(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0036237
(43) 공개일자 2009년04월14일

(51) Int. Cl.
A61K 35/56 (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0101293
(22) 출원일자 2007년10월09일
심사청구일자 2007년10월09일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내
(72) 발명자
김문무
부산 수영구 망미2동 1136번지 수영강변3차 이편한세상아파트301동 401호
이상훈
부산 해운대구 반여1동 롯데낙천대2차 207동 2401호
김세권
부산 부산진구 연지동 353-1번지 세동한신아파트105동 304호
(74) 대리인
이덕록

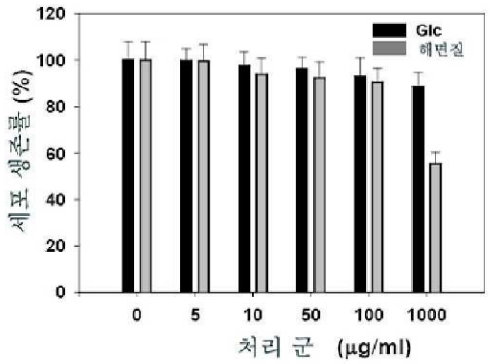
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 골 관절염 예방 및 치료용 히메니아키돈 시나피움 유래해면질 함유 조성물

(57) 요 약

본 발명은 히메니아키돈 시나피움(*Hymeniacidon sinapium*) 유래 해면질을 유효성분으로 함유하는 골관절염 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 골육종 MG-63 세포에서 ALP를 활성화시키고, 오스테오칼신의 생산능, 콜라겐 합성 및 광화작용을 증가시키며, 대식세포 RAW264.7에서 TNF-α, IL-1β 및 PEG_2와 같은 염증성 매개체의 생산을 억제함으로써 골 관절염의 예방 및 치료에 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

골육종 MG-63 세포에서 ALP를 활성화시키고, 오스테오칼신의 생산능, 콜라겐 합성 및 광화작용을 증가시키며, 대식세포 RAW 264.7에서 TNF-α, IL-1β 및 PEG_2와 같은 염증성 매개체의 생산을 억제하는 히메니아키돈 시나피움(*Hymeniacidon sinapium*) 유래 해면질.

청구항 2

상기 제1항의 히메니아키돈 시나피움 유래 해면질을 유효 성분으로 함유하는 골 관절염 예방 및 치료용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 해면질을 5 내지 150 ㎍/mL의 양으로 함유하는 것을 특징으로 하는 골 관절염 예방 및 치료용 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 해양 해면체인 히메니아키돈 시나피움(*Hymeniacidon sinapium*) 유래 해면질에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 상기 히메니아키돈 시나피움 유래 해면질을 유효성분으로 함유하는 골관절염 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 골관절염(osteoarthritis, OA)은 노년기 세대들에게 자주 발생되는 가장 유행하는 만성 염증성 질병 중 하나이다. OA에 의한 관절 연골조직의 점진적 파괴 및 손실은 결국 관절 이동(joint motion) 및 심각한 통증을 유발시킨다(Yelin et al., 2003).

<3> OA에 있어, 사이토카인과 같은 염증성 매개체가 관절 연골조직의 메트릭스 성분의 퇴화에 관여한다고 알려져 있다(Pelletier et al., 1993). 특히, 인터류킨-1β(IL-1β)가 OA의 병리생리학에 관여하는 중요한 프로염증성 사이토카인 중 하나로서 널리 받아들여지고 있다(Dinarello et al., 1988). 이는 사이클로옥시게나아제 유전자 상향-조절 및 프로스타글란딘 E2의 방출을 포함한 콘드로사이트에서의 순차적 이화작용을 유발시킨다(Stichtenoth et al., 2001).

<4> 이러한 약리학적 처리 중, 비 스테로이드성 항-염증성 약물이 심각한 부작용에도 불구하고 장기간의 사용과 관련하여 가장 널리 처방되는 OA용 약물중 하나이다(Abramson et al., 2003). 따라서, OA의 발병 및 진행을 예방하기 위한 전략을 개발하기 위하여 새로운 연구 노력이 경주되고 있다.

<5> 많은 임상적인 시도가 수행된 바 있고, 이러한 가설 및 글루코사민 보충제가 관절 병을 완화시키는데 사용되고 있다(Abramson et al., 1999). 글루코사민 화합물은 일반적으로 해양 무척추동물의 외골격에 존재하는 생중합체인 키틴으로부터 유래한다.

<6> 특히, 섬유질 골격, 슈도케라틴, 뉴로케라틴, 각질 단백질, 콜라겐-유사 단백질, 경단백질(scleroprotein) 및 해면질성 다층 골격 구조의 성분인 해면질(spongin)은 다양한 생물의학 분야에 적용가능하다고 보고된 바 있다(Swatscheck et al., 2002).

<7> 해양 연안 해면체는 북대서양 해안 주위에 분포한다고 알려진 바 있다. 오키나와 해양 해면체(Okinawan marine sponge)인 해면(*Hymeniacidon*)의 추출물이 티로신 카나아제 억제 활성을 갖는 타우린 잔사, 타우로아시딘(tauroacidin) A(1) 및 B(2)를 보유한 2 종의 신규한 브로모피롤 알칼로이드를 함유하고 있다고 알려진 바 있다(Kobayashi et al., 1997). 해면 속(屬)에 포함되는 해양 해면체는 브로모피롤 알칼로이드 I 및 시클릭 펩타이드의 풍부한 공급원으로 알려져 있다(Kobayashi et al., 1991; Pettit et al., 1990). 테트라하이드로피리미딘 알칼로이드 만자시딘 A-C I, 프롤린-풍부 시클릭 헵타펩타이드 히멘아미드 A-E(Kobayashi et al., 1993; Tsuda et al., 1993) 뿐만 아니라, 시클릭 옥타펩타이드 히멘아미드 G, H, J 및 K(Tsuda et al., 1993)도 오키

나와 해면체 해면으로부터 분리된 바 있다.

