

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 1월 5일 (05.01.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/003177 A1

(51) 국제특허분류:

A01K 67/027 (2006.01) A61K 31/7076 (2006.01)
C12N 15/01 (2006.01) A61K 33/18 (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01) A61K 38/08 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/006955

(22) 국제출원일: 2016년 6월 29일 (29.06.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2015-0091807 2015년 6월 29일 (29.06.2015) KR
10-2016-0068882 2016년 6월 2일 (02.06.2016) KR

(71) 출원인: 연세대학교 원주산학협력단 (UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY WONJU CAMPUS) [KR/KR]; 26493 강원도 원주시 흥업면 연세대길 1, Gangwon-do (KR).

(72) 발명자: 최인호 (CHOI, In Ho); 26435 강원도 원주시 북원로 2246 번길 42, 9동 205호, Gangwon-do (KR). 박경숙 (PARK, Kyoung Sook); 06360 서울시 강남구 광평로 10길 15, 109동 204호, Seoul (KR). 주현우 (JU,

Hyun Woo); 06310 서울시 강남구 언주로 21, 27동 119호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 김보민 (KIM, Bo-min); 06762 서울시 서초구 바우피로 23 4층 (우면동, 선일빌딩), 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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

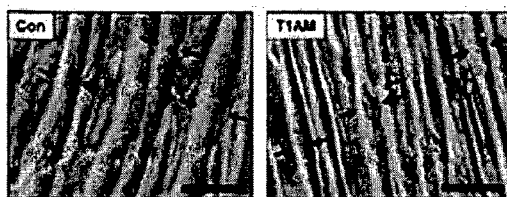
[다음 쪽 계속]

(54) Title: MUSCULAR-ATROPHY-INDUCING AGENT USING HYPOMETABOLISM-INDUCING SUBSTANCE TIAM, AND USE THEREOF IN TREATING MUSCULAR HYPERTROPHY

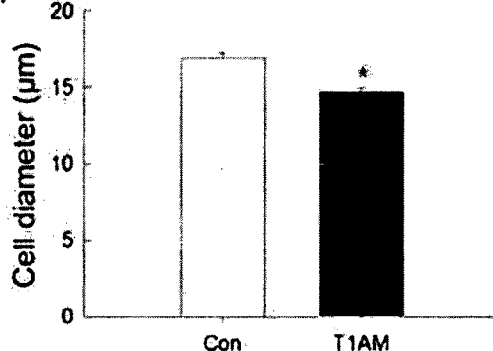
(54) 발명의 명칭: 저대사 유도물질 TIAM을 이용한 근위축 유도제 및 이의 근비대증 치료 용도

[도1]

A.



B.



(57) Abstract: The present invention relates to: a muscular-atrophy-inducing agent containing, as an active ingredient, a hypometabolism-inducing substance selected from the group consisting of TIAM (3-iodothyronamine), DADLE ([D-Ala2,D-Leu5] enkephalin), 5'-AMP (5'-adenosine monophosphate) and H₂S(hydrogen sulfide); a muscular-atrophy study-model production method comprising a step of inducing muscular atrophy by administering said muscular-atrophy-inducing agent; a study model produced in accordance with said muscular-atrophy study-model production method; a method of drug screening for preventing or treating muscular atrophy by using said study model; and a composition for preventing or treating muscular hypertrophy, and a composition for facial muscle shrinkage. The muscular-atrophy study model according to the present invention is advantageous in that said study model can provide an economic study model for muscular-atrophy study by using a hypometabolism-inducing agent capable of mass production, and can beneficially be used in testing for the screening of drugs for preventing or treating muscular atrophy and, in addition, the invention can beneficially be used as a composition for preventing or treating muscular hypertrophy, and a composition for facial muscle shrinkage through a muscle-atrophy effect.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2017/003177 A1



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 T1AM(3-iodothyronamine), DADLE([D-Ala2,D-Leu5] enkephalin), 5'-AMP(5'-adenosine monophosphate) 및 H₂S(hydrogen sulfide)로 이루어진 그룹에서 선택되는 저대사(hypometabolism) 유도물질들을 유효성분으로 함유하는 근위축 유도제, 이를 투여해 근위축을 유발하는 단계를 포함하는 근위축 연구모델 제조방법, 이에 따라 제조된 연구모델, 이를 이용한 근위축 예방용 또는 치료용 약물 스크리닝 방법 및, 근비대증 예방 또는 치료용 조성물, 안면 근육 축소용 조성물에 관한 것으로 본 발명에 따른 근위축 연구모델은 대량생산이 가능한 저대사 유도제를 이용함으로써 경제적인 근위축 연구를 위한 연구모델을 제공할 수 있고, 근위축 예방 또는 치료약제의 스크리닝을 위한 검증으로 유용하게 사용할 수 있는 효과가 있으며, 또한 근위축 효과를 통해 근비대증 예방 또는 치료용, 안면 근육 축소용 조성물로도 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 저대사 유도물질 T1AM을 이용한 근위축 유도제 및 이의 근비대증 치료 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 T1AM(3-iodothyronamine)의 저대사 효능에 기반한 근위축 유도제, 및 상기 저대사 유도물질을 이용한 선천적 근육강직증(myotonia congenita), 종아리 비대증(calf hypertrophy), 마이어증후군(myhre syndrome), 마이오스타틴 관련 근비대증(Myostatin-related muscle hypertrophy)을 포함하는 근비대증(muscle hypertrophy) 예방 또는 치료용, 또는 안면 근육 축소용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 근위축(muscle atrophy)은 유전적 질환(예, Duchenne muscle dystrophy) 그뿐만 아니라, 신체 상해, 암환자의 전신쇠약(cancer cachexia), 근 노화, 장기간 침상생활이나 우주비행 등 다양한 병리적, 생리적 상태에서 일어난다. 액틴과 미오신 등의 근 단백질 양이 줄어들고, 근질량과 근력이 심각하게 감소한다. 따라서 단순한 거동에서부터 일상 업무, 운동, 심지어 우주인 임무에 이르기까지 대부분의 활동에 영향을 미치기 때문에, 근위축을 치료할 약리 재발의학적 연구가 중요하다.
- [4] 근위축 치료를 위한 첫 단계는 근위축을 유도할 적절한 모델을 개발하는 것이다. 동물모델(*in vivo*)로는 신경절제(denervation)와 하지현수(hindlimb suspension) 법이 주로 사용되고 있다. 약물로는 합성 글루코코르티코이드인 덱사메타손(dexamethasone)과 산화물질(예, H_2O_2 와 같은 활성산소) 등의 처리법들이 활용되고 있다. 상기 동물모델과 약물들은 예외 없이 포크헤드 박스 O(forkhead box O, FoxO)의 활성화, 근조직 특이적 분해효소(ubiquitin E3 ligase) 및 프로테아좀(proteasome) 발현 증가 등 근단백질 이화작용과 관련된 신호전달경로를 활성화시키며, 동시에 근단백질 동화작용 관련 신호전달경로(Akt1-S6K)를 억제시키는 것으로 밝혀져 있다(Shimizu et al., 2011). 또한 근위축 과정에서 단백질 신생과 손상 복구 등을 도와주는 샤페론 단백질(예, 열충격 단백질(heat shock proteins))의 발현도 감소되는 것으로 알려져 있다(Gwag et al. 2009).
- [5] 상기 근위축 유도제들의 기전을 살펴보면, 덱사메타손은 항염증 효능을 가진 스테로이드 호르몬 계열 물질로, 최근 보고서에 따르면 글루코코르티코이드 수용체(GR)에 결합한 뒤 FoxO-프로테아좀의 단백질 분해 신호전달경로를 활성화시켜 근위축을 유도하는 것으로 알려져 있다(Shimizu et al., 2011). 과산화수소와 같은 산화물질들은 근소포체막과 미토콘드리아 막을 손상시키며, 이때 방출되는 Ca^{2+} 와 사이토크롬(cytochrome) C가 캐스파제(caspase) 경로와

칼페인(calpain) 단백질 분해 효소들의 활성화를 촉진시켜 근위축을 유도하는 것으로 보고되어 있다(McClung et al. 2009).

[6]

[7] 또한, 근비대증(muscle hypertrophy)은 근단백질 합성과 분해의 균형이 무너져 발생하는 질환으로, 대표적으로 선천적 근육강직증(myotonia congenita), 종아리 비대증(calf hypertrophy), 마이어증후군(myhre syndrome), 마이오스타틴 관련 근비대증(Myostatin-related muscle hypertrophy) 등이 있다. 이들 질환 중 특히 myostatin-related muscle hypertrophy는 근단백질 분해에 관여하는 myostatin 유전자가 망가짐으로써 나타나는 증상이다. Myostatin은 근단백질 합성 경로(예: Akt1-mTOR)를 억제시키고 근단백질 분해 경로(예: SMAD-proteasome)의 활성을 증가시키는 역할을 하지만 이 유전자가 망가지면 근질량 유지의 균형이 무너져 근비대증이 나타나게 된다.

[8]

[9] 한편, 3-아이오도타이로나민(3-iodothyronamine, T1AM)은 갑상선 호르몬(T3, T4)의 한 과생물질로, 체내에서 생성될 수 있는 저대사(hypometabolism) 유도물질이다. 설치류의 대다수 조직 샘플(뇌, 간, 심장, 신장, 근육 등)과 인체 혈액에서도 극미량(pico mole) 존재하는 것으로 밝혀져 있다(Zucchi R et al., 2006). 또한 3-아이오도타이로나민은 합성 가능한 물질로 그 제조방법이 미국등록특허 제6,979,750호 및 제7,321,065호 및 본원 발명자의 선행특허인 한국등록특허 제1,112,731호에 개시되어 있어 대량생산이 가능해 산업적 이용에 용이하다.

[10]

[11] 본 발명자들은 대량생산이 가능한 저대사 유도물질 처리를 통하여 근위축을 유도할 수 있다는 것을 근단백질 생성 및 억제 관련 단백질 발현 수준 및 근관세포 크기 변화를 통해 규명하였으며, 이러한 저대사 유도물질을 이용하여 기존의 방법과는 상이한 신개념의 근위축 연구모델, 및 근위축 억제 효과를 통한 근비대증 치료제 또는 보톡소 용도로 사용가능한 안전 근육 축소용 조성물을 제공하고자 한다.

[12]

[13] [선행기술문헌]

[14] [특허문헌]

[15] (특허문헌 1) 미국공개특허 2013-0269046

[16]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[17] 본 발명의 목적은 기존의 신경절제(denervation)법, 하지현수(hindlimb suspension)법 및 합성 글루코코르티코이드인 덱사메타손(dexamethasone) 또는

산화물질(예, H_2O_2 와 같은 활성산소) 등의 처리법과는 다른 새로운 근위축 유도방법으로 근위축 연구모델을 제공하는데 있다. 여기서 연구모델은 세포, 조직 및 동물모델을 포함할 수 있다.

[18] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 저대사(hypometabolism) 유도물질을 이용한 근비대증(muscle hypertrophy) 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 또는 건강식품을 제공하는데 있다.

[19] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 저대사(hypometabolism) 유도물질을 이용한 보톡소 용도로 사용가능한 안면 근육 축소용 조성물을 제공하는데 있다.

[20]

과제 해결 수단

[21] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 동물모델을 대상으로 하는, T1AM(3-iodothyronamine), DADLE([D-Ala²,D-Leu⁵] enkephalin), 5'-AMP(5'-adenosine monophosphate) 및 H_2S (hydrogen sulfide)로 이루어진 그룹에서 선택되는 저대사(hypometabolism) 유도물질을 유효성분으로 함유하는 근위축 유도제, 이를 세포와 동물에 투여해 근위축을 유발하는 단계를 포함하는 근위축 연구모델 개발, 이에 근거한 근위축 예방용 또는 치료용 약물 스크리닝 방법을 제공함으로써 상기 과제를 해결할 수 있다.

