(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년11월28일
(11) 등록번호 10-1923153
(24) 등록일자 2018년11월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/192 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61P 21/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/192 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0090151
(22) 출원일자 2018년08월02일
심사청구일자 2018년08월02일
(56) 선행기술조사문헌
KR100665315 B1
KR1020090029735 A
KR1020090029735 A

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김기광
충청남도 청양군 장평면 묵은논길 67
천성혜
세종특별자치시 장군면 대교길 156-10
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 2 항 심사관 : 박수진

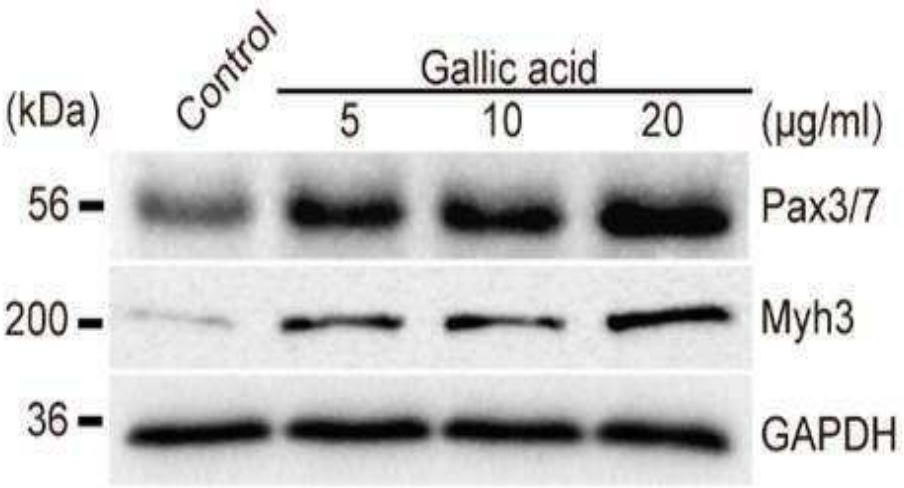
(54) 발명의 명칭 **갈산을 유효성분으로 포함하는 근 분화 촉진용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 갈산을 유효성분으로 포함하는 근 분화 촉진용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 유효성분인 갈산이 근원세포의 세포 생존률을 증진시킬 뿐만 아니라, 근원세포의 근세포로의 분화를 유도 및 촉진할 수 있으며, 근세포분화 관련 단백질의 발현량을 조절하는 효과가 있는 것이다.

따라서 본 발명의 갈산은 근분화 촉진제, 근육질환에 대한 의약품 또는 근육증가 촉진 또는 노인성 근 손실의 예방 또는 개선용 건강기능성식품에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61P 21/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/316 (2013.01)
(72) 발명자
허강민
대전광역시 유성구 상대남로 26, 903동 502호

원민호
대전광역시 대덕구 동춘당로23번길 37, 104동 1005호

명 세 서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

갈산(gallic acid) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육 퇴화, 근경직증, 근위축성 축삭경화증, 근무력증, 악액질(cachexia) 및 근육감소증(sarcopenia) 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 근육 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

갈산(gallic acid) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 근육증가 촉진 또는 노인성 근 손실의 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 갈산을 유효성분으로 포함하는 근 분화 촉진용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 우리 몸의 근육은 뼈에 붙어 뼈를 보호하고 체형을 바르게 유지시켜 주는 등의 여러 가지 기능을 한다. 또한, 근육은 칼슘 유입을 촉진시켜 골 밀도를 높여 주기도 한다. 그러나 신체는 노화하면서 구성성분의 변화로써 체지방과 체단백질의 재분포가 일어나며, 약 50세가 되면 근 세포 내 단백질의 합성 속도가 분해속도보다 느려져 근육이 급격하게 퇴화를 시작하게 되며, 근육 감소 질환에 노출될 수 있다.

[0003] 근육 감소 질환의 하나인 근육 감소증은 평소 자기 체질량의 약 13~24%가 감소한 상태를 말하는 것으로, 근육 감소증이 있으면 행동량이 현격하게 줄어 정신건강을 해칠 뿐만 아니라 생활의 만족도도 떨어지며, 용이한 일상생활에서도 쉽게 부상을 입고 심각한 중상에 이르기도 한다. 근육 감소증의 원인 중 하나는 노화가 진행됨에 따라 일어나는 골격근의 양과 질의 점진적 감소 및 부적절한 식이 에너지 섭취에 따른 지방과 체지방성분을 포함하는 체중감소 등을 원인으로 꼽을 수 있다.