<8> 최근 들어 해양 해면체로부터 다양한 생활성 천연 생성물이 발견됨에 따라 이들로부터 약물을 개발하고자 하는 시도가 크게 증가하고 있다(Blunt et al., 2003).

<9> 해면 속(屬)에 포함되는 해양 해면체는 다양한 2차 화합물을 함유하고 있다고 알려진 바 있다. 특히, 잘 알려진 목욕용 스폰지와 같은 구조로 전체적으로 무기질 골격을 구성할 수 있는 데모스폰지-특이적 콜라겐성 단백질로 정의되는 해면질이 세포외 메트릭스의 형성에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Aouacheria et al., 2006).

<10> In vitro 연구로 강한 일광 아래서 생존하는 조간(intertidal) 해면체 히메니아키돈 헬리오필리아(*Hymeniacidon heliophilia*)가 주성분으로서 항산화제 아미노산 L-5-하이드록시트립토판(L-5-HTP)을 함유한다는 사실이 알려진 바 있다.

<11> L-5-HTP는 해면체 조직중에서 발생하는 것과 같은 동일한 농도에서 인간 단구중의 UV-유발 아폽토시스를 억제한다(Lys다 et al., 2003). 또한, 해면체 히메니아키돈 페를레베(*Hymeniacidon perleve*)로부터 분리된 박테리아에 의해 생산되는 노르하만(norharman)이 각각 HeLa 자궁경부암 세포주 및 BGC-823 위암 세포주에 대해 세포독성을 나타낸다고 보고되었다(Zheng et al., 2006). 그러나, 이들 해면체의 생물학적 활성에 대해서는 현재까지 상세하게 연구된 바는 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<12> 이러한 사실을 바탕으로, 본 발명자들은 해양 해면체로부터 OA의 발병 및 진행을 예방할 수 있는 새로운 약물을 개발하고자 노력을 경주한 결과, 다양한 2차 대사체를 함유하고 그들의 2차 대사체 및 특정 골격 구조로 인하여 새로운 골질원 및 연골조직 보충원을 충분히 제공한다고 알려져 있는(Faulkner et al., 2001) 해양 해면체인 히메니아키돈 시나피움(*Hymeniacidon sinapium*, 주황해변해면)으로부터 생활설 물질인 해면질을 스크리닝해내고, 이들 해면질이 항-염증성 효과를 통해 골 광화작용(bone mineralization)에 촉진시킬 수 있다는 사실이 최초로 밝혀냄으로써 본 발명에 이르게 되었다.

과제 해결수단

<13> 본 발명에서는 해양 해면체인 히메니아키돈 시나피움(*Hymeniacidon sinapium*)로부터 유래된, 골육종 MG-63 세포에서 ALP를 활성화시키고, 오스테오칼신의 생산능, 콜라겐 합성 및 광화작용을 증가시키며, 대식세포 RAW264.7에서 TNF-α, IL-1β 및 PEG_2와 같은 염증성 매개체의 생산을 억제하는 해면질을 제공한다.

<14> 또한 본 발명에서는 상기 히메니아키돈 시나피움 유래 해면질을 유효 성분으로 함유하는 골 관절염 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

<15> 상기 해면질의 골관절염 예방 및 치료를 위한 유효 함량은 바람직하게는 5 내지 150 ㎍/mL이다.

<16> 상기와 같은 과제를 달성하기 위하여, 본 발명에서는 조골세포에서 해면질의 보다 상세한 생물학적 활성을 조사하기 위하여 연구를 거듭하여, 몇몇 생물학적 활성중에서, 해면질이 골 광화작용에 효과적이라는 사실을 밝혀내었으며, 해면질의 유효성에 대한 메카니즘을 연구하였다.

<17> 이를 위하여, 본 발명에서는 조골세포 분화에 추가하여 해면질의 항염증성 효과에 대해 연구하였다. 우선, 조골세포-형 세포의 분화에 대한 해면질의 효과를 연구하기 위하여, 인간 골육종 MG-63 세포에서 세포 성장, ALP 활성, 콜라겐 합성 및 오스테오칼신 분비에 대해 연구하였다.

<18> 본 발명의 in vitro 데이터는 해면질이 조골세포에서 ALP 활성, 콜라겐 합성 및 오스테오칼신 분비를 증가시킬 수 있다는 사실을 밝혀냈다. 이러한 결과는 해면질이 저농도로 골육종 세포의 기능을 개선시킴으로써 OA의 진행을 방지할 수 있다는 사실을 지지한다. 종래의 연구에는 강력한 NKT 세포의 촉진제로서 α-갈락토실세라미아드, 해양 해면체-유래 글리코스핀고리피드가 류마티즘성 관절염을 포함하는 마우스 자동면역 및 염증의 실험적 모델에서 면역 반응의 조절에 대한 NKT 세포 활성화 효과를 나타낸다고 보고된 바 있다(Van et al., 2004).

<19> 본 발명에서 사용한 해면질은 100 ㎍/mL 이하에서 세포 성장에 대한 세포독성 효과를 갖지 않았으나, 1000 ㎍/mL에서는 세포독성을 나타내었다. 그러나, 해면질은 보다 낮은 농도(5 ㎍/mL)에서도 각각 비손상 골육종 세포

및 세포 용리물에 있어 ALP 활성을 분명하게 증가시켰다.

