01); A23L 2/66(2006.01); A61K 35/64(2006.01); A61P 19/10(2006.01); C07K 1/12(2006.01); C07K 1/14(2006.01); C07K 14/435(2006.01); C07K 4/12(2006.01)

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: 세리신(sericin), 누에고치(cocoon), 조골세포(osteoblast), 파골세포(osteoclast), 골기능(bone function)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2009-0036758 A (REPUBLIC OF KOREA(MANAGEMENT : RURAL DEVELOPMENT ADMINISTRATION) et al.) 15 April 2009 (2009-04-15) See claims 1-9; and paragraphs [0017]-[0026].	1,5-9,13-15
Y		2-4,10-12,16,17
Y	JO, Y.-Y. et al. Silk sericin application increases bone morphogenic protein-2/4 expression via a toll-like receptor-mediated pathway. International Journal of Biological Macromolecules. 2021, vol. 190. See pages 607-617. See abstract; page 610; and figures 1-2.	2-4,10-12,16,17
A	KR 10-2020-0132276 A (REPUBLIC OF KOREA(MANAGEMENT : RURAL DEVELOPMENT ADMINISTRATION) et al.) 25 November 2020 (2020-11-25) See entire document.	1-17
A	JP 2001-039999 A (NISSHINBO IND. INC. et al.) 13 February 2001 (2001-02-13) See entire document.	1-17

☑ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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	Date of mailing of the international search report
02 February 2024	**05 February 2024**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/016621

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2014-0063725 A (AGRICULTURAL RESEARCH DEVELOPMENT AGENCY (PUBLIC ORGANIZATION)) 27 May 2014 (2014-05-27) See entire document.	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/016621

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 18 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2023/016621

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2009-0036758 A	15 April 2009	KR 10-0955075 B1	30 April 2010
KR 10-2020-0132276 A	25 November 2020	KR 10-2223544 B1	05 March 2021
JP 2001-039999 A	13 February 2001	JP 3716293 B2	16 November 2005
KR 10-2014-0063725 A	27 May 2014	CN 103842371 A	04 June 2014
		EP 2748177 A1	02 July 2014
		HK 1199462 A1	03 July 2015
		JP 2014-525265 A	29 September 2014
		JP 5866015 B2	17 February 2016
		WO 2013-032411 A1	07 March 2013

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/016621

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A23L 33/17(2016.01)i; **A23L 2/38**(2006.01)i; **A23K 10/20**(2016.01)i; **A61K 38/10**(2006.01)i; **A61K 35/64**(2006.01)i; **A61P 19/08**(2006.01)i; **C12N 5/077**(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A23L 33/17(2016.01); A23J 1/00(2006.01); A23L 2/66(2006.01); A61K 35/64(2006.01); A61P 19/10(2006.01); C07K 1/12(2006.01); C07K 1/14(2006.01); C07K 14/435(2006.01); C07K 4/12(2006.01)

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: 세리신(sericin), 누에고치(cocoon), 조골세포(osteoblast), 파골세포(osteoclast), 골기능(bone fuction)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2009-0036758 A (대한민국(관리부서:농촌진흥청) 등) 2009.04.15 청구항 1-9; 단락 [0017]-[0026]	1,5-9,13-15
Y		2-4,10-12,16,17
Y	JO, Y.-Y. 등, `Silk sericin application increases bone morphogenic protein-2/4 expression via a toll-like receptor-mediated pathway', International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 제190권. 페이지 607-617 초록; 페이지 610; 도면 1-2	2-4,10-12,16,17
A	KR 10-2020-0132276 A (대한민국(농촌진흥청장) 등) 2020.11.25 전문	1-17
A	JP 2001-039999 A (NISSHINBO IND. INC. 등) 2001.02.13 전문	1-17

☑ 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
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2024년02월02일(02.02.2024)	**2024년02월05일(05.02.2024)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

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

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/016621

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2014-0063725 A (애그리컬춰럴 리서치 디벨롭먼트 에이전시 (퍼블릭 오거나이제이션)) 2014.05.27 전문	1-17

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/016621

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☑ 청구항: **18**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

청구항 18은 사람의 치료방법에 관한 것이므로, PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2023/016621

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2009-0036758 A	2009/04/15	KR 10-0955075 B1	2010/04/30
KR 10-2020-0132276 A	2020/11/25	KR 10-2223544 B1	2021/03/05
JP 2001-039999 A	2001/02/13	JP 3716293 B2	2005/11/16
KR 10-2014-0063725 A	2014/05/27	CN 103842371 A	2014/06/04
		EP 2748177 A1	2014/07/02
		HK 1199462 A1	2015/07/03
		JP 2014-525265 A	2014/09/29
		JP 5866015 B2	2016/02/17
		WO 2013-032411 A1	2013/03/07