(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0018376
(43) 공개일자 2025년02월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/38 (2006.01) *A23L 33/105* (2024.08)
A61P 21/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/38 (2013.01)
A23L 33/105 (2024.08)
(21) 출원번호 10-2024-0099699
(22) 출원일자 2024년07월26일
심사청구일자 2024년07월26일
(30) 우선권주장
1020230099141 2023년07월28일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
엠에프씨 주식회사
경기도 화성시 마도면 청원산단7길 35
(72) 발명자
김현수
서울특별시 노원구 덕릉로86길 29-25 (중계동)
김도원
서울특별시 동작구 장승배기로10가길 73, 2동 501호 (상도동, 모던힐타운3차)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 무한

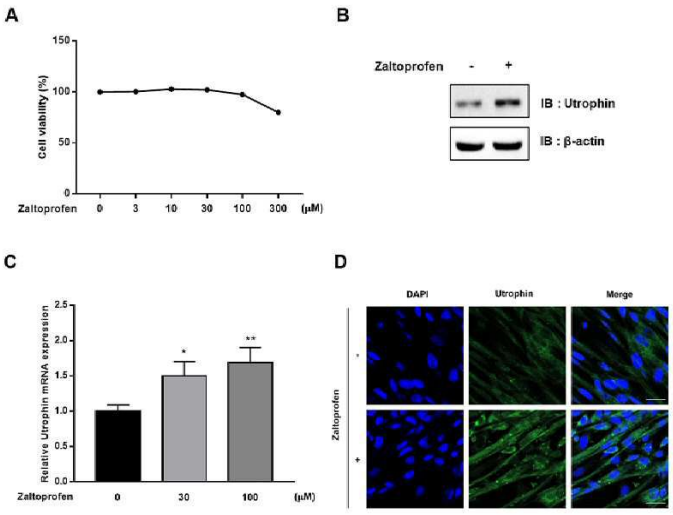
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **잘토프로펜을 유효성분으로 포함하는 근이영양증 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 잘토프로펜을 유효성분으로 포함하는 근이영양증 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 유트로핀의 발현을 증가시키고, 마이오스타틴, MAFbx, 및 MuRF1의 발현을 감소시키며, 근육 분화 유도 및 근관의 직경 증가를 통해서 근육의 소실을 억제하고 근육의 증가와 그 기능을 향상시킬 수 있는 바, 근이영양증 개선, 예방 또는 치료를 위한 의약용, 의약부외용, 향장소재용, 기능성 바이오 소재용 및 기능성 식품소재용 등 다양한 방면으로 이용될 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 21/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/316 (2013.01)
(72) 발명자
황성관
서울특별시 용산구 이촌로 310, 101동 4703호 (이촌동, 래미안 첼리투스)
박장하
경기도 안산시 상록구 해양4로 31, 109동 2901호 (사동, 그랑시티자이)

명 세 서

청구범위

청구항 1

잘토프로펜을 유효성분으로 포함하는 근이영양증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 근이영양증은 듀센형 근이영양증인 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 근육세포에서 마이오스타틴(myostatin) mRNA 또는 단백질 발현을 억제하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 우트로핀의 발현을 증가시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 MAFbx, 및 MuRF1의 발현을 억제하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 근육 분화를 촉진하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 근관의 직경을 증가시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 8

잘토프로펜을 유효성분으로 포함하는 근이영양증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 근육계 난치성 질환인 근이영양증(muscular dystrophy) 치료를 위해 NSAIDs 계열 약물 중에서 잘토프로펜(Zaltoprofen)을 제공하는 것이다.

배 경 기 술

[0003] 근이영양증(muscular dystrophy, MD)은 UN이 정한 5대 중증 진행성 희귀성 난치성 질환으로, 듀센형 근이영양증은 근이영양증의 약 50%를 차지하는 질환이다.

[0004] 듀센형 근이영양증(Duchenne muscular dystrophy, DMD)는 X 염색체의 p21에 존재하는 디스트로핀(dystrophin) 유전자에 돌연변이가 발생하여 디스트로핀 단백질 결핍으로 초래된다. 전체 환자의 65%는 디스트로핀 유전자 내의 결실 때문에 생기고, 5~10%는 유전자의 중복, 나머지는 점돌연변이나 미세결실을 원인으로 한다. 디스트로핀 단백의 결핍은 주로 골격근에 진행성의 변성을 유발하여 근육 자체가 결합 조직이나 지방으로 대치되어 근육의 가성비대 (pseudohypertrophy)가 출현하고 근력저하를 초래한다. 이에, 듀센형 근이영양증의 임상 증상으로는 근무력화, 근육 이상비대증상, 근위축, 심장근 섬유의 소실 및 가벼운 정신지체 증상 등이 나타나는 것으로 알려져 있다.

[0005] 유트로핀(utrophin) 유전자는 디스트로핀 유전자와 구조적 유사성이 크다. 이에, 디스트로핀의 기능을 대체할 유전자로 유트로핀 이용가능성이 제시되었으나, 현재까지 이에 기반한 치료제는 없는 실정이다.

[0006] 마이오스타틴(myostatin)은 TGF-β의 superfamily군에 속하는 폴리펩타이드(polypeptide) 성장인자이다. TGF-β는 다량의 이소폼(isoform)을 가지고 있으며, 이는 세포의 증식(proliferation), 세포사멸(apoptosis), 분화, 뼈의 형성 및 유지에 관여하는 것으로 알려져 있다(Massague & Chen, 2000). 마이오스타틴은 그 중 growth differentiation factor(GDF) 8번에 속하며, 조직의 성장 및 발달에 관여하고, Smad 신호 전달계를 활성화시켜 작용한다. 또한, p21 유전자에 의해 세포주기 및 전구세포의 증식을 억제하여 골 형성 및 재생에도 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다. 마이오스타틴은 주로 골격근세포에서 생성되어 자가분비 방식으로 근육 소실 및 근력 감소를 야기하며, 근 비대에 관여하는 IGF-1이나 Follistatin의 발현을 억제함으로써 근아세포(myoblast)에서의 단백질 합성 및 세포 증식을 억제한다는 것으로 알려져 있다.

[0007] 또한, 'PI3K/Akt → FOXO 활성화 및 GSK3 불활성화' 기전은 근육의 합성 저해 및 단백질 분해를 야기하여 근 위축을 유도하는데 상기 기전은 근 위축을 유도하는 유전자 atrogene(MuRF-1 등)의 발현 유도의 하위 기전을 통해 ubiquitin-proteasome system으로 대표되는 단백질 분해를 유도하게 된다.

[0008] 본 발명자들은 듀센형 근이영양증 치료제 개발을 위하여 유트로핀 전사를 표적으로 제어물질을 개발하고자 예의 연구하여 NSNIDs 화합물인 잘토프로펜이 근육위축을 효과적으로 제어할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) 박형준, "Duchenne 근디스트로피의 치료에 대한 고찰", J Korean Neurol Assoc Volume 30 No. 4, 2012

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 잘토프로펜을 근이영양증 예방 및 치료의 용도에 제공하는 것이다.

[0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 잘토프로펜을 유효성분으로 포함하는 근이영양증(muscular dystrophy) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 잘토프로펜은 근육세포에서 마이오스타틴(myostatin) mRNA 또는 단백질 발현을 억제하는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 잘토프로펜은 근육세포에서 FOXO3의 발현을 억제하는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 잘토프로펜은 근육세포에서 우트로핀의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 잘토프로펜은 근육세포에서 MAFbx, 및 MuRF1의 발현을 감소시키는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 근육세포는 디스트로핀 유전자에 변이가 있는 것일 수 있으며, 상기 변이는 야생형 디스트로핀의 기능에 변화를 주는 것이라면 무방하다.

[0020] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 잘토프로펜은 근육 분화를 유도 또는 촉진하는 것일 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 잘토프로펜은 근관의 직경을 증가시키는 것일 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 개체에 잘토프로펜을 약학적으로 유효한 양을 처리하는 단계를 포함하는 근이영양증 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0023] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 개체는 근 기능 저하, 근육 감소, 근육 위축, 근육 소모, 및/또는 근육 퇴화 증상을 나타내는 환자일 수 있으며, 바람직하게는 근이영양증 환자일 수 있고, 더욱 바람직하게는 듀센형 근이영양증 환자일 수 있다.