<20> 본 발명에서 비손상 세포 및 세포 용리물 사이의 ALP 활성에 있어 글루코사민과 해면질의 효과가 ALP와의 실질적인 친화력에 기인하여 그에 따라 효소를 활성화시킨다는 사실을 밝혀냈다. 따라서, OA에 있어 해면질의 유익한 효과는 부분적으로 ALP의 활성화를 기초로 할 수 있다.

<21> 이러한 본 발명의 결과는 해면질이 골육종 세포의 골육종 분화를 촉진시키는데 있어 중요한 역할을 할 수 있음을 제안한다. 오스테오칼신의 분비에 있어 글루코사민과 해면질 사이에 별다른 차이점이 없음에도 불구하고, 본 발명에서는 해면질에 의한 골육종 세포의 콜라겐 합성의 현저한 증가가 글루코사민 처리 군에서는 발견되지 않았다. 이러한 결과는 해면질이 골관절염에 유익한 효과를 갖고, 이는 해면체 섬유-골형성 세포 배양액에서 알칼리성 포스파타아제-특이적 활성 및 I 형 콜라겐 합성이 세포 배양 플라스틱상의 대조군 배양액에서 보다 현저하게 크다는 사실을 지시한다(Green et al., 2003).

<22> 따라서, 본 발명에 따르면 해면체 골격으로부터의 해면질이 골관절염에 있어 조직 재생을 촉진시킬 수 있다. 광화작용 뿐만 아니라 ALP 활성의 증가는 조골세포 분화에 있어 해면질의 양성 작용을 지시하는 특징이었다. 본 발명에서, 해면질은 MG-63 세포에서의 광화작용의 명확한 증가를 가져왔다. 이러한 결과는 해면질이 인간 골형성 세포의 부착, 성장 및 분화를 위한 생체모방 골격으로 사용될 수 있다는 사실을 확증한다.

<23> 더욱이, 본 발명자들은 해면질이 상기와 같은 효과를 발현시킬 수 있는 메카니즘을 밝혀내기 위해 연구를 거듭하였다. 최종적으로, 본 발명자들은 본 발명에서 골 광화작용에 대한 해면질의 영향이 항-염증성 효과를 통해 발휘된다는 사실을 밝혀내었다.

<24> OA에 대한 최근의 연구는 TNF-α와 같은 몇몇 골-흡수제가 조골세포로부터 PGE_2 방출을 촉진시키는 작용을 한다는 사실을 지시하였다(Mitzutani et al., 1998). 더욱이, PGE_2의 존재가 골 ALP 활성의 현저한 감소 및 상응하는 골 산 포스파타아제 활성의 증가를 일으킨다고 보고되었다. 본 발명에서는, 해면질이 마크로파지에서 리포폴리사카라이드에 의해 유도된 TNF-α 생산을 억제하였다. 이러한 결과는 해면질이 마크로파지 중에서 TNF-α 생산을 억제함으로써 류마티즘성 관절염과 같은 염증성 질환과 관련된 국부적인 골 파괴의 조절에 있어 중요한 역할을 할 수 있다는 사실을 나타낸다.

<25> TNF-α에 부가하여, IL-1β가 OA에서 관찰되는 염증성 과정 및 관련된 조직 파괴에서 중대한 역할을 한다고 보고된 바 있다(Wood et al., 1983). 본 발명의 데이터는 해면질이 마크로파지에서 리포폴리사카라이드에 의한 IL-1β 생산도 억제시킬 수 있음을 보여주었다. 이러한 결과는 염증 발생 관절중에서 IL-1β가 활액 세포, 콘드로사이트 및 마크로파지에 의해 방출되는 전염증성 사이토카인이라는 종래의 연구와 관련이 있다(Vincenti et al., 2001; Shlopov et al., 2000). 종래의 연구는 IL-1β가 프로테오글리신 합성 및 콜라겐 합성을 감소시킨다는 사실을 나타낸 바 있다(Benton et al., 1988).

<26> 그러나, 이러한 해면질의 활성 경로와 관련된 메카니즘은 여전히 밝혀지지 않고 있었다. 본 발명에서는 해면질이 인간 골형성-형 세포에서 리포폴리사카라이드에 의해 유도된 PGE_2 합성을 억제한다는 최초의 증거를 제공하였다. 이러한 결과는 골육종 세포에서 PGE_2 생산에 대한 해면질의 억제 효과가, 골 광화작용에 대한 PGE_2의 효과에 대한 종래의 연구에서 보고된 바와 같이(Kajii et al., 1999), 골 광화작용의 촉진일 일으킬 수도 있다는 사실을 지지한다.

<27> 결론적으로, 상기의 결과는 해면질이 마크로파지에 대한 항-염증성 효과를 통해 시험관내에서 조골세포-형 MG-63 세포의 골 광화작용을 촉진시킬 수 있고, OA의 예방 및 치료에 치료적 잠재력을 가질 수 있다는 사실을 제안한다.

효 과

<28> 본 발명의 히메니아키돈 시나피움 유래 해면질은 골육종 MG-63 세포에서 ALP를 활성화시키고, 오스테오칼신의 생산능, 콜라겐 합성 및 광화작용을 증가시키며, 대식세포 RAW264.7에서 TNF-α, IL-1β 및 PEG_2와 같은 염증성 매개체의 생산을 억제함으로써 골 관절염의 예방 및 치료에 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<29> 이하에서는 본 발명의 실시를 위한 바람직한 실시예에 대하여 보다 구체적으로 설명한다. 하지만 이러한 실시

예에 의하여 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

<30> **<실시예 1>**

<31> **해면질의 추출 및 분리**

<32> 갈색 해면체인 히메니아키돈 시나피움[할리콘드리아(Halichondria) 목, 할리콘드리이다에(Halichondriidae) 과]을 부산의 오륙도에서 수집하여 사용 전까지 냉동 보관하였다. 상기 해면체를 작은 조각으로 자르고, 흐르는 수돗물로 세척한 후, 톨루엔 하 pH 8 중탄산염 완충액의 0.1% 디프코 트립신중에서 37℃로 배양하였다. 유체를 여과 제거하고, 고형 물질을 그의 부피 약 3배의 물에 담가 5℃로 밤새도록 놓아두었다.