[0004] 전구세포(precursor cell)의 분열과 결정 과정을 통해 형성된 근원세포(myoblast)는 근세포(myocyte)로 분화하고, 인접한 세포들과 융합하여 근관세포(myotube)로 분화한다. 분화된 근관세포는 myofibril(근원섬유)를 형성하는 과정을 통해 근육이 형성된다. 근원세포의 일부는 줄기 위성세포(satellite cell)로서 정지 상태로 있다가, 근육조직이 외상 또는 근육위축병(muscular dystrophy)과 같은 질병에 노출되면, 위성세포로 알려진 근육 줄기세포들은 손상된 부위의 근육을 치유하고 재생시킨다. 근육위축병과 같은 질환에 있어서, 이들 세포들은 근육의 안정성과 치유에 있어 특히 중요하다.

[0005] 한편, 갈산은 3,4,5-옥시벤존산으로, 몰식자산이라고도 한다. 무색의 주상 또는 긴 침상 결정으로, 냄새는 없고 맛이 떫으며, 약간 산성을 띤다. 1분자의 결정수를 가지며, 100~120℃로 가열속도에 따라 다르며, 융해와 동시에 분해하여 이산화탄소 및 피로갈롤이 된다. 금염 · 은염 · 펠링용액을 환원시킨다. 수렴성이 있으나, 타닌산만은 못하다. 찬물에는 잘 녹지 않으나, 뜨거운 물, 알코올, 아세톤에는 녹으며, 철(Ⅲ)염에 의해서 암청색 침전을 생성한다. 식물의 잎, 줄기, 뿌리 및 몰식자, 오배자(五倍子) 등에 유리상태로 존재하고, 또는 타닌의 구성분자로 분포한다. 알칼리 수용액은 강력한 환원성을 보이며, 갈색이 된다. 청색 잉크의 제조를 비롯하여 사

진의 현상액 또는 염료의 원료로 사용하는 외에 지혈제로 사용된다. 햇빛 및 공기와 접촉하면 변색하므로, 갈색병 또는 깡통에 밀봉하여 햇빛을 받지 않도록 저장해야 한다.

[0006] 이와 같은 갈산(gallic acid) 관련 기술로는 한국등록특허 제1286153에 갈산 유도체를 유효성분으로 함유하는 항암 조성물이 개시되어 있고, 한국등록특허 제0665315호에 신규한 갈산-콘쥬게이티드 리놀레산 지방 에스테르, 이의 제조방법 및 이를 함유하는 조성물이 개시되어 있으나, 본 발명의 갈산을 유효성분으로 포함하는 근 분화 촉진용 조성물은 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 갈산을 유효성분으로 포함하는 근 분화 촉진용 조성물을 제공하고, 유효성분인 갈산이 근원세포의 생존율을 현저하게 증가시킬 뿐만 아니라, 근원세포가 근 세포로 분화를 하는 것과, 근 분화 관련 단백질의 발현량 변화를 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 갈산(gallic acid) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근원세포(myoblast)의 분화 촉진제를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 근원 세포 분화 촉진제를 유효성분으로 함유하는 근육 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 근원 세포 분화 촉진제를 유효성분으로 함유하는 근육증가 촉진 또는 노인성 근 손실의 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 갈산을 유효성분으로 포함하는 근 분화 촉진용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 유효성분인 갈산이 근원세포의 세포 생존률을 증진시킬 뿐만 아니라, 근 세포로의 분화를 유도 및 촉진할 수 있으며, 근세포 분화 관련 단백질의 발현량을 조절하는 효과가 있는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명에 따른 갈산을 농도별로 처리하여 확인한 세포생존율의 결과이다.

도 2는 본 발명에 따른 갈산을 근원세포에 처리한 후, 면역 블롯 분석으로 근분화 촉진과 관련된 단백질의 발현량 변화를 확인한 결과이다.