[0024] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 방법은 투여 전 및 투여 후에 개체의 근력을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 근력의 측정은 악력 측정을 통해 수행되는 것일 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명은 근이영양증 예방 또는 치료용 약제 제조를 위한 잘토프로펜의 용도를 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 잘토프로펜을 유효성분으로 포함하는 근이영양증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0028] 본 발명은 잘토프로펜을 유효성분으로 포함하는 근이영양증 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 유트로핀의 발현을 증가시키고, 마이오스타틴, MAFbx, 및 MuRF1의 발현을 감소시키며, 근육 분화 유도 및 근관의 직경 증가를 통해서 근육의 소실을 억제하고 근육의 증가와 그 기능을 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1에 A는 잘토프로펜의 세포 독성을 측정한 결과이고,

도 1에 B는 잘토프로펜을 처리한 근관에서 우트로핀의 mRNA 발현 수준을 확인한 것이고,

도 1에 C는 잘토프로펜 처리에 따른 우트로핀 발현 증가를 단백질 수준에서 확인한 것이며,

도 1에 D는 잘토프로펜 처리에 따른 우트로핀 발현 증가를 면역형광염색을 통해 확인한 것이다.

도 2에 A는 야생형 마우스와 mdx 마우스에서 신트로핀과 디스트로브레빈의 발현 수준을 확인한 것이고,

도 2에 B는 잘토프로펜 처리에 따라 신트로핀과 디스트로브레빈의 발현 수준 증가를 확인한 것이며,

도 2에 C 내지 E는 잘토프로펜이 시간 의존적 방식으로 α-신트로핀, α-디스트로브레빈, 및 디스트로글리칸의 발현을 증가시킴을 확인한 것이다.

도 3에 A는 근아세포에서 잘토프로펜 처리 농도에 따른 CaMKII 인산화를 확인한 것이고,

도 3에 B는 디스트로핀 녹아웃 근아세포에 잘토프로펜을 처리하고 세포 내 Ca2+을 확인한 이미지이고,

도 3에 C는 디스트로핀 녹아웃 근아세포에 잘토프로펜을 처리하고 유트로핀의 발현 증가를 확인하고 잘토프로펜의 이러한 효과가 STO609 처리에 따라 감소함을 확인한 결과이며,

도 3에 D는 잘토프로펜 처리 후 우트로핀과 α-신트로핀의 직접 결합과 상기 결합이 STO609에 의해 저해됨을 확인한 공동 면역침전 결과이고

도 3에 E 및 F는 잘토프로펜 처리 농도에 따른 MEF2A 및 PGC1α의 발현 증가를 확인한 결과이다.

도 4에 A는 잘토프로펜 처리에 따른 마이오스타틴, MAFbx, 및 MuRF1 발현 감소를 유전자수준에서 확인한

것이고,

도 4에 B는 상기 도 4에 A의 결과를 단백질 수준에서 확인한 것이며,

도 4에 C는 잘토프로펜 처리 및 처리 농도에 따른 Foxo3a의 인산화 수준을 확인한 것이고,

도 4에 D는 잘토프로펜 처리 및 처리 농도에 따른 p70S6K의 인산화 수준을 확인한 것이며,

도 4에 E는 잘토프로펜 처리에 따라 ADP 및 ATP 수준 변화를 확인한 것이다.

도 5에 A는 잘토프로펜 처리에 따른 MHC 수준 변화를 확인한 것이고,

도 5에 B는 잘토프로펜 처리에 따른 근육 분화와 관련된 차등발현 유전자를 확인한 것이며,

도 5에 C는 잘토프로펜 처리에 따라 근관의 직경 증가를 확인한 이미지이고,

도 5에 D는 도 5에 C의 결과를 정량화한 그래프이다.

도 6에 A는 잘토프로펜을 처리한 mdx 마우스의 앞다리 악력 변화를 확인한 그래프이고,

도 6에 B는 잘토프로펜을 처리한 mdx 마우스의 TA 근육에서 유트로핀 발현 수준을 유전자 수준에서 확인한 그래프이고,

도 6에 C는 잘토프로펜을 처리한 mdx 마우스의 TA 근육에서 MuRF1 및 MAFbx의 발현 감소를 유전자 수준에서 확인한 것이며,

도 6에 D는 실험동물의 혈청 내 크레아틴 키나아제의 수준을 확인한 것이다.

도 7은 잘토프로펜이 속하는 NSAID(nonsteroidal anti-inflammatory drug)이 잘토프로펜과 동일한 활성을 나타내는지 확인하기 위하여 loxoprofen, pelubiprofen, 및 celecoxib과 잘토프로펜의 마이오스타틴 발현 억제 및 유트로핀 발현 증가 활성을 비교확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 근이영양증(Muscular dystrophy)는 유전자 돌연변이에 의해 횡문근 형질막 구성성분인 디스트로핀-당단백질 복합체 형성부재로 발생하는 근육 위축과 근력 약화를 주 증상으로 한다. 유트로핀(utrophin) 유전자는 디스트로핀 유전자와 구조적 유사성이 커서 디스트로핀의 결손에 따른 디스트로핀 대체 가능성이 제시되고 있다. 본 발명자들은 근이영양증 치료를 위한 약물 개발을 위하여 예의 연구한 결과, NSAIDs 계열 약물 중에서 잘토프로펜(Zaltoprofen)이 유트로핀의 발현을 증가시키고 근육의 감소를 예방하며 근이영양증의 증상을 개선할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0032] 이에, 본 발명자는 잘토프로펜을 유효성분으로 포함하는 근이영양증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0033] 본 명세서에서 사용된 용어, "예방"이란 조성물의 투여로 근이영양증의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에서 용어, "치료"란 조성물의 투여로 근이영양증의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0034] 상기 약학적 조성물은 마이오스타틴(myostatin) 프로모터 활성을 감소시킬 수 있으므로, 근육 소실 및 근력 감소를 보다 근본적으로 예방 및 치료할 수 있다.

[0035] 상기 약학적 조성물은 유트로핀의 발현을 증가시키고 동시에 근이영양증의 증세를 호전시키는 바 본 발명의 치료대상 질병은 근이영양증 중에서도 듀센형 근이영양증일 수 있다.

[0036] 한편, 잘토프로펜은 NSAID(nonsteroidal anti-inflammatory drug)에 속하는 약물로 COX-2 inhibitor로 알려져 있다. 본 발명자들은 근육세포에서 확인된 잘토프로펜의 활성을 NSAID 계약 약물에서도 동일하게 얻을 수 있는지 확인하고자 록소프로펜(loxoprofen), 페루비프로펜(pelubiprofen), 및 세레콕시브(celecoxib)의 마이오스타틴 발현 억제 활성과 유트로핀 발현 촉진 효과를 잘토프로펜과 비교확인하였다. 그 결과, 록소프로펜 및 세레콕시브에서도 유트로핀 발현 증가 효과가 확인되었지만 이는 잘토프로펜의 효과에 미치지 못하였으며, 모든 NSAID 약물이 마이오스타틴 발현을 억제하는 것은 아니고, 오히려 이를 증가시키는 약물도 있음을 확인하였다. 즉, 모든 NSAID가 근이영양증 치료에 이용될 수 있는 것은 아니고, NSAID 중에서도 특히 잘토프로펜이 효과적으로 근이영양증을 치료하는 약물이 될 수 있음을 알 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에 따른 근 위축의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은, 상기 잘토프로펜를 0.001 mM 이상의 농도로 함유할 수 있으며, 구체적으로는 0.001 mM 내지 1000 mM 의 농도로 함유할 수 있다.

[0038] 본 발명의 약학적 조성물은 약제로 이용되기 위해서 약제학적 분야에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제, 안정화제, 방부제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성성분 외에 서방성 목적으로 사용되는 기제를 포함하여 활성성분의 방출이 천천히 일어나도록 서방형 제제로 제조될 수 있다.