<33> 현탁된 점성 유체를 불용성 덩어리로부터 천을 통해 여과 분리하였다. 점성 추출물을 5000g에서 1 시간 동안 개별적으로 원심분리하고, 상등액을 수집하였다. 점성 추출물을 희석하고 20,000에서 2 시간 동안 원심분리로 침전시킨 후, 갈색 젤라틴 물질(해면질)을 수득하였다. 로우리 단백질 정량법에 의하여 단백질함량을 정량한 결과 수득율은 10 중량%로 나타났다.

<34> **<실시예 2>**

<35> **세포 배양**

<36> 골육종 MG-63 및 대식세포 RAW 264.7 세포주를 ATCC로부터 입수하였다. 상기 세포를 DMEM(GIBCO 제품) 중의 5% CO_2 환경에서 37℃로 배양하였다. 다르게 특정하지 않으면, 배지는 10% 열-비활성화 우태아 혈청(FBS), 100 U/mL 페니실린 및 100 mg/mL 스트렙토마이신을 함유한 것이었다.

<37> **<실시예 3>**

<38> **세포 생존력: MTT 분석**

<39> 상기 세포를 배지에 현탁시키고, 96-웰 플레이트에 10^3 세포/웰의 밀도로 도말하였다. 24 시간 후, 이를 상이한 농도의 해면질로 처리하였다. 배양한지 72 시간 후, 세포 증식도를 MTT 분석으로 측정하였다. 이 분석은 가용성 3-(4,5-디메틸-트리아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸리늄 브로마이드(MTT)를 불용성 암청색 포르마잔 반응 생성물로 전환시킬 수 있는 생존 세포의 능력을 기준으로 한 것이다.

<40> MTT 용액을 각 배양 웰 플레이트에 가하고, 플레이트를 4 시간 동안 배양하였다. DMSO를 모든 웰에 가하고, 완전하게 혼합하여 암청색 결정을 용해시켰다. 플레이트를 GENios(상표명) 마이크로플레이트 리더(Tecan Austria GmbH, Austria)를 사용하여 540 nm 파장으로 판독하였다. 세포의 생존력을 대조군과 비교한 비율로 정량화하였다(처리된 세포의 OD-블랭크 OD/대조군 OD-블랭크 OD ×100).

<41> **<실시예 4>**

<42> **알칼리성 포스파타아제 활성**

<43> 세포를 24-웰 플레이트에서 10^4 세포 밀도로 2 일 동안 배양한 후, 배지를 10% FBS를 함유한 페놀 무적색 DMEM로 대체하였다. 이어서, 세포를 FBS 없이 상이한 농도의 해면질로 배양하였다. 3 일 후, 배지를 마이크로튜브에 수집하고, 세포 단층을 PBS로 부드럽게 2회 세척하였다. 세포를 pH 10.3의 25 mM 탄산염 완충액 중에서 0.2% 트리톤 X-100로 용리시키고, 용리물을 5 분 동안 12,000×g 으로 원심분리하였다. 청정 상등액 및 수집된 배지 모두를 사용하여 ALP 활성 및 단백질 농도를 측정하였다. 이어서, 동량의 상기 용액을 1.5 mM $MgCl_2$ 및 15 mM p-니트로페닐 포스페이트를 함유한 pH 10.3의 250 mM 탄산염 완충액 200 mL에 가하였다. 색 전개를 405 nm에서의 흡수도로 정량화하였다.

<44> **<실시예 5>**

<45> **콜라겐 함량**

<46> 세포를 24-웰 플레이트로 10^4 세포 밀도로 2 일 동안 배양한 후, 배지를 10% FBS를 함유한 DMEM로 대체하였다. 이어서, 세포를 상이한 농도의 해면질의 존재하에 3 일 동안 배양하고, 세포성 콜라겐 함량을 Metra CICP EIA 키트(Qudel Inc., USA)를 이용하여 측정하였다.

<47> **<실시예 6>**

<48> **오스테오칼신(osteocalcin)의 측정**

<49> 세포를 24-웰 플레이트로 10^4 세포 밀도로 2 일 동안 배양한 후, 배지를 10% FBS를 함유한 DMEM로 대체하였다. 이어서, 세포를 상이한 농도의 해면질의 존재하에 3 일 동안 배양하고, 배양 배지 중의 오스테오칼신 함량을 오스테오칼신 면역분석 키트(Bioresource Inc. USA)를 이용하여 측정하였다.

<50> **<실시예 7>**

<51> **광화작용 검출**

<52> 세포를 24-웰 플레이트에 도말하고, 유착될 때까지 성장시켰다. 이어서, 배지를 해면질의 존재하에 광화된 배지(10 % FMS가 보충된 DME, 10 mM β-글리세로포스페이트)로 대체하고, 매 3 일 마다 교환해주었다. 7 일 째에 배양을 종료하고, 칼슘의 알리자린 레드 염색으로 광화작용을 검출하였다. 배양물을 PBS로 2회 세척하고, 70% 에틸 알콜중에서 4 ℃로 1 시간 동안 고정하였다. 칼슘 침전물을 실온에서 알리자린 레드 용액(40mM, pH 4.2)으로 10 분 동안 염색하였다.