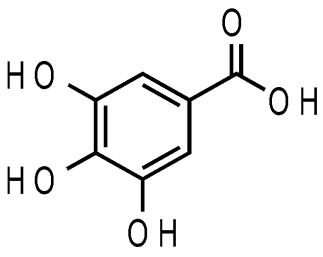
도 3은 본 발명에 따른 갈산을 근원세포에 처리하고 48시간 후의 근원세포의 증식 및 분화 상태를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은 갈산(gallic acid) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근원세포(myoblast)의 분화 촉진제에 관한 것이다.

[0014] 상기 갈산은 하기 화학식 1로 기재되는 구조식으로 이루어진 화합물이다.

화학식 1

[0015] 

[0016] 또한, 본 발명은 상기 근세포 분화 촉진제를 유효성분으로 함유하는 근육 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0017] 상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육 퇴화, 근경직증, 근위축성 축삭경화증, 근무력증, 악액질(cachexia) 및 근육감소증(sarcopenia) 중에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다.

[0018] 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 락토스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 성분들 이외에 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 계면활성제, 결합제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 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 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 근육질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적으로 허용되는 어떠한 경로를 통하여도 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 목적하는 바에 따라 근육 내 투여, 점안 투여, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경피 패치 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장 내 투여 등의 경로를 통해 투여될 수 있고, 구체적으로 근육 내 투여의 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 근세포 분화 촉진제를 유효성분으로 함유하는 근육증가 촉진 또는 노인성 근 손실의 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물에 관한 것이다.

[0020] 상기 건강기능성식품 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다. 본 발명의 건강기능성식품 조성물은 갈산을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 혼합하여 제조될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 제조될 수 있다. 상기 가자 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 카라멜, 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 중에서 선택된 어느 하나의 형태일 수 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능성식품을 모두 포함한다. 즉, 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 건강기능성식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 및 천연 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 또한, 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 상기의 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 건강기능성식품 조성물은 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있으며, 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 단당류, 말토스, 슈크로스와 같은 이당류, 덱스트린, 사이클로 덱스트린과 같은 다당류, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올이다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 크게 중요하지 않지만, 본 발명의 조성물 100g에 대하여, 0.01~0.04g인 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 0.02~0.03g을 포함하는 것이지만 이에 한정하지 않는다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0021] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0022] **실시예 1. 세포 배양**

[0023] 본 발명의 실시예에서 사용된 세포주는 마우스 일차 근원세포(mouse primary myoblast)로 생후 3일 된 마우스의 뒷다리로부터 근육 조직을 분리하여 얻었다. 상기 세포주는 Ham's F-10 영양 혼합(F-10) 배지에 10% 코스믹 송아지 혈청(cosmic calf serum), 10ng/㎖의 염기성 섬유모세포생장인자(basic fibroblast growth factor), 1% 항생제를 첨가하여 표준 세포 배양법인 37℃, 5% CO_2 조건에서 폴리-L-오르니틴(poly-L-ornithin)과 콜라겐(collagen)으로 코팅한 배양 디쉬(culture dish)에서 배양하였다.

[0024] **실시예 2. 세포 생존율 분석**

[0025] 갈산(gallic acid)을 농도별로 24시간 동안 근원세포(myoblast)에 처리한 후. MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) 어세이를 실시하였다.

[0026] 96웰 플레이트에 근원세포(myoblast)를 2×10^4 개의 세포/웰로 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 각각의 웰을 시료가 농도별로 처리된 배지로 교환해 주었다. 24시간 후 MTS 시약을 첨가하고 마이크로 플레이트 리더를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 처리하지 않은 대조군 대비 시료를 처리한 세포의 생존율을 백분율로 표시하여 상대적인 세포 독성을 측정하였다.

[0027] 식(2)

[0028] 세포독성(%)=[(시료 첨가군의 흡광도-시료 자체의 흡광도)/대조군의 흡광도] × 100

[0029] 그 결과, 도 1에 개시한 바와 같이 갈산은 근원세포(myoblast)의 세포 활성도를 증가시켰으며, 특히 갈산이 40 ㎍/㎖에서 178.32%의 세포 활성도를 나타내며 가장 큰 효과를 보였다.