[22] 또한, 본 발명은 상기 저대사 유도물질을 이용한 근비대증(muscle hypertrophy) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[23] 또한, 본 발명은 상기 저대사 유도물질을 이용한 근비대증 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

[24] 아울러, 본 발명은 저대사 유도물질을 이용한 안면근육 축소용 조성물을 제공한다.

[25]

발명의 효과

[26] 본 발명에 따른 근위축 유도 모델은 대량생산이 가능한 저대사 화합물을 이용함으로써 경제적인 근위축 연구모델을 제공할 수 있고, 근위축 예방 또는 치료약제의 스크리닝을 위한 검증으로 유용하게 사용될 수 있으며, 또는 상기 저대사 화합물은 근단백질 분해를 유의적으로 활성화시키므로, 근비대증(muscle hypertrophy) 치료제 또는 안면근육 축소용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[27]

도면의 간단한 설명

[28] 도 1은 T1AM 처리군과 대조군 간의 C2C12 근관세포 직경 비교를 나타낸 것이다: (A)는 Axiovert 200 광학현미경(배율: 200x)으로 촬영한 근관세포의 대표 사진으로, 각 쌍의 화살표는 근관세포의 직경을 측정한 위치를 나타낸다 (블랙 바 = 25 μ m). (B)는 두 군간 근관세포의 직경을 측정하여 나타낸 그래프이다. 데이터: 평균 $\pm$ SEM (n = 3; 96 세포/군), *: 두 군 간의 유의적 차이가 있음을

의미함 [독립표본 t-검정(independent samples t-test), $P < 0.05$]).

[29] 도 2는 T1AM 처리군과 대조군 간 C2C12 근관세포의 AMPK 활성을 비교하여 나타낸 것이다: A는 p-AMPK 및 AMPK 발현에 대한 면역블롯팅(Immunoblotting) 분석 결과이다. B는 p-AMPK 및 AMPK 발현 수준을, C는 p-AMPK/AMPK 발현 비율을 농도계측정량(Densitometric quantitation)으로 나타낸 그래프이다[평균 $\pm$ SEM ($n = 6$), *, $P < 0.05$].

[30] 도 3은 T1AM 처리군과 대조군 간 C2C12 근관세포의 Akt1 및 S6K 발현을 비교하여 나타낸 것이다: A는 Akt1 및 S6K 발현에 대한 면역블롯팅(Immunoblotting) 분석 결과이다. B-C는 p-Akt1 및 Akt1 발현 수준 및 p-Akt1/Akt1의 발현 비율을 나타낸 그래프이다. D-E는 p-S6K 및 S6K 발현 수준 및 p-S6K/S6K의 발현 비율을 나타낸 그래프이다[평균 $\pm$ SEM ($n = 6$), *, $P < 0.05$].

[31] 도 4는 T1AM 처리군과 대조군 간 C2C12 근관세포의 FoxO1 및 FoxO3 발현을 비교하여 나타낸 것이다: A는 FoxO1 및 FoxO3 발현에 대한 면역블롯팅(Immunoblotting) 분석 결과이다. B는 FoxO1 및 FoxO3에 대한 면역형광염색법 분석결과로 공초점 현미경으로 촬영한 사진이다. C-D는 p-FoxO1 및 FoxO1 발현 수준 및 p-FoxO1/FoxO1의 발현 비율을 나타낸 그래프이다. E-F는 p-FoxO3 및 FoxO3 발현 수준 및 p-FoxO3/FoxO3의 발현 비율을 나타낸 그래프이다[평균 $\pm$ SEM ($n = 6$), *, $P < 0.05$].

[32] 도 5는 T1AM 처리군과 대조군 간 C2C12 근관세포의 MuRF1 및 MAFbx 발현을 비교하여 나타낸 것이다: A는 FoxO1 및 FoxO3 발현에 대한 면역블롯팅(Immunoblotting) 분석 결과이다. B-C는 MuRF1 및 MAFbx 발현 수준에 대한 농도계측정량(Densitometric quantitation)을 나타낸 그래프이다. D는 26S의 키모트립신-유사 활성을 나타낸 것으로 세포 기반 발광 분석을 통하여 결정되었고, 상대적인 광 유니트(RLU)로 나타내었다. 실제 키모트립신-유사 활성은 각 분석에서 <총 RLU - 배경 RLU>로부터 결정되었다.[평균 $\pm$ SEM ($n = 6$), *, $P < 0.05$].

[33] 도 6은 T1AM 처리군과 대조군 간 C2C12 근관세포의 샤페론(chaperone) 발현을 비교하여 나타낸 것이다: A는 열충격 단백질72(HSP72), HSP60 및 알파비-크리스탈린(α B-crystallin) 발현의 면역블롯팅(Immunoblotting) 분석 결과이다. B-D는 A의 각 샤페론 단백질 발현 수준에 대한 농도계측정량(Densitometric quantitation)을 나타낸 그래프이다[평균 $\pm$ SEM ($n = 6$), *, $P < 0.05$].

[34] 도7은 T1AM 처리에 따른 근육 단백질 합성 및 분해와 관련된 신호전달 경로의 개략도이다.

[35]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[36] 본 발명은 동물모델을 대상으로 하는, T1AM(3-iodothyronamine),

DADLE([D-Ala2,D-Leu5] enkephalin), 5'-AMP(5'-adenosine monophosphate) 및 H₂S(hydrogen sulfide)로 이루어진 그룹에서 선택되는 저대사(hypometabolism) 유도물질은 유효성분으로 함유하는 근위축 유도제, 이를 처리 또는 투여해 근위축을 유발하는 단계를 포함하는 근위축 연구모델 제조방법, 이에 따라 제조된 연구모델 및 이를 이용한 근위축 예방용 또는 치료용 약물 스크리닝 활용 방법, 상기 저대사 물질을 유효성분으로 함유하는 근비대증 예방 또는 치료용 조성물 또는 상기 저대사 물질을 유효성분으로 함유하는 안면 근육 축소용 조성물에 관한 것으로, 본 발명자들은 저대사 유도물질이 근단백질 합성기전을 억제하고 분해기전은 활성화한다는 것을 관련 단백질 발현 및 근관세포 크기의 변화를 통해 규명하여 본 발명을 완성하였다.

[37]

[38] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[39]

[40] 본 발명은 저대사(hypometabolism) 유도물질을 유효성분으로 함유하는 근위축 유도제로서, T1AM(3-iodothyronamine), DADLE([D-Ala2,D-Leu5] enkephalin), 5'-AMP(5'-adenosine monophosphate) 및 H₂S(hydrogen sulfide)로 이루어진 그룹에서 선택되는 저대사(hypometabolism) 유도물질을 유효성분으로 함유하는 근위축 유도제를 제공한다.

[41] 본 발명의 일 양태에서, 상기 저대사 유도물질은 보다 구체적으로 T1AM(3-iodothyronamine)일 수 있다.

[42] 본 발명의 일 양태에서, 상기 연구모델에서 세포주로는 근세포주(muscle cell line)가 사용될 수 있고, 당업계에서 사용되는 통상의 근세포주 또는 근섬유를 사용할 수 있으며, 예를 들어 C2C12 근세포 등이 사용될 수 있다.

[43] 본 발명의 일 양태에서, 상기 연구모델에서 동물은 척추동물일 수 있고, 보다 구체적으로 인간을 제외한 척추동물을 의미하며 예를 들어 마우스, 랫트 및 햄스터를 포함하는 설치류, 토끼, 말, 소, 개, 고양이, 원숭이, 기니피그 등을 포함할 수 있다.

[44] 또한 본 발명은 정상 동물에 T1AM(3-iodothyronamine), DADLE([D-Ala2,D-Leu5] enkephalin), 5'-AMP(5'-adenosine monophosphate) 및 H₂S(hydrogen sulfide)로 이루어진 그룹에서 선택되는 저대사(hypometabolism) 유도물질을 투여하여 근위축을 유발하는 단계를 포함하는 근위축 연구모델 제조방법을 제공한다.

[45] 본 발명의 일 양태에서, 상기 저대사 유도물질은 보다 구체적으로 T1AM(3-iodothyronamine)일 수 있으며, T1AM의 투여용량은 적절히 조절될 수 있다. 예컨대 T1AM를 복강투여 하는 경우, T1AM의 투여용량이 투여대상 동물의 단위체중(kg)당 10 mg/kg 미만이면 근위축이 유발되기 어려우며, 500 mg/kg 초과하면 동물이 사망하게 되므로, T1AM의 투여용량은 동물의 단위체중(kg)당 10 내지 500 mg/kg, 보다 구체적으로 20 내지 250 mg/kg, 보다 더

구체적으로 25 내지 100 mg/kg일 수 있으나, 동물의 상태, 실험조건에 따라 적절히 조절할 수 있다.

- [46] 본 발명의 일 양태에서 세포에서의 처리 농도는 0.1 μ M 내지 1000 μ M로 할 수 있으나, 세포의 양, 상태 및 실험조건에 따라 적절히 조절할 수 있다.
- [47] 본 발명의 일 양태에서, 저대사 유도물질의 투여방식은 보편적인 투여방식인 경구 투여, 복강 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 또는 피내 투여방식으로 수행될 수 있으나 투여방식이 이에 제한되는 것은 아니며 또한 상기 저대사 유도물질은 활성물질로 표적세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [48] 본 발명의 일 양태에서, 저대사 유도물질의 투여횟수는 1일 1회 내지 2회 이상일 수 있으나 이는 저대사 유도물질의 투여용량에 따라 조절될 수 있다.
- [49] 본 발명의 일 양태에서, 근위축 동물모델의 근위축 정도는 저대사 유도물질의 투여용량 또는 저대사 유도물질 체내 노출 시간을 조절하여 조절될 수 있으며 이는 투여용량 또는 체내 노출시간에 비례하여 근위축 정도가 심화되는 것에 근거하여 수행될 수 있다.
- [50]
- [51] 또한 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 근위축 세포모델 또는 동물모델을 제공한다.
- [52] 본 발명의 일 양태에서, 저대사 유도 물질의 투여로 인해 정상과 비교하여 근위축 연구모델은 아래의 (a)부터 (j)까지의 결과를 보일 수 있으며 이는 근육 세포실험을 통하여 확인하였다:
- [53] (a) 근관세포의 크기 또는 근육의 크기 감소;
- [54] (b) *p*-AMPK/AMPK 발현 비율의 증가;
- [55] (c) *p*-Akt1/Akt1 발현 비율의 감소;
- [56] (d) *p*-S6K/S6K 발현 비율의 감소;
- [57] (e) *p*-FoxO1/FoxO1 발현 비율의 감소;
- [58] (f) *p*-FoxO3/FoxO3 발현 비율의 감소;
- [59] (g) MuRF1 발현량의 증가;
- [60] (h) 프로테아좀(proteasome) 활성 증가;
- [61] (i) 열충격 단백질 72(HSP72) 발현량의 감소; 및
- [62] (j) 알파비-크리스탈린(α B-crystallin) 발현량의 감소
- [63] 따라서 상기 근위축 연구모델은 정상과 비교하여 (a) 근관세포의 크기 또는 근육의 크기의 감소; (b) *p*-AMPK/AMPK 발현 비율의 증가; (c) *p*-Akt1/Akt1 발현 비율의 감소; (d) *p*-S6K/S6K 발현 비율의 감소; (e) *p*-FoxO1/FoxO1 발현 비율의 감소; (f) *p*-FoxO3/FoxO3 발현 비율의 감소; (g) MuRF1 발현량의 증가; (h) 프로테아좀(proteasome) 활성 증가; (i) 열충격 단백질 72(HSP72) 발현량의 감소; 및 (j) 알파비-크리스탈린(α B-crystallin) 발현량의 감소로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 특성을 가질 수 있다.