<53> 비특이적 염색 부분은 물에서 수회 세척하여 제거하였다. 알리자린 레드 염색 부분은 10 mM 인산 나트륨(pH 7.0) 중 10% 염화 세틸피리디늄중에서 배양함으로써 15 분 동안 배양함으로써 세포 메트릭스로부터 분리시켰다. 알리자린 레트 농도를 562 nm에서의 흡수도를 측정하여 결정하였다.

<54> **<실시예 8>**

<55> **TNF-α, IL-1β 및 PGE_2 면역분석**

<56> 세포를 24-웰 플레이트로 10^4 세포 밀도로 2 일 동안 배양한 후, 배지를 10% FBS를 함유한 DMEM로 대체하였다. 이어서, 세포를 상이한 농도의 해면질로 1 시간 동안 예비처리하고 리포폴리사카라이드로 처리하였다. 24 시간 후, 배양 배지 중의 TNF-α, IL-1β 및 PGE_2 함량을 효소 면역분석 키트(Amersham Biosciences, Sweden)를 이용하여 측정하였다.

<57> **<실시예 9>**

<58> **통계적 분석**

<59> 양측검정 독립적 스튜던츠 t-테스트를 이용하여 모든 데이터를 비교하였다. 0.05 미만의 P 값이 통계적으로 현저한 것으로 여겨졌다. 데이터를 평균±SE로 나타내었다.

<60> **<실시예 10>**

<61> **골육종 MG-63 세포의 생존력에 대한 해면질의 효과**

<62> MG-63 세포를 해면질로 3일 동안 배양하고, 세포 생존력을 MTT 분석으로 측정하였다.

<63> 도 1은 FBS의 존재하에 MG-63 세포의 생존력에 대한 해면질의 효과를 나타낸 도로서, 세포를 해면질로 처리하고 72 시간 후 MTT 분석에 의해 세포 생존력을 분석한 것이다. 글루코사민(Glc)을 양성 대조군으로 사용하였다. 데이터는 블랭크의 %로서 계산된 3 회 이상의 독립적 실험의 평균±S.E.로 나타내었다.

<64> 도 1에 도시한 바와 같이, 해면질은 10㎍/mL 이하에서 MG-63 세포에 대하여 어떠한 독성 효과도 나타내지 않았다. 그러나, 글루코사민과 반대로 최고 농도(1000㎍/mL)의 해면질로 처리된 것에서는 세포 독성을 나타내었다. 따라서, 이러한 임시 생존력 데이터를 기준으로, 1 내지 100 ㎍/mL 범위의 해면질 농도를 선택하여 골육종 분화 및 감염에 대한 효과를 조사하였다.

<65> **<실시예 11>**

<66> **비손상 골육종 MG-63 세포 및 세포 용리물 중 ALP 활성에 대한 해면질의 효과**

<67> 골육종 분화에 대한 해면질의 효과를 조사하기 위하여, 골 광화작용에 있어 일종의 생물학적지표인 ALP 활성을 조골세포 MG-63에서 측정하였다.

<68> 도 2는 MG-63 세포에서 알칼리성 포스파타아제 활성에 대한 해면질의 효과를 나타낸 도로서, 세포를 FBS의 존재하에 3 일 동안 각각 5, 10, 50, 100 및 150 ㎍/mL의 해면질로 처리하였다. 알칼리성 포스파타아제 활성(Alkaline phosphatase activity, ALP)을 각각 완전한(intact) 세포 (A)와 세포 용리물 (B)에서 측정하였다.

글루코사민(Glc)을 양성 대조군으로 사용하였다. 데이터는 블랭크의 %로서 계산된3 회 이상의 독립적 실험의 평균±S.E.로 나타내었다.

<69> 도 2A에 도시한 바와 같이, 3일 동안 해면질(5-100㎍/mL)로 처리한 비손상 조골세포에서 ALP 활성이 현저히 증가하였다. 특히, 100㎍/mL의 해면질에서 블랭크 군과 비교하여 4 배의 ALP 활성 증가를 나타내었다. 또한, 글루코사민으로 처리한 세포의 용리물은 ALP 활성에 대한 독립적 효과를 나타내었고, 이를 현저하게 증가시켰다(P<0.01). 그러나, 도 2B에 도시한 바와 같이, 100㎍/mL의 글루코사민으로 처리된 세포의 용리물은 ALP 활성에 대해 효과를 나타내지 않았으나, 반면에 5 ㎍/mL 농도의 해면질로 처리된 것에서는 ALP 활성이 증가되었다. 이러한 결과는 해면질이 글루코사민과 비교하여 골 광화작용을 보다 효과적으로 촉진시킬 수 있음을 지시하였다.

<70> **<실시예 12>**

<71> **골육종 MG-63 세포에서 오스테오칼신 분비에 대한 해면질의 효과**

<72> 조골세포 분화도에 대한 최근의 표지인 오스테오칼신 생산능을 배양 4일 째 분석하였다.

<73> 도 3은 MG-63 세포의 오스테오칼신 분비에 대한 해면질의 효과를 나타낸 도로서, 세포를 FBS의 존재하에 3 일 동안 각각 5, 10, 50, 100 및 150 ㎍/mL의 해면질로 처리하였다. 글루코사민(Glc)을 양성 대조군으로 사용하였다. 데이터는 블랭크의 %로서 계산된3 회 이상의 독립적 실험의 평균±S.E.로 나타내었다.