[0039] 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 아울러, 펩티드 제제에 대한 경구투여용으로 사용되는 다양한 약물전달물질을 포함할 수 있다. 또한, 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코오스 및 글리콜 등을 포함할 수 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르 브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현택제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0040] 상기 희석제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유, 땅콩유와 같은 식물성유 등의 비수성 용매나 염수(바람직하게는 0.8%의 염수), 완충 매질을 포함한 물(바람직하게는 0.05M의 인산염 완충액) 등의 수성 용매 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 상기 부형제로는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 나트륨 클로라이드, 무수 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 상기 안정화제로는 소르비톨, 만니톨, 전분, 수크로스, 덱스트란, 글루타메이트, 글루코스 등의 탄수화물이나 분유, 혈청 알부민, 카제인 등의 동물성, 식물성 또는 미생물성 단백질 등의 단백질을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 상기 방부제로는 티메로살, 메르티올레이트, 젠타마이신, 네오마이신, 니스타틴, 암포테리신 B, 테트라사이클린, 페니실린, 스트렙토마이신, 폴리믹신 B 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 본 발명의 약학적 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있으며, 예를 들어 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다. 비경구적인 투여 방법으로는 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 본 발명의 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화될 수 있다.

[0046] 본 발명의 약학적 조성물의 총 유효량은 단일 투여량 (single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량 (multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 요법에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 이는 제제화 방법, 투여경로 치료횟수 뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 질병의 증상, 투여시간 및 방법 등 다양한 요인들을 고려하여 결정될 수 있다. 이러한 점을 고려할 때, 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 조성물의 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 있어 특별히 제한되지 아니한다.

[0047] 본 발명의 조성물은 근 위축의 예방 또는 개선을 목적으로 하는 식품에 첨가될 수 있는데, 상기 식품은 건강기능식품일 수 있으며, 본 발명에서 건강기능식품이란 질병의 예방 또는 개선, 생체방어, 면역, 병후의 회복 등 생체조절기능을 가지는 식품을 말하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해하여야 한다.

[0048] 본 발명의 조성물을 식품 첨가물로 사용하는 경우, 상기 잘토프로펜을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15 중량 % 이하, 바람직하게는 10 중량 % 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수

있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0049] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강 식품을 모두 포함한다.

[0050] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ㎖ 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1g 이다.

[0051] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0053] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0054] **[실험방법]**

[0055] **1. 일차 근아세포 배양**

[0056] 야생형 대조군 생쥐(C57BL/6)와 C57BL/6 기반 DMD 녹아웃 생쥐를 사용했다. 시토신 기반 편집기 방법을 사용하여 디스트로핀 유전자 엑손 20의 글루타민 코돈 대신 종결 코돈을 발현시켰다. 일차 근아세포는 생후 1주된 야생형 생쥐와 DMD 녹아웃 생쥐의 뒷다리 골격근에서 분리되었다. 야생형 및 DMD 녹아웃 생쥐 일차 근아세포는 10% cosmic calf serum (Hyclone, SH30087.03), 10ng/ml Human basic fibroblast growth factor (Human bFGF; Peprotech, 100-18B), 1% 항생제를 포함한 Ham's F-10 배지(WELGENE, LM009-02)에서 37℃, 습윤된 5% CO2와 95% 공기 분위기에서 배양되었다. 야생형 및 DMD 녹아웃 생쥐 일차 근아세포는 5% horse serum 및 1% 항생제가 보충된 high-glucose DMEM에서 분화되었다. 배양 플레이트는 사용 전에 콜라겐으로 코팅되었다(Sigma, C8919).

[0058] **2. 세포 생존력 실험(Cell viability test)**

[0059] 96웰 플레이트에 일차 근아세포를 준비했다. 세포는 24시간 동안 다양한 농도의 잘토프로펜으로 처리되었다. 각 웰에 MTT((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 시약을 추가했다. CO2 배양기에서 37℃로 4시간 동안 배양 후, 매체를 제거하고 각 웰에 DMSO를 추가했다. 흡광도는 Synergy H1 다중 모드 마이크로플레이트 리더(BioTek)를 사용하여 540nm에서 측정했다.

[0061] **3. 웨스턴 블롯팅(Western Blotting)**

[0062] 전체 단백질 추출물은 세포를 용해 버퍼(1M Tris-HCl(pH7.4), 5M NaCl, 0.5M EDTA, 10% 글리세롤, 1% TritonX100, 1 mM PMSF, 1 mM Na3Vo4, 50 mM NaF를 보충한 용해 버퍼)로 용해시켜 준비했다. 단백질 추출물은 5X 샘플 버퍼로 희석하고 95℃에서 5분간 변성시켰다. 용해물은 8-10% SDS-PAGE 젤 또는 4-15% 기울기 젤(BMS, #4561084)에 적재되고 0.45㎛ 니트로셀룰로오스 멤브레인(GE healthcare)으로 전이되었다. 전이 후, 멤브레인은 Ponceau S로 염색하고 연구한 각 단백질의 분자량에 따라 스트립으로 절단되었다. 멤브레인은 실온에서 1시간 동안 5% 탈지유로 차단된 후 TBS-T로 세척되었다. 멤브레인은 1차 항체와 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션되었

다. 그 후, 멤브레인은 적절한 HRP-결합 2차 항체와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션된 후 TBST로 세 번 세척되었다. 멤브레인은 화학 발광 기반 검출에 사용되었다. 밴드 강도는 ChemiDoc 시스템과 iBright Analysis 소프트웨어(Invitrogen, CL1000)를 사용하여 분석되었다.

[0064] **4. RNA 추출 및 Real-time PCR**

[0065] 전체 RNA는 Qiazol(Qiagen)을 사용하여 야생형 및 DMD 녹아웃 생쥐 일차 근아세포에서 추출되었다. RNA 농도는 Nanodrop 분광광도계를 사용하여 측정했다. mRNA 발현은 SYBR Green 시스템(TOPreal™ qPCR 2X Pre-MIX, Enzynomics)을 사용한 실시간 PCR(qRT-PCR)(QuantStudio 3 Real-Time PCR, Thermo Fisher Scientific)로 평가되었다. 사용된 프라이머는 하기 표 1과 같다:

표 1

[0066]

유전자	프라이머	프라이머 서열	서열번호
GAPDH	forward	GTG TTC CTA CCC CCA ATG TG	1
	reverse	CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG	2
Utrophin	forward	CGT GAT TGG TGA CCT GGA CA	3
	reverse	TGA GCG ACG TGT CCA TCA AA	4
α-Syntrophin	forward	ATC TTC AAG GGA CTG GCA GC	5
	reverse	CCT GTC TTC TTG AGG GCC TG	6
β-Dystrobrevin	forward	CAC AAC TAC CAG CTC TGC CA	7
	reverse	TAT TGG TCA GAG GGC GAG GA	8
Dystroglycan	forward	GTG CCT ACG CCT ACA TCT CC	9
	reverse	CGG CTG TGG GCT CTA CAT AG	10
Myostatin	forward	GCG ATG AGC ACT CCA CGG AA	11
	reverse	GCC TCT GGG GTT TGC TTG GT	12
MAFbx	forward	ATG CAC ACT GGT GCA GAG AG	13
	reverse	TGT AAG CAC ACA GGC AGG TC	14
MuRF1	forward	GTC CAT GTC TGG AGG TCG TT	15
	reverse	AGG AGC AAG TAG GCA CCT CA	16
MEF2A	forward	GAG CCT CAT GAA AGC AGG AC	17
	reverse	CAA GTT CTG AGG TGG CAA GC	18
PGC1α	forward	GCG GTA TTC ATC CCT CTT GA	19
	reverse	ATG TGT CGC CTT CTT GCT CT	20

[0067] **5. 면역염색(Immunostaining)**

[0068] 세포는 젤라틴 코팅된 18mm 유리에서 배양되어 신선하게 준비된 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde, PFA)로 15분간 고정되고, 0.1% Triton X-100으로 5분간 투과시키고, 4% BSA로 30분간 차단한 후, 1차 항체와 함께 4℃에서 밤새 염색되었다. 다음의 1차 항체 희석액을 사용했다: mouse anti-utrophin (1:200, Santa). 세척 후, 세포는 1시간 동안 2차 형광 항체(Alexa488 mouse)로 염색되었다. 마지막으로, 세포는 DAPI가 포함된 장착 용액(Invitrogen)으로 장착되었다. 이미지는 CLSM(Carl Zeiss, LSM800 with Airyscan)으로 획득되었다.