- [64] 본 발명의 일 양태에서, 상기 (a)부터 (j)까지는 저대사 유도물질 투여 후 5 내지 10일 후에 정상과 비교되는 특성일 수 있다.
- [65] 본 발명의 일 양태에서, 저대사 유도물질인 T1MA를 근관세포에 0.1 μ M 내지 1000 μ M 처리하는 경우 상기 (a)와 관련하여 근관세포의 크기는 정상 근관세포의 크기와 비교하여 0.01 내지 0.20배 감소를 가질 수 있다. 상기 (b)와 관련하여 근위축 연구모델의 *p*-AMPK/AMPK 발현 비율은 정상 모델의 *p*-AMPK/AMPK 발현 비율과 비교하여 0.01 내지 2.5배 증가를 가질 수 있다. 상기 (c)와 관련하여 근위축 연구모델의 *p*-Akt1/Akt1 발현 비율은 정상 모델의 *p*-Akt1/Akt1 발현 비율과 비교하여 0.01 내지 1.0배 감소를 가질 수 있다. 상기 (d)와 관련하여 연구모델의 *p*-S6K/S6K 발현 비율은 정상 모델의 *p*-S6K/S6K 발현 비율과 비교하여 0.01 내지 1.0배 감소를 가질 수 있다. 상기 (e)와 관련하여 근위축 연구모델의 *p*-FoxO1/FoxO1 발현 비율은 정상 모델의 *p*-FoxO1/FoxO1 발현 비율과 비교하여 0.01 내지 1.0배 감소를 가질 수 있다. 상기 (f)와 관련하여 근위축 연구모델의 *p*-FoxO3/FoxO3 발현 비율은 정상 모델의 *p*-FoxO3/FoxO3 발현 비율과 비교하여 0.01 내지 0.8배 감소를 가질 수 있다. 상기 (g)와 관련하여 근위축 연구모델의 MuRF1 발현량은 정상 모델의 MuRF1 발현량과 비교하여 0.01 내지 2.5배 증가를 가질 수 있다. 상기 (h)와 관련하여 근위축 연구모델의 프로테아좀(proteasome) 활성은 정상 모델의 프로테아좀(proteasome) 활성과 비교하여 0.01 내지 2.0배 증가를 가질 수 있다. 상기 프로테아좀은 26S 프로테아좀일 수 있으며, 이의 활성은 프로테아좀 활성을 측정하는 방법으로 공지된 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 예컨대 키모트립신(chemotrypsin)-유사 활성을 통하여 분석할 수 있다. 상기 (i)와 관련하여 근위축 연구모델의 열충격 단백질 72(HSP72) 발현량은 정상 모델의 열충격 단백질 72(HSP72) 발현량과 비교하여 0.01 내지 0.15배 감소를 가질 수 있다. 상기 (j)와 관련하여 근위축 연구모델의 알파비-크리스탈린(α B-crystallin) 발현량은 정상 동물의 알파비-크리스탈린(α B-crystallin) 발현량과 비교하여 0.01 내지 1.0배 감소를 가질 수 있다. 상기 (b) 내지 (g) 및 (i) 내지 (j)의 AMPK, phospho-AMPK (*p*-AMPK), FoxO1, *p*-FoxO1, FoxO3, *p*-FoxO3, Akt1, *p*-Akt1, S6K, *p*-S6K, MuRF1, HSP72, 및 알파비-크리스탈린(α B-crystallin)의 발현량은 단백질 분석방법으로 공지된 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 예컨대, 면역블롯팅법(immunoblotting)으로 측정될 수 있다.
- [66]
- [67] 상기 근위축 연구모델은 정확한 근위축 연구를 위한 연구모델로 사용될 수 있지만 또한 근위축 예방 또는 치료약제의 스크리닝을 위한 검증으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [68] 따라서 본 발명은 상기 근위축 연구모델에 후보물질을 처리하는 단계; 상기 후보물질이 처리된 연구모델에서 근위축의 개선 또는 치료 정도를 평가하여 후보물질을 근위축 치료용 약물로 결정하는 단계를 포함하는 근위축 치료용

약물 스크리닝 방법을 제공한다.

[69] 본 발명의 일 양태에서, 상기 후보물질은 근위축을 치료할 수 있는 물질로 화학물질, 올리고뉴클레오타이드, 펩티드, 유전자, 단백질 등의 물질을 제한 없이 포함한다.

[70] 본 발명의 일 양태에서, 상기 근위축의 개선 또는 치료 정도의 평가는 하기 (1)부터 (10)까지 어느 하나 이상의 지표를 대조군의 그것과 비교하는 것일 수 있다:

[71] (1) 근관세포의 크기 또는 근육의 크기;

[72] (2) *p*-AMPK/AMPK 발현 비율;

[73] (3) *p*-Akt1/Akt1 발현 비율;

[74] (4) *p*-S6K/S6K 발현 비율;

[75] (5) *p*-FoxO1/FoxO1 발현 비율;

[76] (6) *p*-FoxO3/FoxO3 발현 비율;

[77] (7) MuRF1의 발현량;

[78] (8) 프로테아좀(proteasome) 활성;

[79] (9) 열충격 단백질 72(HSP72)의 발현량; 및

[80] (10) 알파비-크리스탈린(α B-crystallin)의 발현량.

[81]

[82] 상기 (1) 지표와 관련하여, 후보물질을 처리한 군과 대조군의 근관세포의 크기 변화 또는 근육 크기의 크기 변화를 비교하여 근위축의 개선 또는 치료 정도를 평가할 수 있다. 후보물질을 처리한 군이 대조군과 비교하여 근관세포 또는 근육의 크기가 증가한 경우 근위축 치료용 약물로 판단될 수 있다.

[83] 상기 (2) 지표와 관련하여, 후보물질을 처리한 군과 대조군의 *p*-AMPK/AMPK 발현 비율을 비교하여 근위축의 개선 또는 치료 정도를 평가할 수 있다.

후보물질을 처리한 군이 대조군과 비교하여 *p*-AMPK/AMPK 발현 비율이 감소한 경우 근위축 치료용 약물로 판단될 수 있다.

[84] 상기 (3) 지표와 관련하여, 후보물질을 처리한 군과 대조군의 *p*-Akt1/Akt1 발현 비율을 비교하여 근위축의 개선 또는 치료 정도를 평가할 수 있다. 후보물질을 처리한 군이 대조군과 비교하여 *p*-Akt1/Akt1 발현 비율이 증가한 경우 근위축 치료용 약물로 판단될 수 있다.

[85] 상기 (4) 지표와 관련하여, 후보물질을 처리한 군과 대조군의 *p*-S6K/S6K 발현 비율을 비교하여 근위축의 개선 또는 치료 정도를 평가할 수 있다. 후보물질을 처리한 군이 대조군과 비교하여 *p*-S6K/S6K 발현 비율이 증가한 경우 근위축 치료용 약물로 판단될 수 있다.

[86] 상기 (5) 지표와 관련하여, 후보물질을 처리한 군과 대조군의 *p*-FoxO1/FoxO1 발현 비율을 비교하여 근위축의 개선 또는 치료 정도를 평가할 수 있다. 후보물질을 처리한 군이 대조군과 비교하여 *p*-FoxO1/FoxO1 발현 비율이 증가한 경우 근위축 치료용 약물로 판단될 수 있다.

- [87] 상기 (6) 지표와 관련하여, 후보물질을 처리한 군과 대조군의 *p*-FoxO3/FoxO3 발현 비율을 비교하여 근위축의 개선 또는 치료 정도를 평가할 수 있다. 후보물질을 처리한 군이 대조군과 비교하여 *p*-FoxO3/FoxO3 발현 비율이 증가한 경우 근위축 치료용 약물로 판단될 수 있다.
- [88] 상기 (7) 지표와 관련하여, 후보물질을 처리한 군과 대조군의 MuRF1 발현량을 비교하여 근위축의 개선 또는 치료 정도를 평가할 수 있다. 후보물질을 처리한 군이 대조군과 비교하여 MuRF1의 발현량이 감소한 경우 근위축 치료용 약물로 판단될 수 있다.
- [89] 상기 (8) 지표와 관련하여, 후보물질을 처리한 군과 대조군의 프로테아좀(proteasome) 활성을 비교하여 근위축의 개선 또는 치료 정도를 평가할 수 있다. 후보물질을 처리한 군이 대조군과 비교하여 프로테아좀 활성이 감소한 경우 근위축 치료용 약물로 판단될 수 있다.
- [90] 상기 (9) 지표와 관련하여, 후보물질을 처리한 군과 대조군의 열충격 단백질 72(HSP72) 발현량을 비교하여 근위축의 개선 또는 치료 정도를 평가할 수 있다. 후보물질을 처리한 군이 대조군과 비교하여 열충격 단백질 72(HSP72)의 발현량이 증가한 경우 근위축 치료용 약물로 판단될 수 있다.
- [91] 상기 (10) 지표와 관련하여, 후보물질을 처리한 군과 대조군의 알파비-크리스탈린(α B-crystallin) 발현량을 비교하여 근위축의 개선 또는 치료 정도를 평가할 수 있다. 후보물질을 처리한 군이 대조군과 비교하여 알파비-크리스탈린(α B-crystallin)의 발현량이 증가한 경우 근위축 치료용 약물로 판단될 수 있다.
- [92] 따라서 상기 결정하는 단계는 후보물질을 처리한 군이 대조군과 비교하여 근관세포의 크기 또는 근육의 크기 증가; *p*-AMPK/AMPK 발현 비율 감소; *p*-Akt1/Akt1 발현 비율 증가; *p*-S6K/S6K 발현 비율 증가; *p*-FoxO1/FoxO1 발현 비율 증가; *p*-FoxO3/FoxO3 발현 비율 증가; MuRF1 발현량의 감소; 프로테아좀(proteasome) 활성 감소; 열충격 단백질 72(HSP72) 발현량의 증가; 및 알파비-크리스탈린(α B-crystallin) 발현량의 증가로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 결과인 경우 상기 후보물질을 근위축 치료용 약물로 결정할 수 있다.
- [93] 상기 대조군이란 후보물질 대신 근위축 치료용 약물의 부형제를 처리한 군을 말하며, 예컨대 상기 대조군은 DMSO(dimethyl sulfoxide), 생리식염수, 멸균증류수, 카르복시메틸셀룰로스 또는 PBS(phosphate buffered saline)를 처리한 군일 수 있다.
- [94]
- [95] 본 발명은 또한 정상 세포 또는 정상동물에 후보물질을 처리 또는 투여하는 단계; 상기 세포 또는 동물에 저대사 유도물질을 처리 또는 투여하는 단계; 및 상기 저대사 유도물질이 처리 또는 투여된 세포 또는 동물의 근위축 정도를 평가하여 후보물질을 근위축 예방용 약물로 결정하는 단계를 포함하는 근위축

예방용 약물 스크리닝 방법을 제공한다.