<74> MG-63 세포를 10 내지 100 ㎍/mL 범위로 다양한 농도의 해면질로 처리한 후, 배지중의 오스테오칼신 함량을 도 3에 도시한 바와 같은 면역분석법을 이용하여 측정하였다. 글루코사민 및 해면질 각각은 MG-63 세포 중 오스테오칼신 생산능의 증가에 대해 용량-의존적 효과를 나타내었다. 그러나, 오스테오칼신 생산능에 있어 글루코사민 처리군과 해면질 처리군 사이에는 뚜렷한 차이가 없었다.

<75> **<실시예 13>**

<76> **골육종 MG-63 세포에서 콜라겐 합성에 대한 해면질의 효과**

<77> 본 발명자들은 면역분석법을 이용하여 해면질이 골육종 MG-63 세포에서 콜라겐 합성을 촉진시킬 수 있는지 여부를 조사하였다.

<78> 도 4는 MG-63 세포의 콜라겐 합성에 대한 해면질의 효과를 나타낸 도로서, 세포를 FBS의 존재하에 3 일 동안 각각 5, 10, 50, 100 및 150 ㎍/mL의 해면질로 처리하였다. 글루코사민(Glc)을 양성 대조군으로 사용하였다. 데이터는 블랭크의 %로서 계산된 3 회 이상의 독립적 실험의 평균±S.E.로 나타내었다.

<79> 골육종 MG-63 세포에서 콜라겐 합성에 대한 해면질의 영향을 도 4에 나타내었다. 글루코사민과 비교하여 해면질의 첨가로 세포의 콜라겐 합성이 현저하게 촉진되었다(P<0.01). 글루코사민은 100 ㎍/mL 이하에서 콜라겐의 합성을 현저하게 증가시키지 못했다. 그러나, 해면질로 처리함으로 인해 콜라겐의 합성은 농도 의존적 방식으로 현저하게 증가되었다(P<0.01). 10 ㎍/mL의 해면질 첨가로 글루코사민 처리군과 비교하여 콜라겐 합성이 약 4 배로 증가하였다.

<80> **<실시예 14>**

<81> **골육종 MG-63 세포에서 광화작용에 대한 해면질의 효과**

<82> 세포내 칼슘의 존재를 검출하는데 널리 사용되고 있는 알리자린 레드 염색을 수행하여 해면질 및 β-글리세로포스페이트의 존재하에 7일 동안 배양된 골육종 MG-63 세포에서 광화작용에 대한 해면질의 영향을 조사하였다.

<83> 도 5는 배양 후 7일 째 알리자린 레드 염색으로 대표적으로 염색된 세포 배양물의 사진을 나타낸 도로서, MG-63 세포를 해면질의 존재하에 7일 동안 배양하고, 고정하고, 염색하여 상기에서 기술한 바와 같은 알라자린 레드를 이용하여 광화작용을 검출하였다. 3 개의 플레이트는 각각 블랭크군, 글루코사민(Glc) 군 및 해면질 처리 군을 나타낸다. 양성 결과가 적색 영역으로서 나타났다. 동일한 실험을 3회 실시하였다.

<84> 도 5에 도시한 바와 같이, 글루코사민군과 해면질군 각각이 블랭크군 보다 명확한 적색을 나타내었음을 관찰하였고, 이는 골 광화작용이 촉진되었음을 지시한다. 해면질로 처리한 세포에서의 광화작용 수준은 글루코사민 처리군과 비교하여 현저하게 증가하였다(P<0.01). 광화작용 실험의 결과는 해면질이 골 광화작용을 유도할 수 있다는 사실을 명확하게 지시하였다.

<85> **<실시예 15>**

<86> **RAW 264.7 세포에서 염증성 매개체의 생산에 대한 해면질의 효과**

<87> 관절 연골세포의 메트릭스 성분의 퇴화에 관여한다고 알려진 전염증성 매개체의 생산이 해면질에 의해 유도될 수 있는지 여부를 측정하기 위하여, 1 ㎍/mL의 리포폴리사카라이드로 촉진시키기 전에 해면질로 처리한 RAW 264.7 세포에서 TNF-α, IL-1β 및 PEG_2의 수준을 측정하였다.

<88> 도 6은 RAW 264.7 세포에서 해면질의 항-염증성 효과를 나타낸 도로서, 세포를 각각 5, 10, 50, 100 및 150 ㎍/mL의 해면질로 예비처리하고, 리포폴리사카라이드로 촉진시켰다. 24 시간 후, 면역분석에 의해 TNF-α, IL-1β 및 PGE_2와 같은 염증 매개체를 측정하였다. 각각 사이토카인 및 PGE_2에서 덱사메타존(DEX) 1 μM 및 아스피린(ASP) 10μM을 양성 대조군으로 사용하였다. 데이터는 3 회 이상의 독립적 실험의 평균±S.E.로 나타내었다.

<89> 도 6A에 도시한 바와 같이, 10 ㎍/mL의 해면질로 전처리한 경우 리포폴리사카라이드로 촉진시킨($P<0.01$) TNF-α 생산 수준은 리포폴리사카라이드 처리군과 비교하여 현저하게 감소하였다. 그러나, 해면질 처리군과 본 발명에서 대조군으로 사용된 1 μM의 덱사메타손 처리군 사이에는 현저한 차이가 없었다. 도 6B에 도시한 바와 같이, IL-1β 합성 수준 또한 리포폴리사카라이드 처리군과 비교하여 각각 덱사메타손 1 μM 및 해면질 10 ㎍/mL의 존재하에 현저하게 감소되었다.