[0070] **6. 공초점 레이저 주사 현미경(Confocal Laser Scanning Microscopy, CLMS)**

[0071] 총 7 x 10^4 개의 세포가 콜라겐 코팅된 공초점 접시(SPL, 101350)에 접종되고 37℃에서 24시간 동안 배양되었다. 야생형 및 DMD 녹아웃 생쥐 일차 근아세포는 Fluo-3/AM(Invitrogen, F1241)으로 라벨링되어 [Ca2+]i를 모니터링했다. 살아있는 세포의 형광 강도는 CLSM(Carl Zeiss, LSM800 with Airyscan)에서 관찰되었다.

[0073] **7. 공동 면역 침강(Co-Immunoprecipitation)**

[0074] 세포 단백질(1 mg)은 anti-syntrophin a1(mouse monoclonal antibody) 또는 anti-IgG(normal mouse antibod

y)와 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션되었다. 면역 복합체는 3시간 인큐베이션 후 protein A-Sepharose(Amersham, Uppsala, Sweden)로 캡처되었다. 침전된 면역 복합체는 세척 버퍼(25 mM HEPES, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 50 mM NaF, 150 mM NaCl, 10 mM PMSF)로 세 번 세척되었다. 세척된 샘플은 SDS 샘플 버퍼(125 mM Tris-HCl(pH 6.8), 20% (v/v) glycerol, 4% (w/v) SDS, 100 mM DTT, 0.1% (w/v) bromophenol blue)로 변성시키고 100° C에서 5분 동안 가열하였다.

[0076] **8. ATP/ADP/AMP 분석**

[0077] ATP, ADP의 양 측정은 Biomedical Research Service Center의 ATP/ADP/AMP assay kit(#A-125)를 사용하여 수행되었다. 세포는 끓는 물 방법을 통해 탈단백화되었다. 세포 용해물 내 ATP 및 ADP의 양은 상대 광도 단위(RLU)로 측정되었다. 발광은 Synergy H1 다중 모드 마이크로플레이트 리더(BioTek)를 사용하여 측정되었다. 계산은 제조업체의 지침에 따라 수행되었다.

[0079] **9. 근육 분화(Myogenic differentiation) 및 근관 세포 형태 결정**

[0080] DMD 녹아웃 생쥐 일차 근아세포(primary myoblast)는 5% horse serum 및 1% 항생제가 보충된 high-glucose DMEM에서 분화되었다. 배양 플레이트는 사용 전에 콜라겐으로 코팅되었다(Sigma, C8919). 잘토프로펜은 분화 매체에서 72시간 동안 처리되었다. 근아세포 분화는 헤마톡실린 및 에오신(hematoxylin and eosin, H&E) 염색으로 근관 세포 직경을 분석하여 결정되었다. 이미지는 CKX53 현미경(Olympus)을 사용하여 캡처 및 처리되었다. 모든 직경은 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 각 이미지의 10개 무작위 필드에서 계산되었다.

[0082] **10. 마이크로어레이 분석**

[0083] 데이터는 Affymetrix® Power Tools(APT)에 구현된 강력한 다중 평균(RMA) 방법으로 요약되고 정규화되었다. 결과는 유전자 수준 RMA 분석으로 내보내졌으며, 차등 발현 유전자(differentially expressed gene, DEG) 분석이 수행되었다. 발현 데이터의 통계적 유의성은 LPE 테스트와 폴드 변화를 사용하여 결정되었으며, 여기서 귀무 가설(null hypothesis)은 그룹 간에 차이가 없다는 것이다. 거짓 발견율(False discovery rate, FDR)은 Benjamini-Hochberg 알고리즘을 사용하여 p 값을 조정하여 제어하였다. 차등 발현 유전자 세트를 위해, 계층적 클러스터 분석은 유사성의 측정으로 완전 연결 및 유클리드 거리를 사용하여 수행되었다. 차등 발현 유전자의 모든 데이터 분석은 R 3.3.2를 사용하여 수행되었다. KEGG 경로는 Morepheus 소프트웨어에서 다운로드 및 처리되었다.

[0085] **11. 동물 실험**

[0086] 생체 내 실험은 Jackson Laboratory의 C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J (mdx) 생쥐를 사용하여 수행되었다. 7주 된 수컷 mdx 생쥐는 잘토프로펜(0.1mg/kg) 또는 대조군(PBS)을 4주 동안 격일로 복강 주사하여 처리했다(각 그룹 n=6). 동물 실험은 Korea University Institutional Animal Care and Use Committee의 승인을 받았으며 관련 지침 및 규정을 준수하여 수행되었다.

[0088] **12. in vivo 앞다리 악력 테스트**

[0089] 전완 악력 테스트는 전완의 악력을 평가하기 위해 보정된 악력 테스트 기기(Jeung Do Bio, JD-A-22)로 주 2회 수행되었다. 결과는 세 번 반복한 평균값으로 표시된다.

[0091] **13. 효소 면역 분석(Enzyme-linked immunosorbent assay)**

[0092] 효소 면역 분석(ELISA)은 일반적인 샌드위치형 절차를 사용하여 수행되었다. 혈청 크레아틴 키나제 수치는 제조업체의 지침에 따라 샌드위치 ELISA 키트(MyBioSource, MBS261027)를 사용하여 측정되었다.

[0094] **[실험결과]**

[0095] **실시예 1. 잘토프로펜 처리에 의한 우트로핀 발현 증가 확인**

[0096] 일차 근아세포(primary myoblast) 및 스크리닝 데이터를 기반으로 근위축성 DMD 근육 치료를 위한 잘토프로펜의 치료 가능성을 평가했다. DMD에 대한 잘토프로펜의 효과를 조사하기 위한 첫 번째 단계로, 수컷 C57BL/6 기반 DMD 녹아웃 마우스(DMD KO primary myoblast)의 골격근에서 나온 일차 근아세포를 사용했다. 적절한 용량의 잘토프로펜을 결정하기 위해 다양한 용량의 잘토프로펜(3μM-1mM)을 24시간 동안 처리한 후 세포 생존율을 측정했다(도 1A). 300μM 잘토프로펜 처리된 세포의 세포 생존율은 처리되지 않은 세포에 비해 79.96%로 감소하였다. ($P<0.01$)

[0097] 우리는 12시간 동안 잘토프로펜으로 처리된 근관(myotube)을 수확했으며 우트로핀의 mRNA 수준은 용량 의존적 방식으로 유의하게 증가했다(도 1B). 또한 잘토프로펜은 근아세포(myoblast)가 분화되는 동안 우트로핀의 단백질 수준을 상향 조절했다(도 1C). 우트로핀은 DMD에서 NMJ 및 횡문근형질막(sarcolemma)에 위치한다. 면역형광 분석(immunofluorescence analysis)으로부터, 잘토프로펜 처리된 근관에서 우트로핀이 증가하는 것을 관찰하였다(도 1D). 우트로핀의 증가는 DMD 치료의 치료 마커 중 하나이다. 따라서 상기 결과는 잘토프로펜이 디스트로핀의 부재를 증가된 유트로핀으로 보완할 수 있음을 나타낸다.

[0099] **실시예 2. 잘토프로펜 처리에 의한 횡문근형질막(sarcolemma)에서 접착 단백질 성분 증가 확인**

[0100] 상술한 바와 같이, DMD 환자에서 디스트로핀 및 디스트로핀 당단백질 복합체의 손실은 근육 수축에 의해 유도된 근종파괴 및 불안정성을 초래한다. DMD 환자와 마찬가지로, mdx 마우스는 디스트로핀 단백질 및 α-신트로핀(α-syntrophin), α-디스트로브레빈(α-dystrobrevin)을 포함한 디스트로핀-당단백질 복합체(dystrophin-glycoprotein complex, DGC)의 손실을 나타낸다(도 2A). 또한, 우리는 이미 α-syntrophin이 mdx 마우스의 횡문근형질막에서 감소한다는 것을 알고 있다. DMD의 표현형의 완화는 증가된 sarcolemma 단백질 성분과 수반될 수 있다.