- [96] 본 발명의 일 양태에서, 상기 후보물질은 상설한 바와 같다.
- [97] 본 발명의 일 양태에서, 상기 근위축 정도의 평가는 하기 (1)부터 (10)까지 중 어느 하나 이상의 지표를 대조군의 그것과 비교하는 것일 수 있다:
- [98] (1) 근관세포의 크기 또는 근육의 크기;
- [99] (2) *p*-AMPK/AMPK 발현 비율;
- [100] (3) *p*-Akt1/Akt1 발현 비율;
- [101] (4) *p*-S6K/S6K 발현 비율;
- [102] (5) *p*-FoxO1/FoxO1 발현 비율;
- [103] (6) *p*-FoxO3/FoxO3 발현 비율;
- [104] (7) MuRF1의 발현량;
- [105] (8) 프로테아좀(proteasome) 활성;
- [106] (9) 열충격 단백질 72(HSP72)의 발현량; 및
- [107] (10) 알파비-크리스탈린(α B-crystallin)의 발현량.
- [108]
- [109] 상기 (1) 지표와 관련하여, 후보물질을 처리한 군과 대조군의 근관세포의 크기 변화 또는 근육 크기의 크기 변화를 비교하여 근위축의 정도를 평가할 수 있다. 후보물질을 처리한 군이 대조군과 비교하여 근관세포 또는 근육의 크기가 증가한 경우 근위축 예방용 약물로 판단될 수 있다.
- [110] 상기 (2) 지표와 관련하여, 후보물질을 처리한 군과 대조군의 *p*-AMPK/AMPK 발현 비율을 비교하여 근위축의 정도를 평가할 수 있다. 후보물질을 처리한 군이 대조군과 비교하여 *p*-AMPK/AMPK 발현 비율이 감소한 경우 근위축 예방용 약물로 판단될 수 있다.
- [111] 상기 (3) 지표와 관련하여, 후보물질을 처리한 군과 대조군의 *p*-Akt1/Akt1 발현 비율을 비교하여 근위축의 정도를 평가할 수 있다. 후보물질을 처리한 군이 대조군과 비교하여 *p*-Akt1/Akt1 발현 비율이 증가한 경우 근위축 예방용 약물로 판단될 수 있다.
- [112] 상기 (4) 지표와 관련하여, 후보물질을 처리한 군과 대조군의 *p*-S6K/S6K 발현 비율을 비교하여 근위축의 정도를 평가할 수 있다. 후보물질을 처리한 군이 대조군과 비교하여 *p*-S6K/S6K 발현 비율이 증가한 경우 근위축 예방용 약물로 판단될 수 있다.
- [113] 상기 (5) 지표와 관련하여, 후보물질을 처리한 군과 대조군의 *p*-FoxO1/FoxO1 발현 비율을 비교하여 근위축의 정도를 평가할 수 있다. 후보물질을 처리한 군이 대조군과 비교하여 *p*-FoxO1/FoxO1 발현 비율이 증가한 경우 근위축 예방용 약물로 판단될 수 있다.
- [114] 상기 (6) 지표와 관련하여, 후보물질을 처리한 군과 대조군의 *p*-FoxO3/FoxO3 발현 비율을 비교하여 근위축의 정도를 평가할 수 있다. 후보물질을 처리한 군이 대조군과 비교하여 *p*-FoxO3/FoxO3 발현 비율이 증가한 경우 근위축 예방용

약물로 판단될 수 있다.

- [115] 상기 (7) 지표와 관련하여, 후보물질을 처리한 군과 대조군의 MuRF1 발현량을 비교하여 근위축의 정도를 평가할 수 있다. 후보물질을 처리한 군이 대조군과 비교하여 MuRF1의 발현량이 감소한 경우 근위축 예방용 약물로 판단될 수 있다.
- [116] 상기 (8) 지표와 관련하여, 프로테아좀(proteasome) 활성측정은 상설한 (h)와 같으며, 후보물질을 처리한 군과 대조군의 프로테아좀(proteasome) 활성을 비교하여 근위축의 정도를 평가할 수 있다. 후보물질을 처리한 군이 대조군과 비교하여 프로테아좀 활성이 감소한 경우 근위축 예방용 약물로 판단될 수 있다.
- [117] 상기 (9) 지표와 관련하여, 후보물질을 처리한 군과 대조군의 열충격 단백질 72(HSP72) 발현량을 비교하여 근위축의 정도를 평가할 수 있다. 후보물질을 처리한 군이 대조군과 비교하여 열충격 단백질 72(HSP72)의 발현량이 증가한 경우 근위축 예방용 약물로 판단될 수 있다.
- [118] 상기 (10) 지표와 관련하여, 후보물질을 처리한 군과 대조군의 알파비-크리스탈린(α B-crystallin) 발현량을 비교하여 근위축의 정도를 평가할 수 있다. 후보물질을 처리한 군이 대조군과 비교하여 알파비-크리스탈린(α B-crystallin)의 발현량이 증가한 경우 근위축 예방용 약물로 판단될 수 있다.
- [119] 상기 (2) 내지 (7) 및 (9) 내지 (10)의 AMPK, phospho-AMPK (*p*-AMPK), FoxO1, *p*-FoxO1, FoxO3, *p*-FoxO3, Akt1, *p*-Akt1, S6K, *p*-S6K, MuRF1, HSP72, 및 알파비-크리스탈린(α B-crystallin) 단백질의 발현량은 단백질 분석방법으로 공지된 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 예컨대, 면역블롯팅법(immunoblotting)으로 측정될 수 있다.
- [120] 따라서 상기 결정하는 단계는 후보물질을 처리한 군이 대조군과 비교하여 근관세포의 크기 또는 근육의 크기 증가; *p*-AMPK/AMPK 발현 비율 감소; *p*-Akt1/Akt1 발현 비율 증가; *p*-S6K/S6K 발현 비율 증가; *p*-FoxO1/FoxO1 발현 비율 증가; *p*-FoxO3/FoxO3 발현 비율 증가; MuRF1 발현량의 감소; 프로테아좀(proteasome) 활성 감소; 열충격 단백질 72(HSP72) 발현량의 증가; 및 알파비-크리스탈린(α B-crystallin) 발현량의 증가로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 결과인 경우 상기 후보물질을 근위축 예방용 약물로 결정할 수 있다.
- [121] 상기 대조군이란 후보물질 대신 근위축 예방용 약물의 부형제를 처리한 군을 말하며, 예컨대 상기 대조군은 DMSO(dimethyl sulfoxide), 생리식염수, 멸균증류수, 카르복시메틸셀룰로스 또는 PBS(phosphate buffered saline)를 처리한 군일 수 있다.
- [122]
- [123] 본 명세서에서의 정상세포 또는 정상동물은 근위축이 발생하지 않은 세포 또는 동물을 의미한다. 예컨대, 동물의 경우, 근위축 모델과 같은 종이며 동일 또는 유사한 환경에서 사육된 근위축이 발생하지 않은 동물일 수 있다.

[124]

[125] 본 발명은 또한 T1AM(3-iodothyronamine), DADLE([D-Ala2,D-Leu5] enkephalin), 5'-AMP(5'-adenosine monophosphate) 및 H₂S(hydrogen sulfide)로 이루어진 그룹에서 선택되는 저대사(hypometabolism) 유도물질을 유효성분으로 함유하는 근비대증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[126] 본 발명의 일 양태에서, 상기 저대사 유도물질은 보다 구체적으로 T1AM(3-iodothyronamine)일 수 있다.

[127] 본 발명의 일 양태에서, 상기 근비대증은 선천적 근육강직증(myotonia congenita), 종아리 비대증(calf hypertrophy), 마이어증후군(myhre syndrome), 마이오스타틴 관련 근비대증(Myostatin-related muscle hypertrophy)이다.

[128] 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 저대사 유도물질은 근단백질 합성에 관여하는 Akt1-S6K의 활성을 억제하고 근단백질 분해에 관여하는 FoxO-proteasome을 활성화 시킴으로써 근위축증을 유도기 때문에, myostatin의 역할을 대체할 수 있는 약물로서 활용 가능하며, myostatin의 결합으로 인해 발생하는 마이오스타틴 관련 근비대증(Myostatin-related muscle hypertrophy)을 포함하는 다양한 근비대증 치료에 사용될 수 있다.

[129]

[130] 본 발명은 본 발명의 저대사 유도물질뿐만 아니라, 이의 약학적으로 허용되는 염, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 라세미체, 또는 입체이성질체를 모두 포함한다.

[131] 본 발명의 저대사 유도물질은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트,

하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[132]

[133] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 본 발명의 저대사 유도물질을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시켜서 건조하거나 또는 석출 된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[134]

[135] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[136]

[137] 상기 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.

[138]

경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 저대사 유도물질에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[139]

비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다.

[140]

비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[141]

[142] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여

경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[143] 구체적으로, 본 발명에 따른 화합물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.1 mg 내지 100 mg, 바람직하게는 0.5 mg 내지 10 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[144]

[145] 본 발명은 또한 T1AM(3-iodothyronamine), DADLE([D-Ala2,D-Leu5] enkephalin), 5'-AMP(5'-adenosine monophosphate) 및 H₂S(hydrogen sulfide)로 이루어진 그룹에서 선택되는 저대사(hypometabolism) 유도물질을 유효성분으로 함유하는 근비대증 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.

[146] 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 저대사 유도물질은 근단백질 합성에 관여하는 Akt1-S6K의 활성을 억제하고 근단백질 분해에 관여하는 FoxO-proteasome을 활성화 시킴으로써 근위축증을 유도기 때문에, myostatin의 역할을 대체할 수 있는 약물로서 활용 가능하며, myostatin의 결합으로 인해 발생하는 마이오스타틴 관련 근비대증(Myostatin-related muscle hypertrophy)을 포함하는 다양한 근비대증 예방 및 개선용 건강식품에 사용될 수 있다.

[147]

[148] 본 발명의 저대사 유도물질이 첨가되는 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[149] 본 발명의 저대사 유도물질은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강기능식품 중의 상기 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

- [150] 본 발명에 따른 건강식품 조성물이 음료 조성물인 경우, 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 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 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 10 g이다.
- [151] 또한, 본 발명에 따른 건강식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 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. 그 밖에 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [152] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 제한되지 않으나, 본 발명의 저대사 유도물질 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [153]
- [154] 또한, 본 발명은 본 발명의 저대사 유도물질을 유효성분으로 함유하는 안면 근육 축소용 약학적 조성물을 제공한다.
- [155] 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 저대사 유도물질은 근단백질 합성에 관여하는 Akt1-S6K의 활성을 억제하고 근단백질 분해에 관여하는 FoxO-proteasome을 활성화 시킴으로써 근위축을 유도하므로, 보톡스 용도로 사용될 수 있는 안면 근육 축소용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.
- [156]
- [157] 이하, 본 발명에 따르는 실험예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실험예 등에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [158]
- [159] **[실험예]**
- [160] **1. 실험 물질 및 방법**
- [161] **1) 화학물질 및 저장용액**
- [162] T1AM은 화학적으로 합성(국내등록특허 제1,112,731호)하여 디메틸 설펡사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO; SIGMA, Missouri, US)에 0.75 및 1 M 저장농도로 녹여 사용하였다. DMEM(Welgene, Dalseogu, Daegu, Korea) 배지를 사용하였으며, 노니덱 P-40(nonidet P-40), 프로테아제 억제제(Complete Mini

protease inhibitor), 및 포스파타제 억제제 콕테일(phosphatase inhibitor cocktail)은 Roche에서 구입해 사용하였다. RIPA 완충액(1% Nonidet P-40, 1% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate [pH 7.4], 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 0.2 mM Na_3VO_4 , 40 mM HEPES[pH 7.4], 0.7% CHAPS, 1% SDS, and protease inhibitor cocktail)은 단백질을 추출을 위하여 사용하였다. GE Healthcare (Fairfield, CT, USA)에서 구입해 4에서 보관된 ECL 시스템 및 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입한 Restore Western Blot Stripping Buffer는 면역블롯 분석(Immunoblot analysis)을 위하여 사용하였다. 토끼 항-포스포-AMPK(Rabbit anti-phospho-AMPK (at Thr172)), AMPK, 포스포-폭스오1(phospho-FoxO1 (Ser256)), 폭스오1(FoxO1), 포스포 폭스오3(phospho-FoxO3 (Ser253)), 폭스오3(FoxO3), HSP27, 알파비-크리스탈린(α B-crystallin), 포스포-에스6케이(phospho-S6K (Thr389)), 에스6케이(S6K), 포스포-에이케이티1(phospho-Akt1 (Ser473)), 및 Akt1 다클론 항체(Akt1 polyclonal antibodies)는 셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology, Beverly, CA, USA)에서 구입해 사용하였다. 토끼 항-근육 링-핑거 단백질-1(rabbit anti-muscle RING-finger protein-1 (MuRF1)) 및 에프-박스 온니 단백질 32 다클론 항체(F-Box Only Protein 32 (MAFbx/atrogen1) polyclonal antibody)는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입해 사용하였고 마우스 항-열충격 단백질 90, 72, 60 (mouse anti-heat shock protein(HSP) 90, 72, 및 60)은 Stressgen (Victoria, BC, Canada)에서 구입해 사용하였다. 마우스 항-글리세르알데하이드-3-포스페이트-디하이드로제아제 항체(mouse anti-glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibodies)는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였고 에이치알피-컨쥬게이티드 항마우스 면역글로불린 G(HRP-conjugated anti-mouse IgG) 및 항-토끼 면역글로불린 G(anti-rabbit IgG)는 Cell Signaling Technology에서 구입해 사용하였다.