<90> 그러나, 해면질 처리군은, 덱사메타손 처리군과 비교하여, IL-1β로 촉진시킨 후 IL-1β 생산 수준에 있어 현저한 차이는 나타내지 않았다. PGE_2는 조골세포 기능에 있어 중요한 역할을 하는 또다른 염증성 매개체이다. 도 6C에 도시한 바와 같이, 리포폴리사카라이드로 촉진시킨($P<0.01$) RAW 264.7 세포에서 10 ㎍/mL의 해면질 또는 본 실시예에서 양성 대조군으로 사용된 10μM의 아스피린 처리는, 리포폴리사카라이드 처리군과 비교하여, RAW 264.7 세포의 PGE_2 생산 수준을 현저하게 감소시켰다. PGE_2 생산에 대한 해면질의 억제 효과가 아스피린의 억제 효과 보다 낮았으나, PGE_2 생산에 대한 해면질의 억제 효과가 리포폴리사카라이드 처리군과 비교하여 2 배로 크게 증가하였다는 사실이 명확하게 관찰되었다.

산업이용 가능성

<91> 상기한 바와 같이, 본 발명의 히메니아키돈 시나피움 유래 해면질은 골육종 MG-63 세포에서 ALP를 활성화시키고, 오스테오칼신의 생산능, 콜라겐 합성 및 광화작용을 증가시키며, 대식세포 RAW264.7에서 TNF-α, IL-1β 및 PEG_2와 같은 염증성 매개체의 생산을 억제함으로써 골 관절염 및 그와 관련된 질환의 예방 및 치료제 제조를 위한 제약산업 상 매우 유용한 발명이다.

도면의 간단한 설명

<92> 도 1은 FBS의 존재하에 MG-63 세포의 생존력에 대한 해면질의 영향을 나타낸 도이다.

<93> 도 2는 MG-63 세포에서 알칼리성 포스파타아제 활성에 대한 해면질의 효과를 나타낸 도이다.

<94> 도 3은 MG-63 세포의 오스테오칼신 분비에 대한 해면질의 효과를 나타낸 도이다.

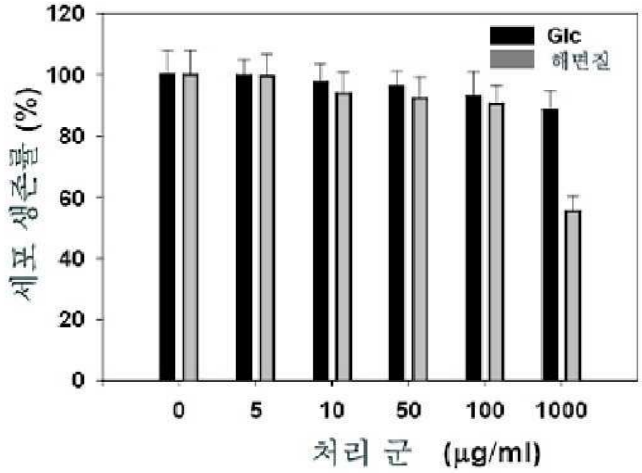
<95> 도 4는 MG-63 세포의 콜라겐 합성에 대한 해면질의 효과를 나타낸 도이다.

<96> 도 5는 배양 후 7일 째 알리자린 레드 염색으로 대표적으로 염색된 세포 배양물의 사진을 나타낸 도이다.

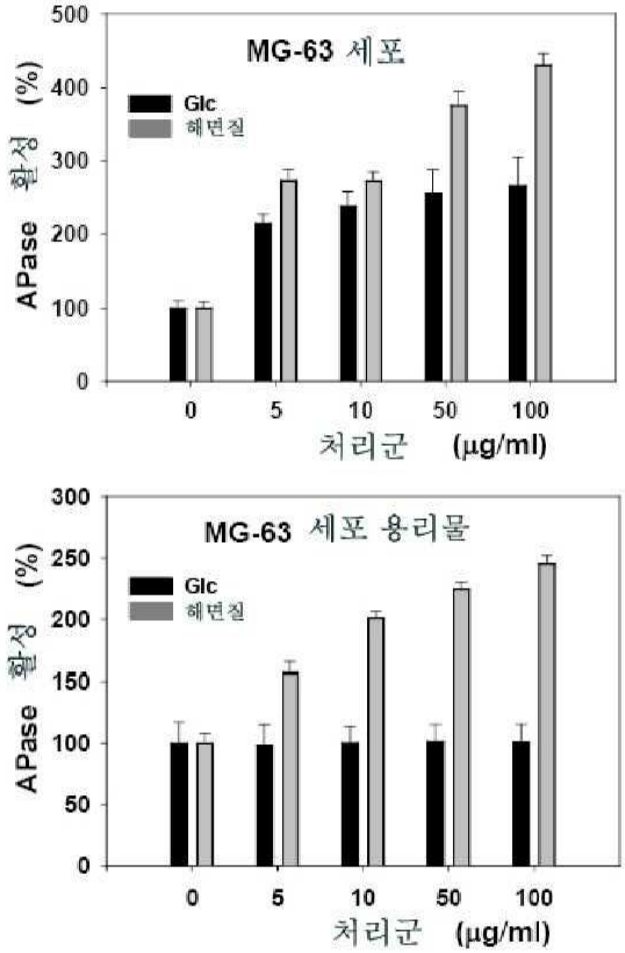
<97> 도 6은 RAW 264.7 세포에서 해면질의 항-염증성 효과를 나타낸 도이다.