[0101] 도 2B에서 볼 수 있듯이 잘토프로펜은 유트로핀뿐만 아니라 α-신트로핀, α-디스트로브레빈 및 디스트로글리칸(dystroglycan)과 같은 근종성 단백질도 증가시켰다. sarcolemma 단백질에 대한 잘토프로펜의 증가 효과를 확인하기 위해 qRT-PCR을 수행했다. 우리는 잘토프로펜이 시간 의존적 방식으로 mRNA 수준에서 α-syntrophin 단백질 발현을 증가시킨다는 것을 발견했다(도 2C). 이러한 결과는 잘토프로펜 치료가 DMD 골격근에서 횡문근형질막 단백질 성분의 회복과 관련이 있고, 이를 통해 막 안정성을 증가시킴을 시사한다.

[0103] **실시예 3. 잘토프로펜 처리가 칼슘 신호 전달을 통한 우트로핀 전사 인자 증가를 유도시킴을 확인**

[0104] 24시간 동안 잘토프로펜으로 처리된 근아세포 세포를 수확했고 CaMKII의 인산화는 용량 의존적 방식으로 증가했다(도 3A). 칼슘 신호 전달이 잘토프로펜의 우트로핀 증가와 관련이 있는지 여부를 조사하기 위해 근아세포를 세포질 칼슘(Ca2+) 지표 Fluo-3/AM으로 처리했다. 우리는 잘토프로펜을 DMD 녹아웃(Knock out) 근아세포에 떨어뜨린 후 세포 내 Ca2+ 농도의 급격한 증가를 관찰했다(도 3B). 이 결과를 확인하기 위해 CaMKK 억제제인 STO609를 전처리하고 잘토프로펜을 DMD 녹아웃 근아세포에 처리했다. qRT-PCR 수행 결과, STO609가 잘토프로펜 효과에 의하여 증가하는 유트로핀을 억제한다는 것을 발견했다(도 3C). 그런 다음 우트로핀과 α-신트로핀 사이의 공동 면역침전(co-immunoprecipitation)을 수행했다. 상기 공동 면역침전 수행 결과는 잘토프로펜 처리 후 우트로핀이 α-신트로핀에 직접 결합하고 STO609가 상기 결합을 억제한다는 것을 보여주었다(도 3D).

[0105] 세포질 칼슘은 근형성 분화와 수축의 유도 모두에 관련된다. 또한, CaMK 신호전달은 골격근의 칼슘 및 수축 매개 PGC1 α(peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha) 상향 조절에 관여하는 것으로 보인다. PGC1α의 역할 중 하나는 우트로핀 전사를 조절하는 것이다. CaMK 경로와 우트로핀의 상향 조절의 상관관계가 PGC1α라고 예측하고qRT-PCR 분석을 수행한 결과 잘토프로펜이 용량 의존적 방식으로 MEF2A 및 PGC1α를 상향 조절하는 것으로 나타났다(도 3E 및 3F).

[0107] **실시예 4. 잘토프로펜 처리에 의한 DMD KO 근관에서 미오스타틴 발현 감소 확인**

[0108] 잘토프로펜이 근육 위축(atrophy) 마커를 조절하는지 여부를 추가로 테스트했다. 이를 테스트하기 위해 미오스

타틴(myostatin)(MSTN), MAFbx32, 및 MuRF1을 포함한 근육 위축 마커의 발현 수준을 측정했다. 먼저, 미오스타틴 프로모터 활성을 루시퍼라아제 활성 분석법(luciferase activity assay)으로 측정하였다(도 4A). qRT-PCR 및 웨스턴 블롯팅를 수행하여 근육 위축에 대한 잘토프로펜의 효과를 확인했다. 그 결과, 잘토프로펜은 용량 의존적 방식으로 미오스타틴의 mRNA 수준을 감소시킴을 확인하였다(도 4B).

[0109] 또한, 잘토프로펜은 용량 의존적 방식으로 위축 관련 단백질 MSTN, MAFbx32 및 MuRF1의 발현을 하향 조절하였다(도 4C). FoxO3a는 위축 관련 MuRF1 및 MAFbx32의 발현을 유발하기 때문에 FoxO3a가 하향 조절 위축 관련 유전자에 관여한다는 가설을 세웠다. 잘토프로펜 처리된 myotube가 단백질 수준에서 증가된 FoxO3a 발현과 동시에 증가된 인산화를 보임을 발견했다. 상기 결과는 잘토프로펜이 FoxO3a를 감소시켜 근육 위축 관련 유전자를 조절할 수 있음을 나타낸다. 이전 연구에서 PGC1α는 FoxO3 작용을 억제하여 골격근을 위축으로부터 보호하여 근육 크기를 조절하는 것으로 나타났다.

[0110] 또한, MuRF1 및 MAFbx 발현의 하향 조절은 단백질 합성의 양성 조절자의 활성화를 동반하였다. 잘토프로펜은 Thr389에서 p70S6K 인산화를 증가시켰다(도 4D). 종합하면, 잘토프로펜은 근육 위축 마커를 하향 조절하고 DMD 조건에서 단백질 합성을 증가시켜 근육 위축을 감소시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0112] **실시예 5. 잘토프로펜의 DMD KO 근관에서 근육 분화(myogenic differentiation) 조절 효과 확인**

[0113] 근육 분화를 강화하는 것이 DMD의 근위축성 병리에 대항하는 데 도움이 될 수 있다는 다른 연구의 결과와 도 1의 결과를 기반으로 잘토프로펜이 근육 분화를 통해 DMD를 완화한다는 가설을 세웠다. 상기 가설을 확인하기 위해 근육 분화에 대한 잘토프로펜의 효과를 평가했다. DMD 근아세포는 72시간 동안 잘토프로펜의 처리와 함께 DM에서 분화되었다. 그 결과, 잘토프로펜 처리는 미오신 중쇄 수준을 증가시켰다(도 5A).

[0114] 또한 myotube의 H&E 염색을 통해 이러한 결과를 확인할 수 있다. DMD 근아세포는 세포 융합 및 다핵 근관 형성이 달성될 때까지 잘토프로펜을 포함하거나 포함하지 않는 분화 배지와 함께 배양되었다. H&E 염색 및 근육 직경 계산 결과, 잘토프로펜이 근관 직경을 유의하게 증가시킴을 나타냈다 (도 5C 및 5D). 잘토프로펜이 횡문근형 질막 접착 성분을 상향 조절하여 막의 안정성을 증가시키는 것으로 확인되었다. 따라서, 잘토프로펜 회복 근육 분화 인자는 또한 막의 안정화의 연장이 될 수 있다.

[0116] **실시예 6. 잘토프로펜 처리에 의한 mdx 마우스의 표현형 완화 확인**

[0117] 잘토프로펜 처리 후 실험동물의 체중에는 차이가 관찰되지 않았다. mdx 마우스에 대한 잘토프로펜의 효과를 조사하기 위한 첫 번째 단계로, 대조군과 잘토프로펜 처리군에서 앞다리의 그립 강도를 평가했다(도 6A). 잘토프로펜 주사 4주 후, 잘토프로펜 처리된 마우스는 대조군 mdx 마우스에 비해 증가된 수준의 근력을 보였다.