[163]

[164] 2) 세포배양

[165] C2C12 근아세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입해 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, Hyclone, Logan, UT, USA)이 보충된 4,500 mg/L 글루코스 및 1% 항생제(antibiotics)/항진균제(antimycotics)(Gibco, Burlington, Ontario, Canada)가 함유된 DMEM 배지에서 배양되었다. 근아세포는 37°C, 5% CO_2 의 조건하에서 보관되었다. 근아세포는 6웰 배양 플레이트에서 면역블롯 분석(Immunoblot analysis) 및 근관세포 직경 측정을 위해 자랐다. 근아세포는 각 웰에 약 80% 포화(confluent) 상태일 때 분화 배지(2% 말(horse) 혈청 및 1% 항생제(antibiotics)/항진균제(antimycotics)가 포함된 DMEM)로 교체해 5일 동안 유지해 근관세포로 분화되도록 유도하였다. 배지는 새 배지로 이틀마다 교체하였다.

[166]

[167] 3) 세포 크기 측정

[168] C2C12 근관세포 크기에 대한 T1AM의 효과를 확인하기 위하여 세포를 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정시킨 후 Axiovert 200 광학현미경에서 200배 확대로 촬영했다. 분석을 위하여 무작위로 세포들을 선택하기 위해 9개의 분획으로 나누었다. 각 근관세포의 직경은 Image J software (NIH, Frederick, MD, USA)를 사용하여 측정되었다.

[169]

[170] 4) 면역블롯 분석(Immunoblot analysis)

[171] 세포는 RIPA 완충액으로 수득된 다음 21 게이지(gauge) 바늘을 통한 반복적 흡인에 의해 분해되어 1.5 mL 마이크로튜브로 옮겨졌다. 샘플은 5분 동안 얼음에서 배양하고 10분 동안 4°C에서 13,000 rpm으로 원심분리하였다. 전체-세포 가용성 용해물(soluble lysates)로 상층액을 수득하고, 단백질 농도는 브래드포드 분석(Bradford assay)을 통하여 결정하였다. AMPK, phospho-AMPK (*p*-AMPK), FoxO1, *p*-FoxO1, FoxO3, *p*-FoxO3, Akt1, *p*-Akt1, S6K, *p*-S6K, MuRF1, MAFbx, HSP90, HSP72, HSP60, HSP27, α B-crystallin, 및 GAPDH를 탐지하기 위하여 전체 30 μ g 단백질을 8 내지 10% SDS-PAGE 상에서 전기영동 하였다.

[172] 단백질은 전기영동으로 겔에서 니트로셀룰로소막(nitrocellulose membrane)으로 옮겨졌다. 막을 블로킹 완충액(1X TBS, 0.5% Tween-20 with 5% w/v nonfat dry milk)으로 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 10 mL TBST로 10분씩 3번 세척했다. 이후 막을 10 mL TBST(1:500-1:10,000)에 적절히 희석한 1차 항체(primary antibody)와 함께 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 10 mL TBST 내에 결합된 단백질을 탐지하기 위한 HRP-컨쥬게이트드 2차 항체(secondary antibody)와 함께 막을 1시간 동안 실온에서 교반하여 반응시킨 후 10 mL TBST로 10분씩 3번 세척했다. 면역 복합체는 ECL 시스템(GE Healthcare, Fairfield, CT, USA)으로 검지되고 획득된 밴드는 ImageJ 1.47t software (NIH, MD, USA)에 의해 정량되었다. 단백질 밀도는 GAPDH의 밀도에 의해 표준화되었다. GAPDH를 검지하기 위하여 막을 TBST로 각 10분 동안 3회 세척한 후 실온에서 30분 동안 리스토어 완충액(restore buffer)에서 배양하여 스트립 되게 하였다.

[173]

[174] 5) 면역형광염색법(Immunofluorescence) 및 공초점 현미경(Confocal Microscope)

[175] 각 6-웰 플레이트의 세포를 1X PBS로 3번 세척한 후 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 30분 동안 실온에서 고정시켰다. 그 다음 세포를 0.2% Triton X-100로 얼음에서 10분 동안 처리하여 투과성을 확보하고 1X PBS에서 3% BSA로 블로킹(block)시켰다. 1X PBS에서 1:100으로 희석된 FoxO1 및 FoxO3에 대한 일차 항체로 세포를 각각 염색시키고, 1:1,000으로 희석된 Alexa 488-컨쥬게이트드 2차 항체와 반응시켰다. 끝으로 세포를 1X PBS로 3번 세척한 다음 DAPI(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 포함한 마운팅 미디엄(mounting medium)을 세포에 떨어뜨렸다.

형광으로 표지된 세포는 Carl Zeiss LSM750 공초점 현미경(Jena, Germany)으로 검지되었다.

[176]

[177] **6) 26S 프로테아좀(Proteasome) 활성 분석**

[178] 근관세포의 두 그룹을 트립신화한 후 신선한 분화배지로 세척하였다. 프로테아좀 활성(트립신(trypsin)-, 키모트립신(chemotrypsin)- 및 캐스파제(caspase)-유사 활성들)의 세 가지 결정인자 중 키모트립신(chemotrypsin)-유사 활성은 프로테아좀의 단백질 분해 효소 용량을 나타내는 대표적인 것으로 간주된다. 분화배지 50 μ l에 있는 세포 카운터(Biorad, Hercules, CA, USA) 로 측정된 약 7,500세포를 사용하여 Promega Proteasome-Glo 세포 기반 발광분석 키트(Promega, Madison, WI, USA)를 이용해 제조자 프로토콜에 따라 키모트립신(chemotrypsin)-유사 활성을 결정하였다. 분석의 특이성을 확인하기 위하여 동일한 수의 세포를 포함하는 부분 표본을 프로테아좀 억제제인 에폭소미신(epoxomicin)을 10 μ M 농도로 30분 동안 미리 처리하였다. 키모트립신(chemotrypsin)-유사 활성은 동일한 과정으로 측정되었으며 결과는 분석을 위한 백그라운드 신호(background signal)로 사용되었다. 발광은 GloMax 20/20 Luminometer (Promega)로 측정되었다.

[179]

[180] **7) 통계분석**

[181] 측정결과에 해당하는 모든 수치는 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었다. 생화학적 측정(예 AMPK, Akt1 등)의 수단에서 집단 간 차이는 독립 표본 t-검정(independent sample t-test)으로 검증하였다. 통계 분석은 SPSS/PC+를 이용하였으며, $P = 0.05$ 에서 유의성을 판단하였다.

[182]

[183] **2. 실험 결과**

[184] **1) 근육세포에서 T1AM의 근위축 효과**

[185] C2C12 근관세포에서 T1AM가 근위축을 유도했는지 여부를 확인하기 위하여 위상차현미경(phase contrast microscope) 하에서 세포들을 촬영(도 1A)하였고 200배 확대율에서 직경을 측정(도 1B)하였다.

[186] 그 결과 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이 비히클 대조군(16.97 ± 0.32 m)에 비하여 75 μ M T1AM을 6시간 동안 처리하였을 때 근관세포의 크기는 0.13배 감소한 것으로 나타났다.

[187]

[188] **2) T1AM 처리된 세포에서 AMPK 인산화 상승**

[189] 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이 면역블롯팅 분석에서 T1AM 처리군에서 대조군에 비하여 AMPK 인산화가 확연하게 증가되는 것(2.7배)으로 나타난 반면 두 그룹 간 전체 AMPK 발현 수준은 유사한 것으로 나타났다. 결과적으로 p -AMPK/AMPK 발현 비율은 대조군에 비하여 T1AM 처리군에서 2.0배 높은

것으로 나타났다(도 2c).

[190]

[191] **3) T1AM 처리된 세포에서 동화작용 신호전달 활성의 하향조절**

[192] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이 Akt1의 인산화 수준은 대조군에 비하여 T1AM 처리군에서 크게 하향 조절된 반면 두 그룹 간 비인산화 수준은 유사한 것으로 나타났다. 따라서 *p*-Akt1/Akt1 발현 비율은 대조군에 비하여 T1AM 처리군에서 0.45배 낮게 나타났다(도 3C). 또한 *p*-S6K 수준은 T1AM 처리에 의해 낮아지는 것으로 나타났으며 그 결과 *p*-S6K/S6K 발현 비율은 대조군에 비하여 T1AM 처리군에서 0.53배 낮은 것으로 나타났다(도 3E).

[193]

[194] **4) T1AM 처리된 세포에서 *p*-FoxO1 및 *p*-FoxO3의 하향조절**

[195] 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이 FoxO1의 전체 발현은 대조군에 비하여 T1AM 처리군에서 2.5배 증가한 반면 (Ser256에서) 두 그룹 간 인산화 수준은 유사한 것으로 나타났다. *p*-FoxO1/FoxO1 발현 비율은 T1AM 처리군에서 0.66 배 낮은 것으로 나타났다(도 4D). 한편 FoxO3의 전체 발현은 T1AM 처리군과 대조군에서 서로 차이가 없었으나 *p*-FoxO3 수준은 T1AM 처리군에서 0.58배 낮게 나타났다. 따라서 *p*-FoxO3/FoxO3 발현 비율은 대조군에 비하여 T1AM 처리군에서 0.39배 감소한 결과를 나타내었다(도 4F).

[196]

[197] **5) MuRF1 발현 및 프로테아좀 활성의 상향조절**

[198] 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이 시험된 이화작용 신호전달 마커들 중에서 MuRF1의 발현은 대조군에 비하여 T1AM 처리군에서 1.8배 증가(도 5A 및 5B)한 반면 MAFbx의 발현은 T1AM 처리에 영향을 받지 않았다(도 5A 및 5C). 프로테아좀의 주요한 이화작용 특성의 하나인 키모트립신-유사 활성은 대조군에 비하여 T1AM 처리군에서 1.5배 증가한 것으로 나타났다(도 5D).

[199]

[200] **6) T1AM 처리된 세포에서 HSP72 및 알파비-크리스탈린(α B-crystallin)의 발현 감소**

[201] 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이 HSP72 및 알파비-크리스탈린(α B-crystallin)의 발현 수준은 대조군에 비하여 T1AM 처리군에서 각각 0.89배 및 0.63배 하향 조절된 것으로 나타난 반면 HSP60 발현에서 두 그룹 간 차이는 통계적으로 유의하지 않은 것으로 나타났다.