도면

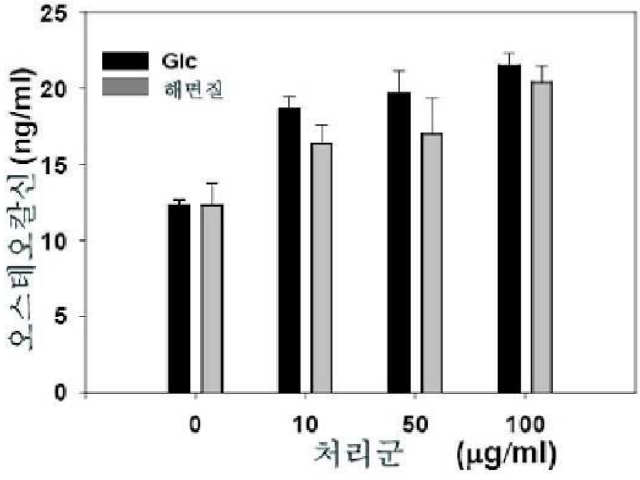
도면1



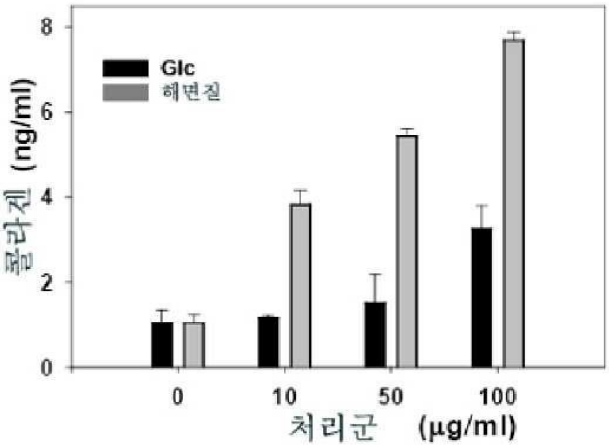
도면2


MG-63 세포
Glc
해면질
APase 활성 (%)
500
400
300
200
100
0
0
5
10
50
100
처리군 (μg/ml)
MG-63 세포 용리물
Glc
해면질
APase 활성 (%)
300
250
200
150
100
50
0
0
5
10
50
100
처리군 (μg/ml)

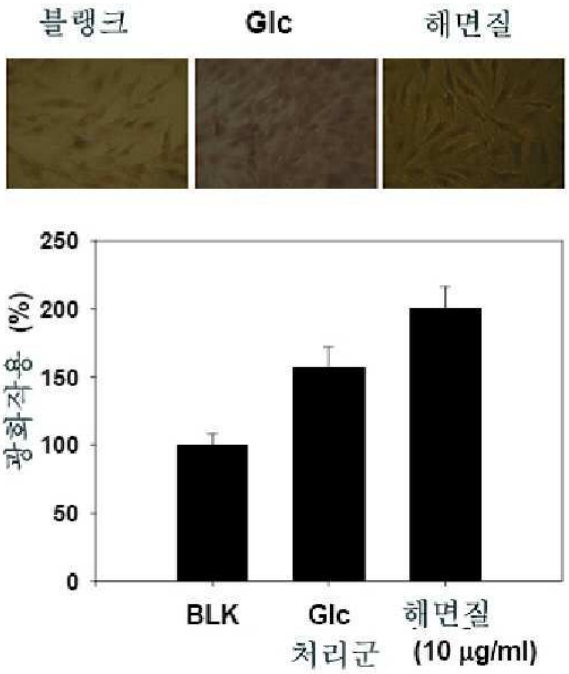
도면3


Glc
해면질
오스테오칼신 (ng/ml)
25
20
15
10
5
0
0
10
50
100
처리군 (μg/ml)

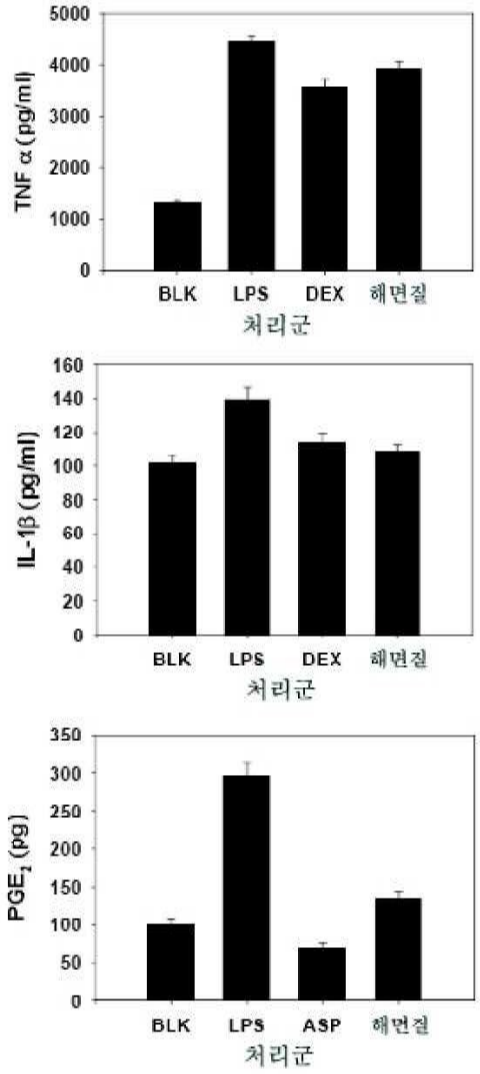
도면4


Glc
해면질
폴라젠 (ng/ml)
8
6
4
2
0
0
10
50
100
처리군
(μg/ml)

도면5


블랭크
Glc
해면질
광화작용 (%)
250
200
150
100
50
0
BLK
Glc
해면질
처리군
(10 μg/ml)

도면6


TNF α (pg/ml)
5000
4000
3000
2000
1000
0
BLK
LPS
DEX
해면질
처리군
IL-1β (pg/ml)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
BLK
LPS
DEX
해면질
처리군
PGE2 (pg)
350
300
250
200
150
100
50
0
BLK
LPS
ASP
해면질
처리군