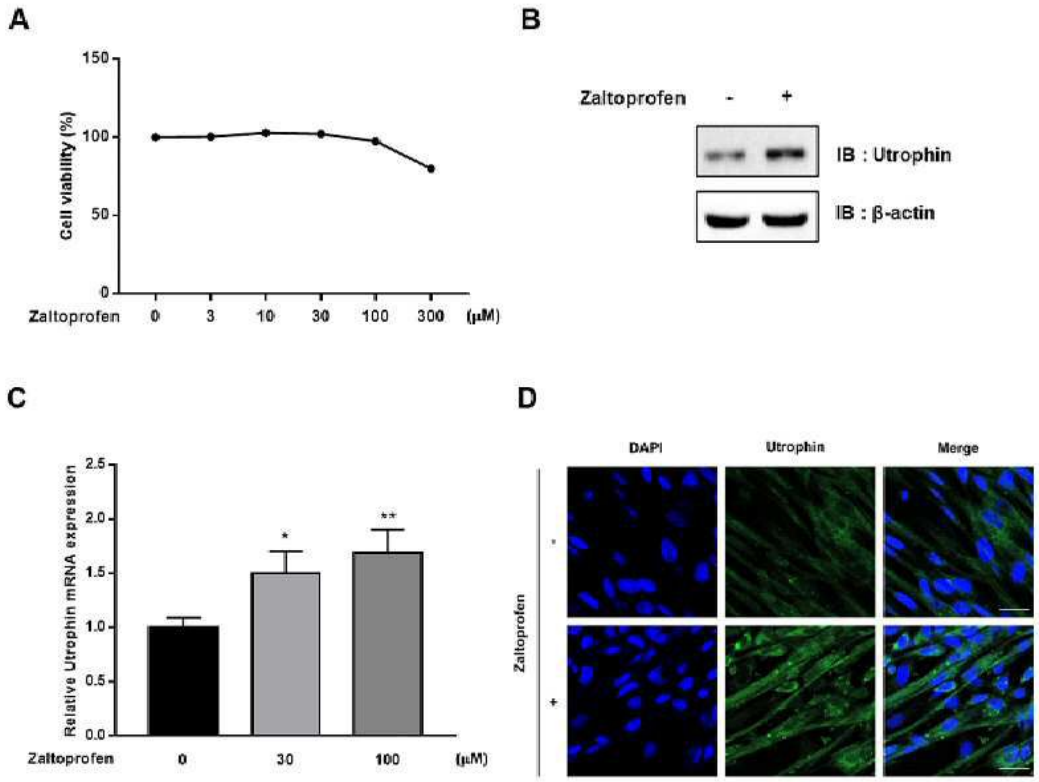
[0118] 또한, 잘토프로펜 처리 후 TA 근육에서 유트로핀 수치가 증가하는 것을 관찰했다(도 6B). 근육 위축의 관점에서, TA 근육에서 MuRF1 및 MAFbx의 발현은 잘토프로펜 처리군에서 감소하였다(도 6C). 잘토프로펜의 효과를 추가로 조사하기 위해 혈청 내 크레아틴 키나아제(creatine kinase, CK) 수준을 측정했다(도 6D). CK 수준은 DMD 환자에서 더 높은 것으로 알려져 있으며, 이에 따라 진단 마커 중 하나로 사용된다. 잘토프로펜의 4주 치료 후, CK 수치는 감소하였다.

[0120] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

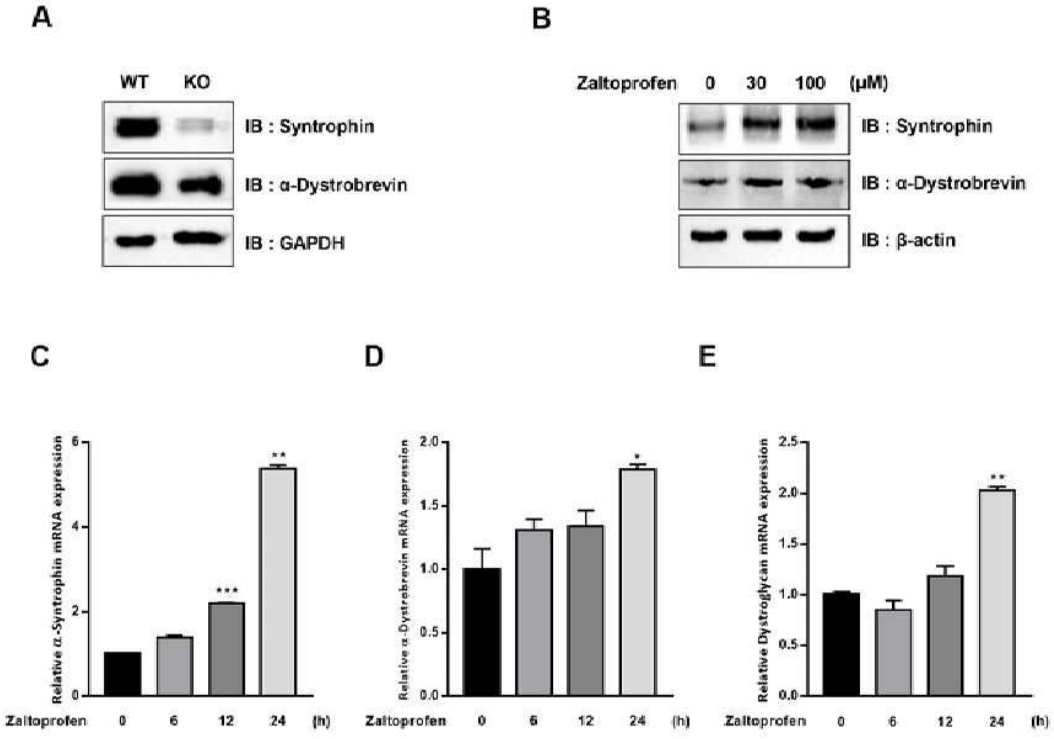
[0121] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