[202]

[203] **3. 결론**

[204] FoxOs의 활성은 AMPK 및 Akt1의 길항 효과에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 즉, *p*-FoxO/FoxO 발현 비율의 감소는 상향 조절된 *p*-AMPK와 상응하고 하향 조절된 *p*-Akt1와 상응한다. 이는 이화작용의 하나로 단백질 분해를 유도한다. 상기 실험결과를 통하여 확인할 수 있는 바와 같이 T1AM 매개

저대사에 의해 근단백질 분해 기전에 관여하는 AMPK, FoxO1, FoxO3, MuRF1 및 프로테아좀(proteasome)이 활성화된 반면 근단백질 합성 기전에 관여하는 AKt1, S6K, 열충격 단백질 72(HSP72), 및 알파비-크리스탈린(α B-crystallin)이 불활성화되는 것으로 나타났다. 따라서 본 발명에 따른 저대사 유도물질 특히 T1AM이 저대사를 유도하여 에너지 대사가 억제됨에 따라 이화작용이 활성화되어 근단백질 분해기전과 관련된 단백질은 활성화되고 근단백질 합성기전과 관련된 단백질은 억제됨으로써 근원세포의 크기가 줄어든다는 것을 확인하였다.

청구범위

- [청구항 1] T1AM(3-iodothyronamine), DADLE([D-Ala2,D-Leu5] enkephalin), 5'-AMP(5'-adenosine monophosphate) 및 H₂S(hydrogen sulfide)로 이루어진 그룹에서 선택되는 저대사(hypometabolism) 유도물질들 유효성분으로 포함하는, 세포 또는 동물모델을 포함하는 연구모델용 근위축 유도제.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 저대사 유도물질은 T1AM(3-iodothyronamine)인 근위축 유도제.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 연구모델에서 세포는 근세포이고, 동물모델에서 동물은 척추동물인 근위축 유도제.
- [청구항 4] 정상 세포 또는 정상 동물에 T1AM(3-iodothyronamine), DADLE([D-Ala2,D-Leu5] enkephalin), 5'-AMP(5'-adenosine monophosphate) 및 H₂S(hydrogen sulfide)로 이루어진 그룹에서 선택되는 저대사(hypometabolism) 유도물질들 투여하여 근위축을 유발하는 단계를 포함하는 근위축 연구모델 제조방법.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 저대사 유도물질은 T1AM(3-iodothyronamine)인 근위축 연구모델 제조방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 T1AM(3-iodothyronamine)의 투여용량은,
세포의 경우 0.1 μ M ~ 1000 μ M이고,
동물의 경우 동물의 단위체중(kg)당 10 내지 500 mg/kg인 근위축 연구모델 제조방법.
- [청구항 7] 제4항에 있어서,
상기 저대사 유도물질의 투여방식은 경구 투여, 복강 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 및 피내 투여로 이루어진 그룹에서 선택되는 투여 방식인 근위축 동물모델 제조방법.
- [청구항 8] 제4항에 있어서,
상기 연구모델에서 세포는 근세포이고, 동물은 척추동물인 것을 특징으로 하는 근위축 동물모델 제조방법.
- [청구항 9] 제4항에 있어서,
상기 저대사 유도물질의 투여용량; 또는
저대사 유도물질의 체내 노출 시간에 비례하여 근위축 정도를 조절하는 것을 특징으로 하는 근위축 연구모델 제조방법.
- [청구항 10] 제4항의 방법에 의하여 제조된 근위축 연구모델로서, 정상과 비교하여, 근관세포의 크기 또는 근육의 크기 감소;
p-AMPK/AMPK 발현 비율의 증가;

p-Akt1/Akt1 발현 비율의 감소;
p-S6K/S6K 발현 비율의 감소;
p-FoxO1/FoxO1 발현 비율의 감소;
p-FoxO3/FoxO3 발현 비율의 감소;
 MuRF1 발현량의 증가;
 프로테아좀(proteasome) 활성 증가;
 열충격 단백질 72(HSP72) 발현량의 감소; 및
 알파비-크리스탈린(α B-crystallin) 발현량의 감소로 이루어진 군으로부터
 선택되는 1종 이상의 특성을 갖는 근위축 연구모델.

[청구항 11]

제10항에 있어서,
 저대사 유도물질인 T1AM(3-iodothyronamine)을
 0.1 μ M 내지 1000 μ M 처리하는 경우,
 상기 근위축 연구모델은 정상과 비교하여,
 근관세포 크기의 0.01 내지 0.20배 감소;
p-AMPK/AMPK 발현 비율의 0.5 내지 2.5배 증가;
p-Akt1/Akt1 발현 비율의 0.1 내지 1.0배 감소;
p-S6K/S6K 발현 비율의 0.1 내지 1.0배 감소;
p-FoxO1/FoxO1 발현 비율의 0.1 내지 1.5배 감소;
p-FoxO3/FoxO3 발현 비율의 0.1 내지 0.8배 감소;
 MuRF1 발현량의 0.1 내지 2.5배 증가;
 프로테아좀(proteasome) 활성의 0.01 내지 2.0배 증가;
 열충격 단백질 72(HSP72) 발현량의 0.01 내지 0.15배 감소; 및
 알파비-크리스탈린(α B-crystallin) 발현량의 0.01 내지 1.0배 감소로
 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 특성을 갖는 근위축 연구모델.

[청구항 12]

(a) 제10항에 따른 연구모델에 후보물질을 처리하는 단계; 및
 (b) 상기 후보물질이 처리된 연구모델에서 근위축의 개선 또는 치료
 정도를 평가하는 단계; 및
 (c) 후보물질을 근위축 치료용 약물로 결정하는 단계를 포함하는 근위축
 치료용 약물 스크리닝 방법.

[청구항 13]

제12항에 있어서,
 상기 단계(c)는 후보물질을 처리한 군이 DMSO, 생리식염수, 멸균증류수,
 카르복시메틸셀룰로스 또는 PBS(phosphate buffered saline)를 처리한
 대조군과 비교하여,
 근관세포의 크기 또는 근육의 크기 증가;
p-AMPK/AMPK 발현 비율의 감소;
p-Akt1/Akt1 발현 비율의 증가;
p-S6K/S6K 발현 비율의 증가;
p-FoxO1/FoxO1 발현 비율의 증가;

p-FoxO3/FoxO3 발현 비율의 증가;
 MuRF1 발현량의 감소;
 프로테아좀(proteasome) 활성 감소;
 열충격 단백질 72(HSP72) 발현량의 증가; 및
 알파비-크리스탈린(α B-crystallin) 발현량의 증가로 이루어진 군으로부터
 선택되는 1종 이상의 결과를 나타내는 경우 상기 후보물질을 근위축
 치료용 약물로 결정하는 것을 특징으로 하는 근위축 치료용 약물
 스크리닝 방법.

- [청구항 14] (a) 정상 세포 또는 정상동물에 후보물질을 처리하는 단계;
 (b) 상기 세포 또는 동물에 저대사 유도물질을 투여하는 단계; 및
 (c) 상기 저대사 유도물질이 투여된 세포 또는 동물의 근위축 정도를
 평가하여 후보물질을 근위축 예방용 약물로 결정하는 단계를 포함하는
 근위축 예방용 약물 스크리닝 방법.

- [청구항 15] 제14항에 있어서,
 상기 단계(c)는 후보물질을 처리한 군이 후보물질 대신에 생리식염수,
 멸균증류수, 카르복시메틸셀룰로스 또는 PBS(phosphate buffered saline)를
 처리한 대조군과 비교하여,
 근관세포의 크기 또는 근육의 크기 증가;
p-AMPK/AMPK 발현 비율의 감소;
p-Akt1/Akt1 발현 비율의 증가;
p-S6K/S6K 발현 비율의 증가;
p-FoxO1/FoxO1 발현 비율의 증가;
p-FoxO3/FoxO3 발현 비율의 증가;
 MuRF1 발현량의 감소;
 프로테아좀(proteasome) 활성 감소;
 열충격 단백질 72(HSP72) 발현량의 증가; 및
 알파비-크리스탈린(α B-crystallin) 발현량의 증가로 이루어진 군으로부터
 선택되는 1종 이상의 결과를 나타내는 경우 상기 후보물질을 근위축
 예방용 약물로 결정하는 것을 특징으로 하는 근위축 예방용 약물
 스크리닝 방법.

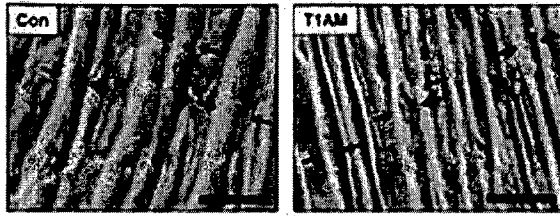
- [청구항 16] T1AM(3-iodothyronamine), DADLE([D-Ala2,D-Leu5] enkephalin),
 5'-AMP(5'-adenosine monophosphate) 및 H₂S(hydrogen sulfide)로 이루어진
 그룹에서 선택되는 저대사(hypometabolism) 유도물질을 유효성분으로
 포함하는 근비대증(muscle hypertrophy) 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

- [청구항 17] T1AM(3-iodothyronamine), DADLE([D-Ala2,D-Leu5] enkephalin),
 5'-AMP(5'-adenosine monophosphate) 및 H₂S(hydrogen sulfide)로 이루어진
 그룹에서 선택되는 저대사(hypometabolism) 유도물질을 유효성분으로
 포함하는 근비대증(muscle hypertrophy) 예방 또는 개선용 건강식품.

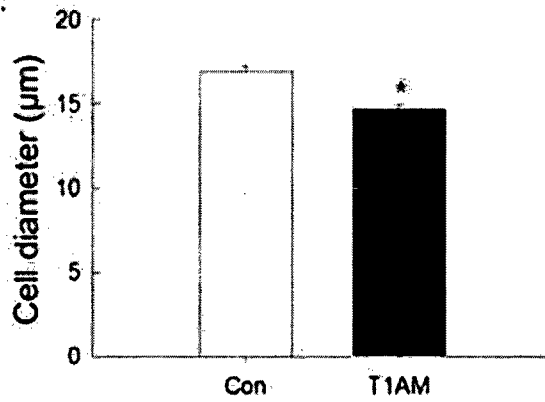
- [청구항 18] T1AM(3-iodothyronamine), DADLE([D-Ala2,D-Leu5] enkephalin), 5'-AMP(5'-adenosine monophosphate) 및 H₂S(hydrogen sulfide)로 이루어진 그룹에서 선택되는 저대사(hypometabolism) 유도물질을 유효성분으로 포함하는 안면 근육 축소용 조성물.
- [청구항 19] 약학적으로 유효한 양의 T1AM(3-iodothyronamine), DADLE([D-Ala2,D-Leu5] enkephalin), 5'-AMP(5'-adenosine monophosphate) 및 H₂S(hydrogen sulfide)로 이루어진 그룹에서 선택되는 저대사(hypometabolism) 유도물질을 근비대증에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 근비대증 치료 방법.
- [청구항 20] 약학적으로 유효한 양의 T1AM(3-iodothyronamine), DADLE([D-Ala2,D-Leu5] enkephalin), 5'-AMP(5'-adenosine monophosphate) 및 H₂S(hydrogen sulfide)로 이루어진 그룹에서 선택되는 저대사(hypometabolism) 유도물질을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 근비대증 예방 방법.
- [청구항 21] 약학적으로 유효한 양의 T1AM(3-iodothyronamine), DADLE([D-Ala2,D-Leu5] enkephalin), 5'-AMP(5'-adenosine monophosphate) 및 H₂S(hydrogen sulfide)로 이루어진 그룹에서 선택되는 저대사(hypometabolism) 유도물질을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 안면 근육 축소 방법.
- [청구항 22] 근비대증 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한 T1AM(3-iodothyronamine), DADLE([D-Ala2,D-Leu5] enkephalin), 5'-AMP(5'-adenosine monophosphate) 및 H₂S(hydrogen sulfide)로 이루어진 그룹에서 선택되는 저대사(hypometabolism) 유도물질의 용도.
- [청구항 23] 근비대증 예방 및 개선용 건강식품으로 사용하기 위한 T1AM(3-iodothyronamine), DADLE([D-Ala2,D-Leu5] enkephalin), 5'-AMP(5'-adenosine monophosphate) 및 H₂S(hydrogen sulfide)로 이루어진 그룹에서 선택되는 저대사(hypometabolism) 유도물질의 용도.
- [청구항 24] 안면 근육 축소용 조성물로 사용하기 위한 T1AM(3-iodothyronamine), DADLE([D-Ala2,D-Leu5] enkephalin), 5'-AMP(5'-adenosine monophosphate) 및 H₂S(hydrogen sulfide)로 이루어진 그룹에서 선택되는 저대사(hypometabolism) 유도물질의 용도.