[0030] **실시예 3. 갈산의 처리에 따른 근원세포에서의 pax3/7과 myh3 단백질 발현량 변화 확인**

[0031] 근원세포 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 20㎍/㎖의 갈산을 48시간 동안 근원세포에 처리한 후, 면역블롯팅 분석(immunoblotting analysis)를 통해 pax3/7과 myh3 단백질 변화를 확인하였다. 상세하게는 근원세포(myoblast)를 PBS로 세척 후 분해 완충용액(lysis buffer)[10mM Tris-HCl (pH 7.5), 100mM NaCl, 1mM EDTA, 10% 글리세롤(glycerol), 1% Triton X-100]를 이용해 분해물(lysate)을 추출하였다. 로딩버퍼(Laemmi sample buffer)에 같은 양의 단백질 분해물(protein lysate)를 혼합하고, SDS-PAGE를 통해 단백질 분해물을 크기별로 분리시킨 후, anti-pax3/7 항체, anti-myh3 항체 및 anti-GAPDH 항체를 이용하여 면역블롯을 실시하였다.

[0032] 그 결과, 도 2에 개시한 바와 같이 갈산의 처리에 의해 myh3 및 pax3/7의 단백질 발현이 농도 의존적으로 증가하였다.

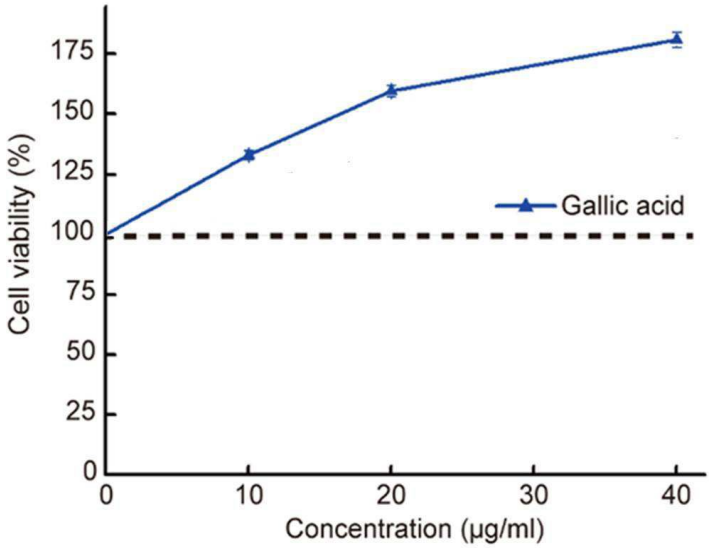
[0033] **실시예 4. 갈산의 처리에 따른 근원세포의 증식과 분화 확인**

[0034] 갈산에 의한 근원세포(myoblast)에서의 myh3 단백질 발현량 증가를 면역형광 어세이(immunofluorescence assay)를 통해 시각화하였다.

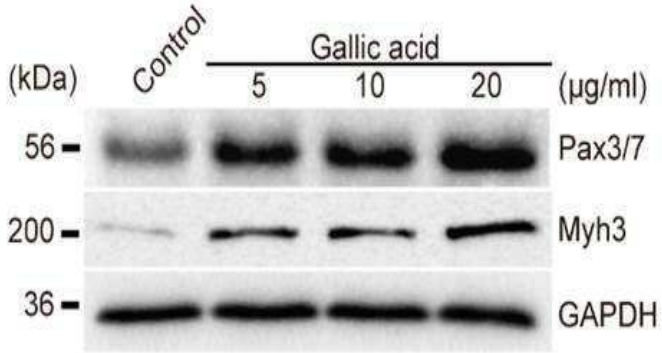
[0035] 갈산을 처리하지 않은 대조군(control)과 비교하였을 때, 48시간 동안 분화 배지(differentiation media)로 분화를 유도한 근원세포(myoblast)인 대조군에서는 myh3 발현의 증가와 함께 세포융합(cell fusion) 현상이 일어나 myotube가 형성된 것을 관찰할 수 있었고, 20㎍/㎖의 갈산을 48시간 동안 처리해준 근원세포(myoblast)에서는 분화를 유도하지 않았음에도 myh3의 발현량의 증가와 함께 근세포(myocyte)의 형태로 세포의 형태가 변하며 분화가 유도된 것을 확인할 수 있었다(도 3).

도면

도면1


175
150
125
100
75
50
25
0
Cell viability (%)
Gallic acid
0
10
20
30
40
Concentration (μg/ml)

도면2


(kDa)
Control
Gallic acid
5
10
20
(μg/ml)
56
Pax3/7
200
Myh3
36
GAPDH

도면3