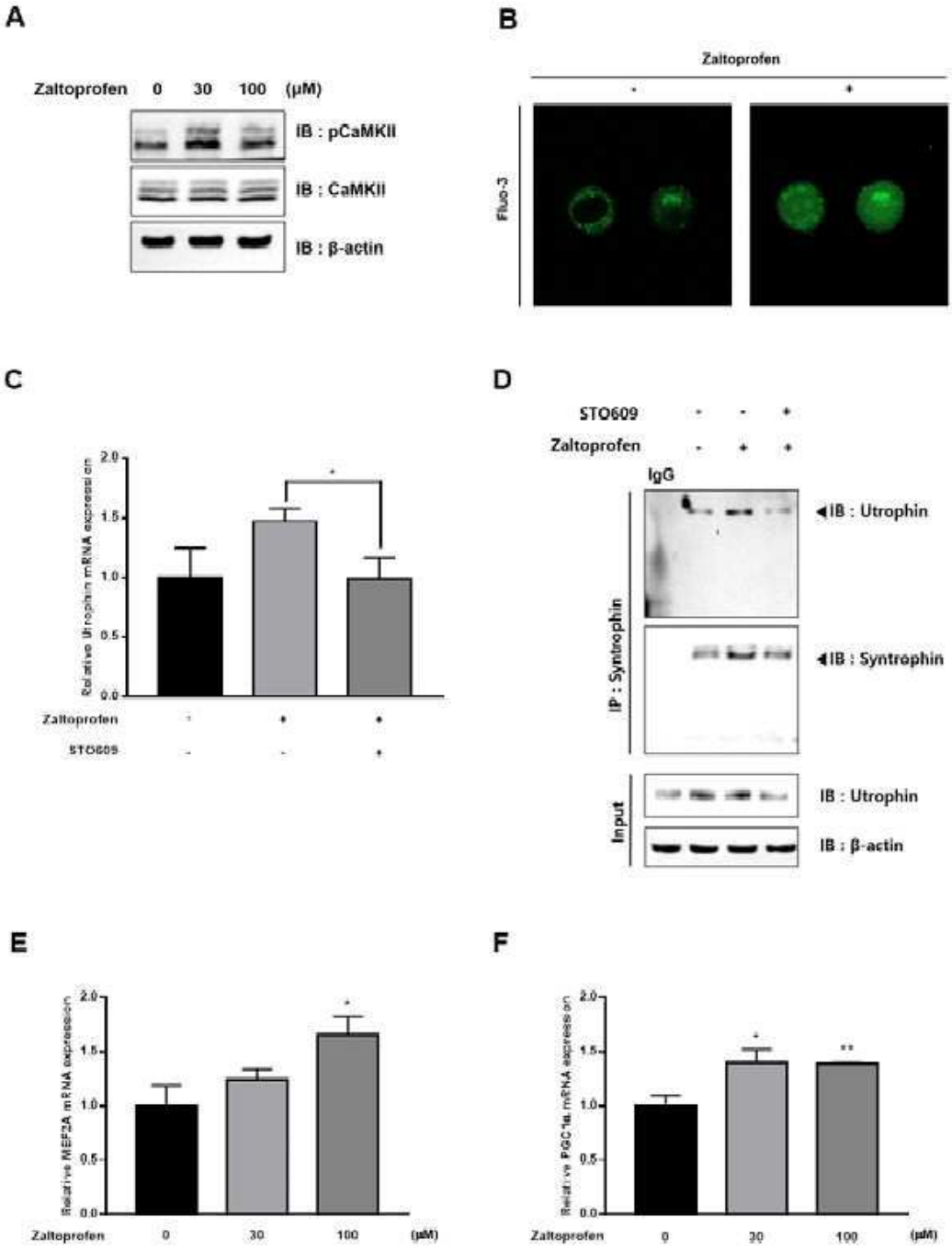
도면1


A
Cell viability (%)
150
100
50
0
Zaltoprofen 0 3 10 30 100 300 (μM)
B
Zaltoprofen - +
IB : Utrophin
IB : β-actin
C
Relative Utrophin mRNA expression
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
**
Zaltoprofen 0 30 100 (μM)
D
DAPI
Utrophin
Merge
Zaltoprofen
-
+

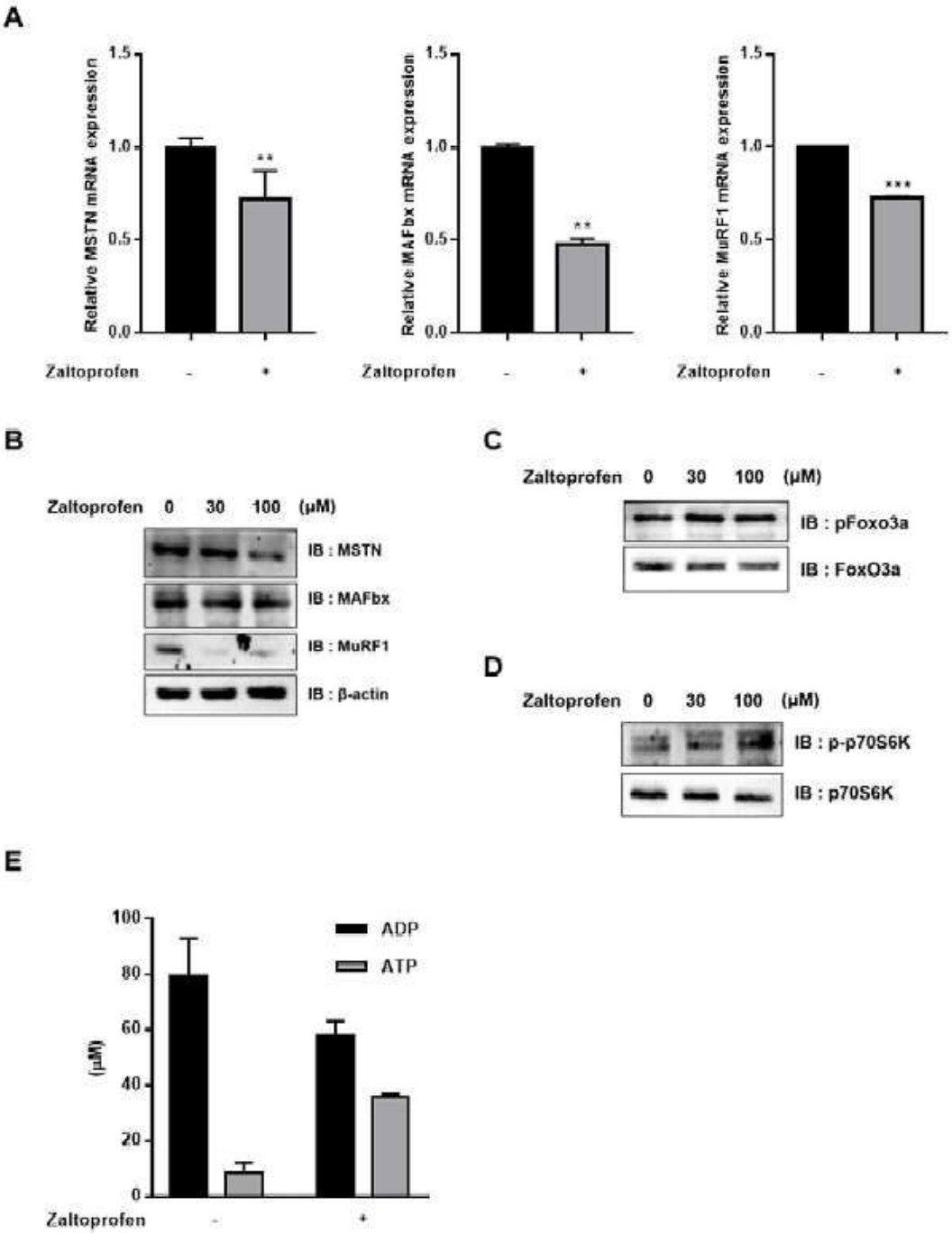
도면2


A
WT KO
IB : Syntrophin
IB : α-Dystrobrevin
IB : GAPDH
B
Zaltoprofen 0 30 100 (μM)
IB : Syntrophin
IB : α-Dystrobrevin
IB : β-actin
C
Relative α-Syntrophin mRNA expression
6
4
2
0
**
***
Zaltoprofen 0 6 12 24 (h)
D
Relative α-Dystrobrevin mRNA expression
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Zaltoprofen 0 6 12 24 (h)
E
Relative Dystroglycan mRNA expression
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
Zaltoprofen 0 6 12 24 (h)