[도1]

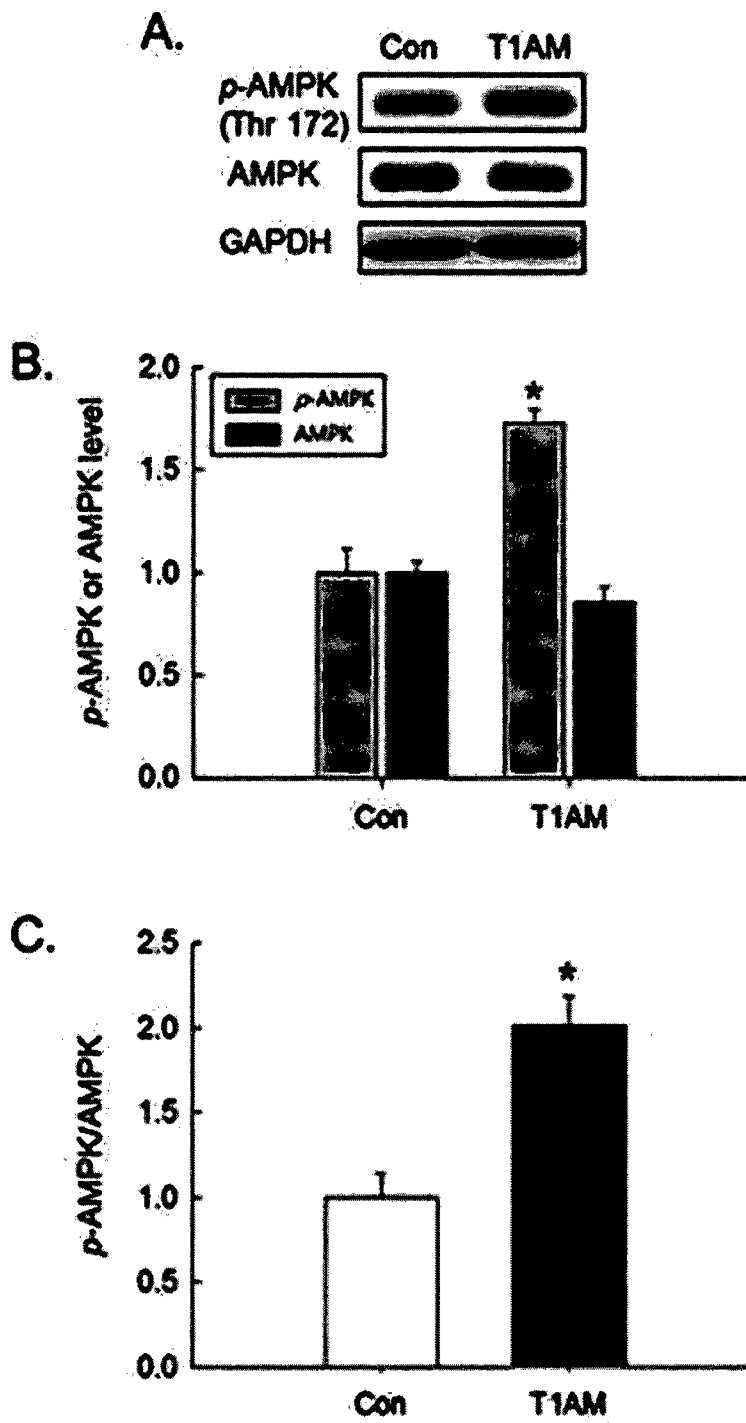
A.



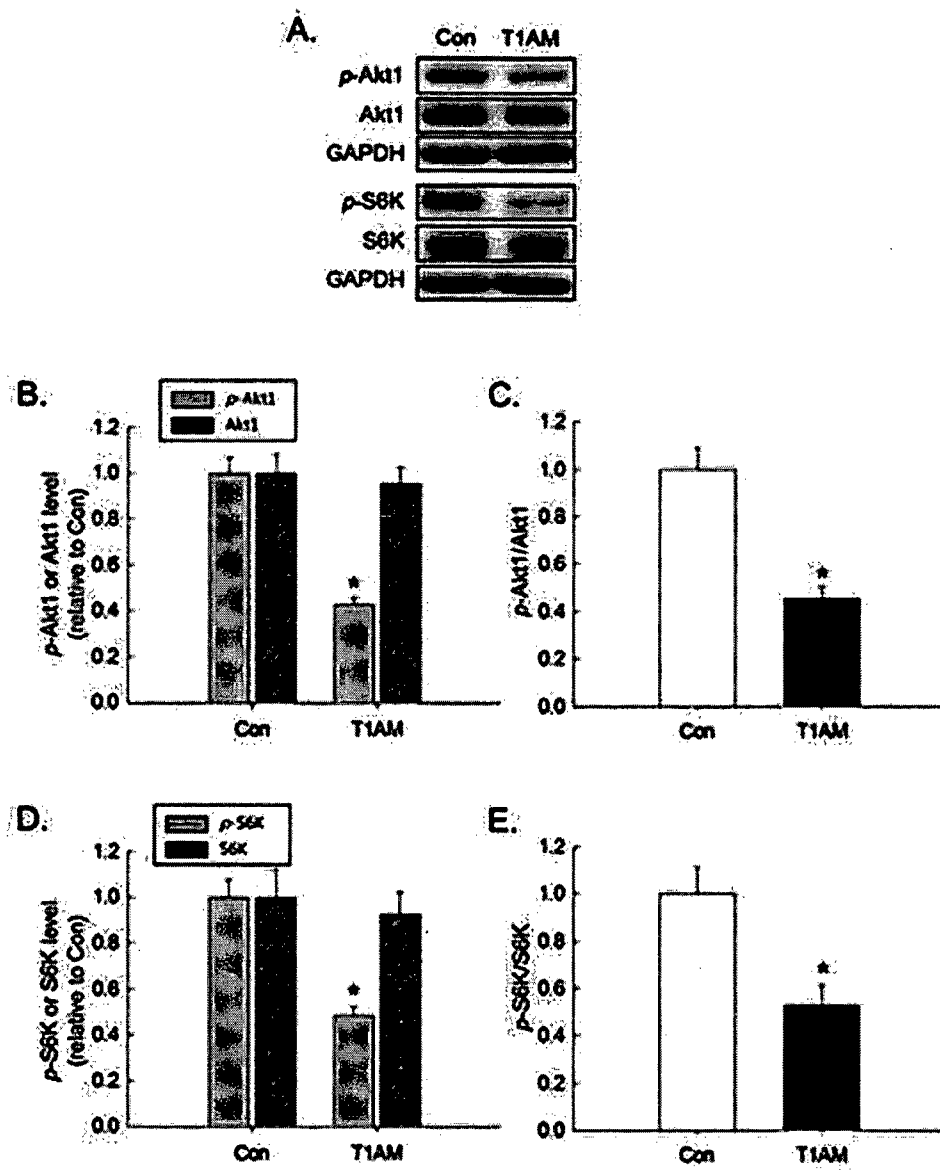
B.



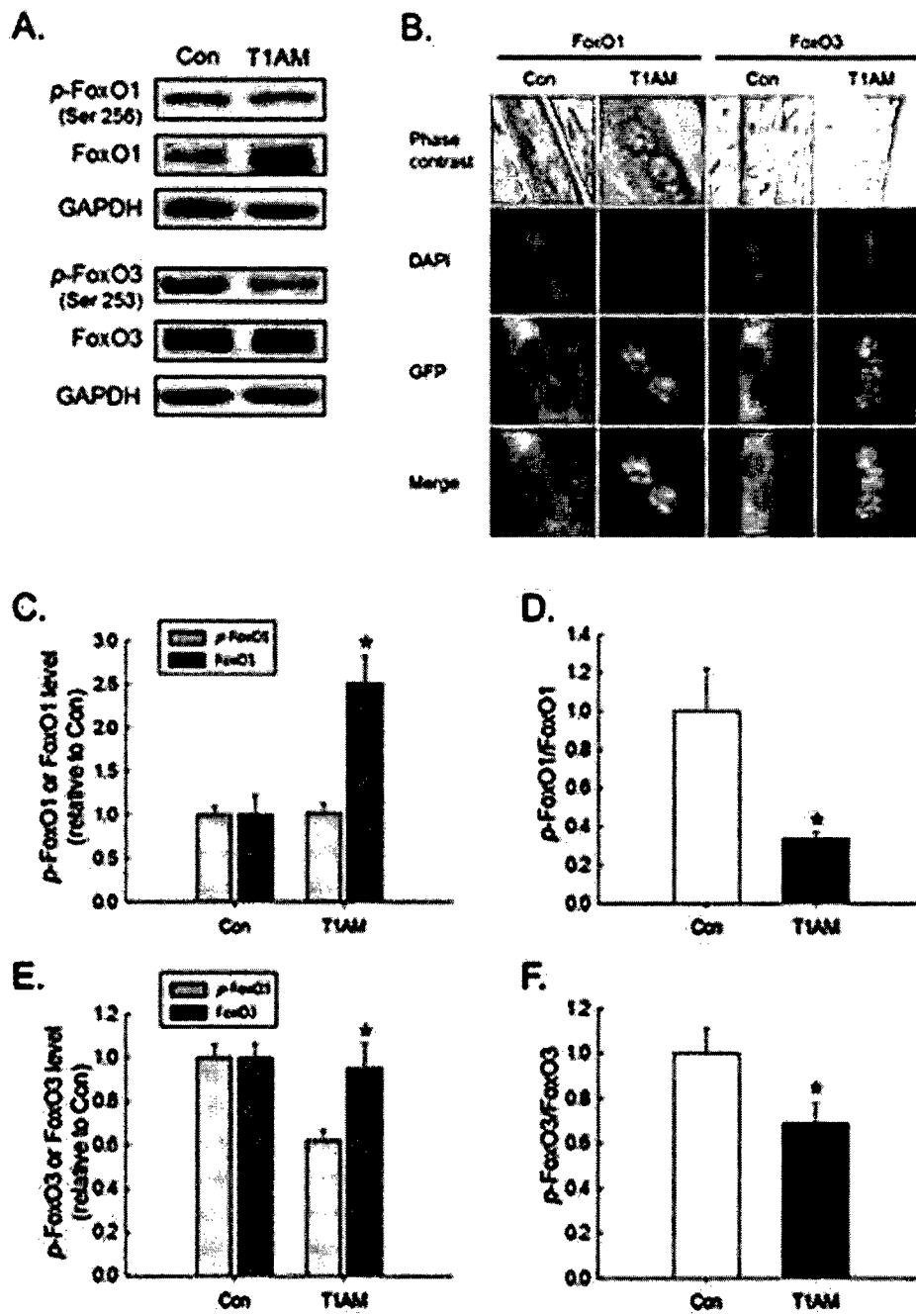
[도2]