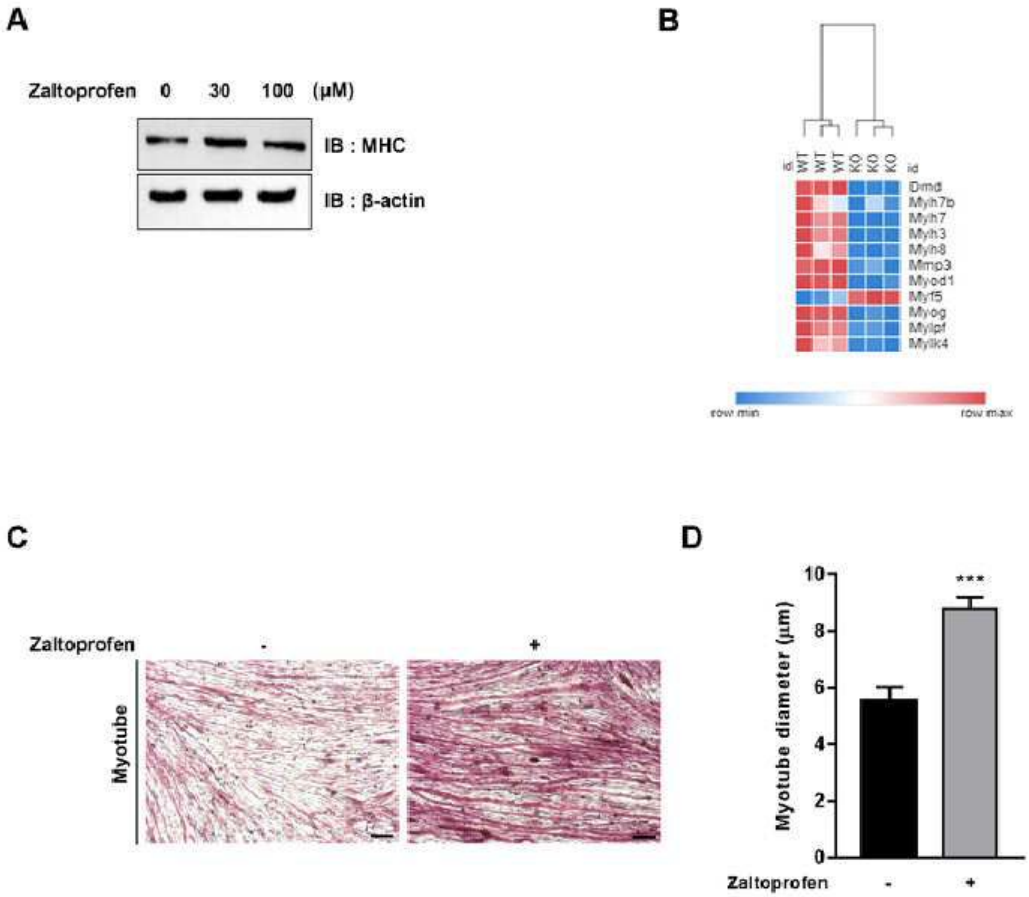
도면3


A
Zaltoprofen 0 30 100 (μM)
IB : pCaMKII
IB : CaMKII
IB : β-actin
B
Zaltoprofen
-
+
Fluo-3
C
Relative Utrophin mRNA expression
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Zaltoprofen - + +
STO609 - - +
D
STO609 - - +
Zaltoprofen - + +
IgG
IB : Utrophin
IB : Syntrophin
IP : Syntrophin
Input
IB : Utrophin
IB : β-actin
E
Relative MEF2A mRNA expression
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Zaltoprofen 0 30 100 (μM)
F
Relative PGC1α mRNA expression
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
**
Zaltoprofen 0 30 100 (μM)

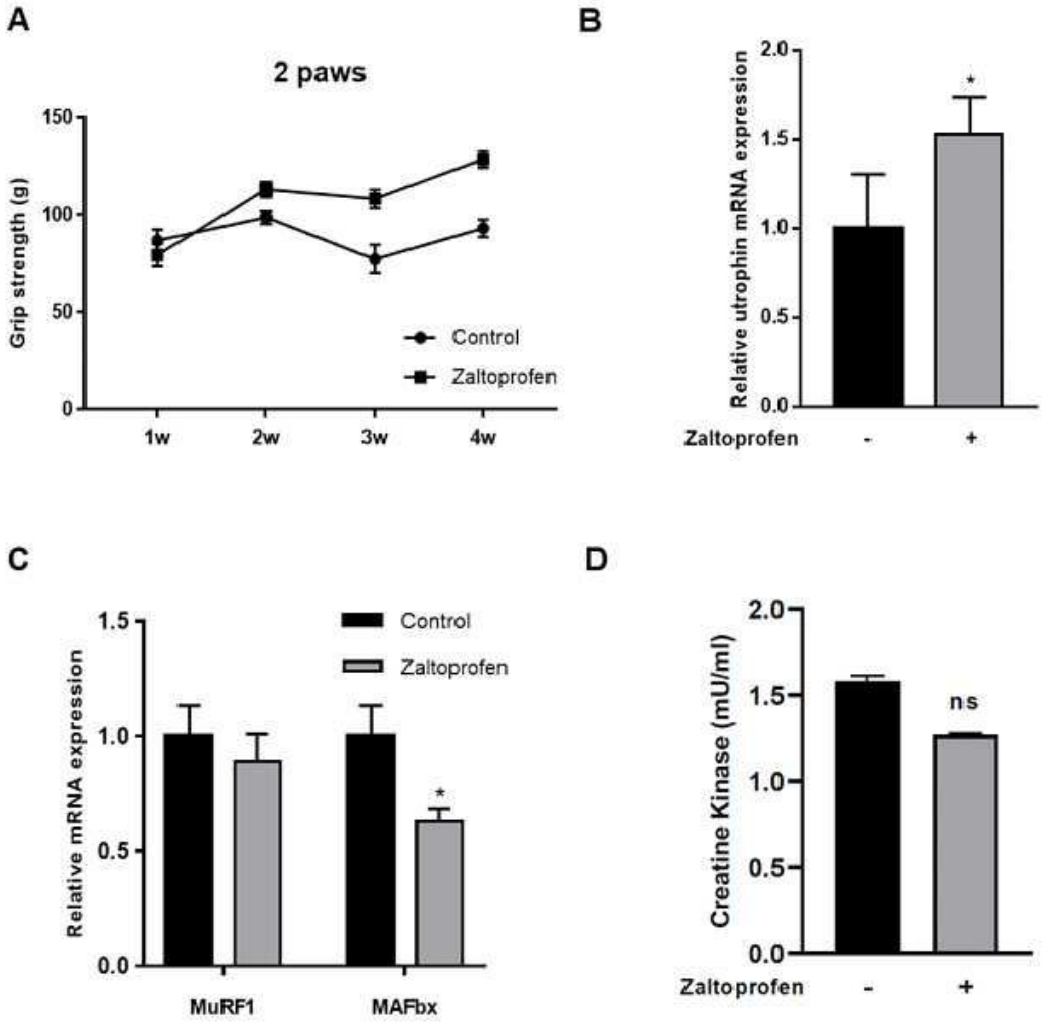
도면4


A
Relative MSTN mRNA expression
Relative MAFbx mRNA expression
Relative MuRF1 mRNA expression
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
***
Zaltoprofen - +
B
Zaltoprofen 0 30 100 (μM)
IB : MSTN
IB : MAFbx
IB : MuRF1
IB : β-actin
C
Zaltoprofen 0 30 100 (μM)
IB : pFoxo3a
IB : FoxO3a
D
Zaltoprofen 0 30 100 (μM)
IB : p-p70S6K
IB : p70S6K
E
100
80
60
40
20
0
(μM)
ADP
ATP
Zaltoprofen - +

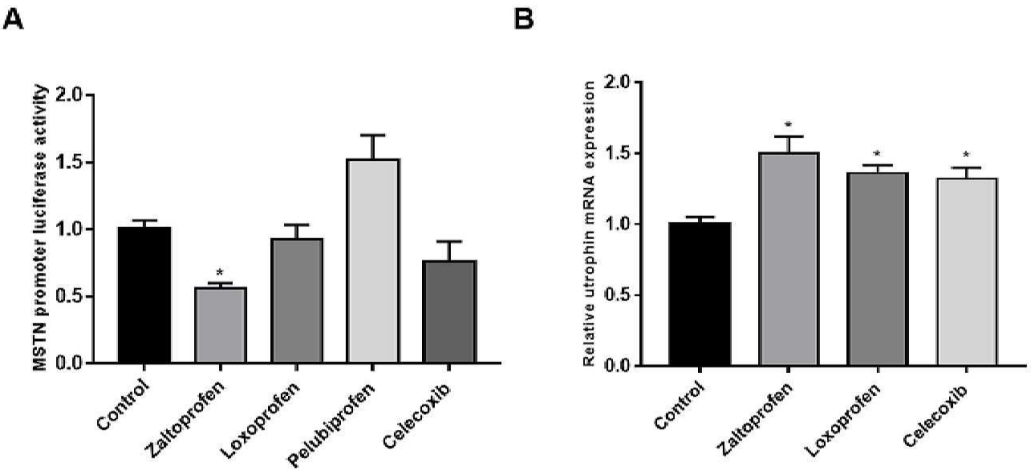
도면5


A
Zaltoprofen 0 30 100 (μM)
IB : MHC
IB : β-actin
B
id
WT
WT
WT
KO
KO
KO
id
Dmd
Myh7b
Myh7
Myh3
Myh8
Mrnp3
Myod1
Myf5
Myog
Mylpf
Mylk4
row min
row max
C
Zaltoprofen
-
+
Myotube
D
Myotube diameter (μm)
10
8
6
4
2
0
***
Zaltoprofen
-
+

도면6


A
2 paws
Grip strength (g)
150
100
50
0
1w
2w
3w
4w
Control
Zaltoprofen
B
Relative utrophin mRNA expression
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Zaltoprofen
-
+
C
Relative mRNA expression
1.5
1.0
0.5
0.0
Control
Zaltoprofen
*
MuRF1
MAFbx
D
Creatine Kinase (mU/ml)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
Zaltoprofen
-
+

도면7


A
MSTN promoter luciferase activity
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Control
Zaltoprofen
Loxoprofen
Pelubiprofen
Celecoxib
B
Relative utrophin mRNA expression
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
*
Control
Zaltoprofen
Loxoprofen
Celecoxib

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.