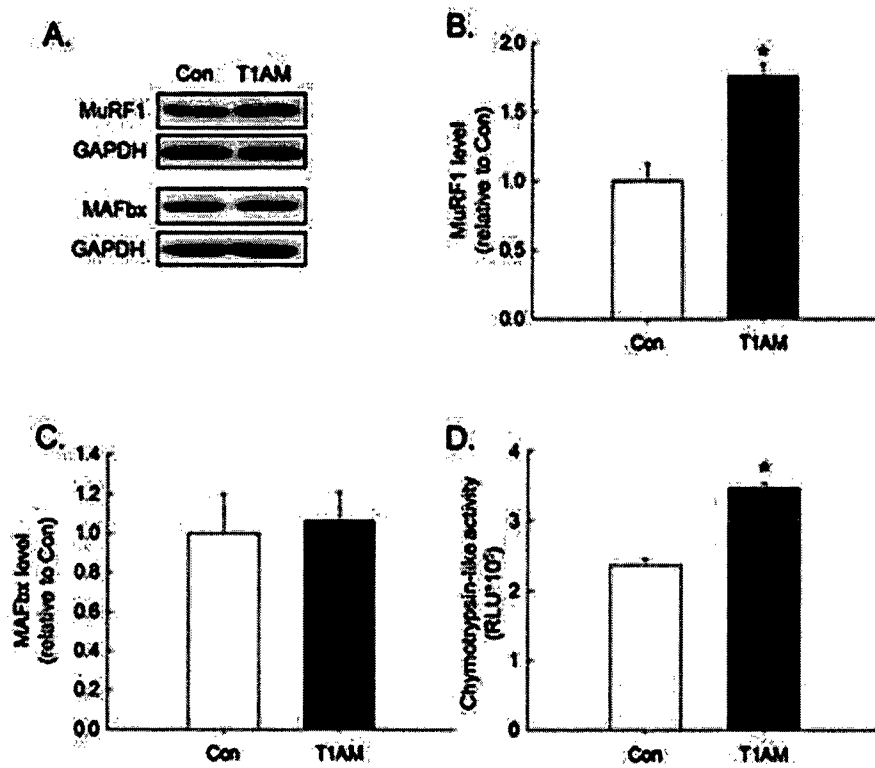
[도3]



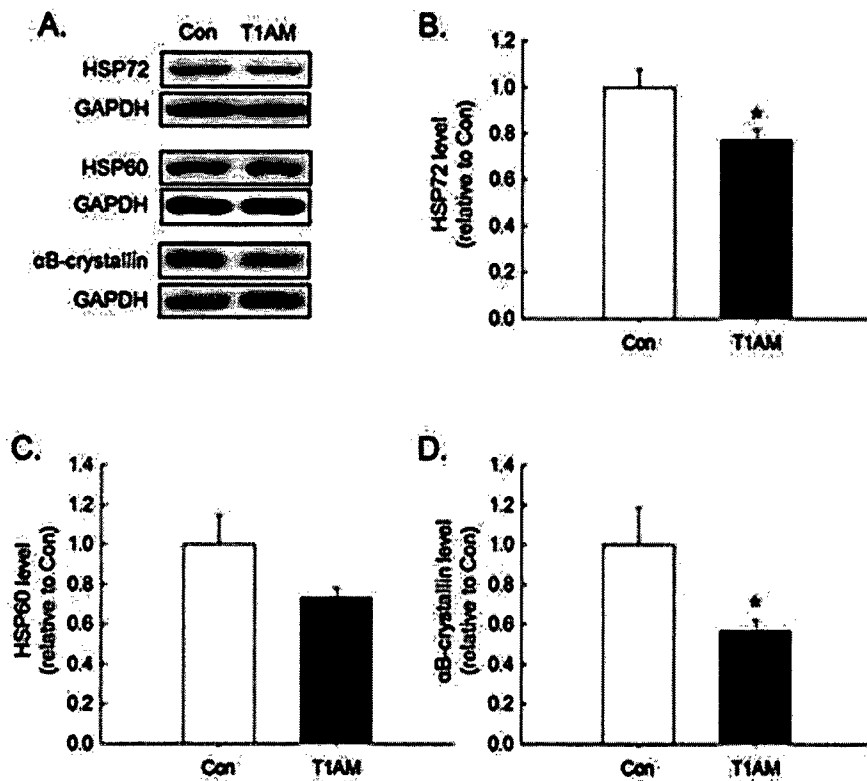
[도4]



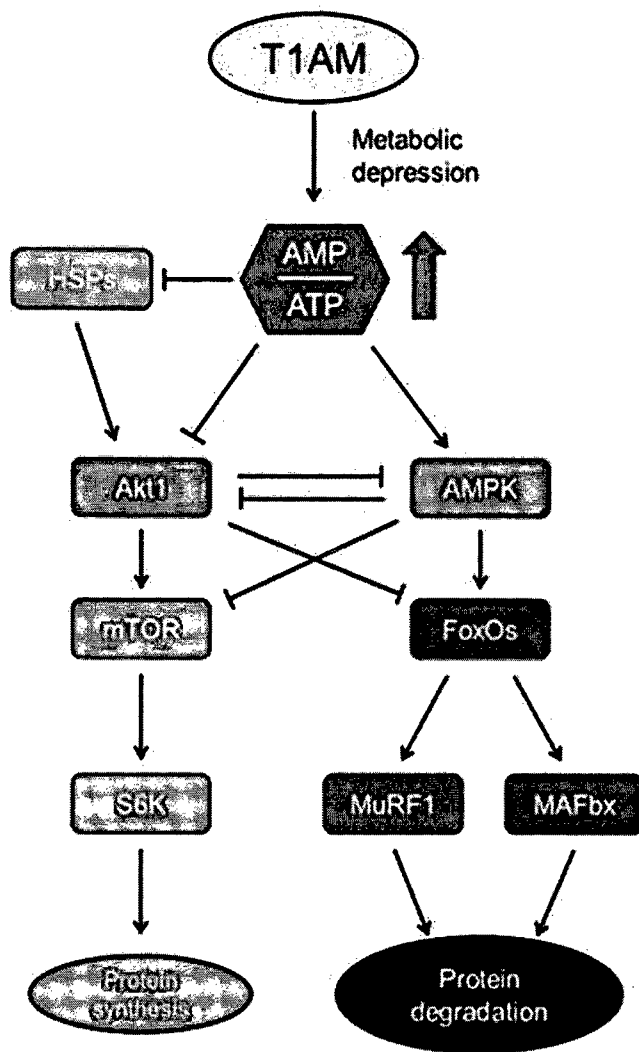
[도5]



[도6]



[도7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/006955**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A01K 67/027(2006.01)i, C12N 15/01(2006.01)i, C12N 5/077(2010.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, A61K 31/7076(2006.01)i, A61K 33/18(2006.01)i, A61K 38/08(2006.01)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)

A01K 67/027; A61K 31/137; C07C 211/27; C07C 255/35; G01N 33/50; G01N 33/68; C12Q 1/68; C07C 255/37; C12N 15/01; C12N 5/077; A61K 31/7076; A61K 33/18; A61K 38/08

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: muscular atrophy inducing agent, hypometabolism, T1AM, 3-iodothyronamine, DADLE ([D-Ala2,D-Leu5] enkephalin), 5'-AMP, H2S, muscle hypertrophy prevention

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013-0269046 A1 (KINSELLA, Todd M. et al.) 10 October 2013 See abstract, paragraphs [0060], [0091], [0092], [0108], [0111], [0112] and claims 1, 19, 20, 23.	14
A		1-13,15-24
A	KR 10-1112731 B1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 13 March 2012 See abstract and paragraph [0002].	1-24
A	US 2006-0035980 A1 (SCANLAN, Thomas et al.) 16 February 2006 See abstract, paragraph [0231] and claims 35-38.	1-24
A	BODINE et al., Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy, Science, 2001, vol. 294, pp. 1704-1708 See the entire document.	1-24
A	JP 2006-162346 A (BIOMARKER SCIENCE KK.) 22 June 2006 See abstract and claims 1, 6, 7, 11.	1-24



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

“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

27 OCTOBER 2016 (27.10.2016)

Date of mailing of the international search report

27 OCTOBER 2016 (27.10.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/006955

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2013-0269046 A1	10/10/2013	EP 2621268 A1 EP 2621268 A4 WO 2012-044585 A1	07/08/2013 23/04/2014 05/04/2012
KR 10-1112731 B1	13/03/2012	KR 10-2011-0048137 A	11/05/2011
US 2006-0035980 A1	16/02/2006	AU 2004-231999 A1 AU 2004-231999 B2 AU 2010-246462 A1 CA 2517560 A1 EP 1625111 A2 EP 1625111 A4 JP 2006-523718 A JP 2011-026345 A US 2005-0096485 A1 US 2005-0267207 A1 US 2009-105347 A1 US 6979750 B1 US 7321065 B2 US 7339079 B2 US 7355079 B2 WO 2004-093800 A2 WO 2004-093800 A3	04/11/2004 26/08/2010 16/12/2010 04/11/2004 15/02/2006 25/04/2007 19/10/2006 10/02/2011 05/05/2005 01/12/2005 23/04/2009 27/12/2005 22/01/2008 04/03/2008 08/04/2008 04/11/2004 06/01/2005
JP 2006-162346 A	22/06/2006	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A01K 67/027(2006.01)i, C12N 15/01(2006.01)i, C12N 5/077(2010.01)i, G01N 33/50(2006.01)i, A61K 31/7076(2006.01)i, A61K 33/18(2006.01)i, A61K 38/08(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A01K 67/027; A61K 31/137; C07C 211/27; C07C 255/35; G01N 33/50; G01N 33/68; C12Q 1/68; C07C 255/37; C12N 15/01; C12N 5/077; A61K 31/7076; A61K 33/18; A61K 38/08

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: 근위축 유도제, 저대사, T1AM, 3-iodothyronamine, DADLE([D-Ala2,D-Leu5] enkephalin), 5'-AMP, H2S, 근비대증 예방

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2013-0269046 A1 (KINSELLA, TODD M. 등) 2013.10.10 요약, 단락 [0060], [0091], [0092], [0108], [0111], [0112] 및 청구항 1, 19, 20, 23 참조.	14
A		1-13, 15-24
A	KR 10-1112731 B1 (연세대학교 산학협력단) 2012.03.13 요약 및 단락 [0002] 참조.	1-24
A	US 2006-0035980 A1 (SCANLAN, THOMAS 등) 2006.02.16 요약, 단락 [0231] 및 청구항 35-38 참조.	1-24
A	BODINE 등, Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy, Science, 2001, vol. 294, pp. 1704-1708 전체 문헌 참조.	1-24
A	JP 2006-162346 A (BIOMARKER SCIENCE KK) 2006.06.22 요약 및 청구항 1, 6, 7, 11 참조.	1-24

☐ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 10월 27일 (27.10.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 10월 27일 (27.10.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

강민정

전화번호 +82-42-481-8131



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2013-0269046 A1	2013/10/10	EP 2621268 A1 EP 2621268 A4 WO 2012-044585 A1	2013/08/07 2014/04/23 2012/04/05
KR 10-1112731 B1	2012/03/13	KR 10-2011-0048137 A	2011/05/11
US 2006-0035980 A1	2006/02/16	AU 2004-231999 A1 AU 2004-231999 B2 AU 2010-246462 A1 CA 2517560 A1 EP 1625111 A2 EP 1625111 A4 JP 2006-523718 A JP 2011-026345 A US 2005-0096485 A1 US 2005-0267207 A1 US 2009-105347 A1 US 6979750 B1 US 7321065 B2 US 7339079 B2 US 7355079 B2 WO 2004-093800 A2 WO 2004-093800 A3	2004/11/04 2010/08/26 2010/12/16 2004/11/04 2006/02/15 2007/04/25 2006/10/19 2011/02/10 2005/05/05 2005/12/01 2009/04/23 2005/12/27 2008/01/22 2008/03/04 2008/04/08 2004/11/04 2005/01/06
JP 2006-162346 A	2006/06/22	없음	