(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0015769
(43) 공개일자 2022년02월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2016.01) *A23L 33/17* (2016.01)
A23L 35/00 (2016.01) *A61K 35/64* (2015.01)
A61K 38/00 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 33/17 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0096236
(22) 출원일자 2020년07월31일
심사청구일자 2020년07월31일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
한정순
서울특별시 강남구 압구정로 61길 37, 72동 307호(압구정동, 한양아파트)
김시현
서울특별시 도봉구 도당로31길 20, 202호(방학동, 세광빌라)
(74) 대리인
이명진

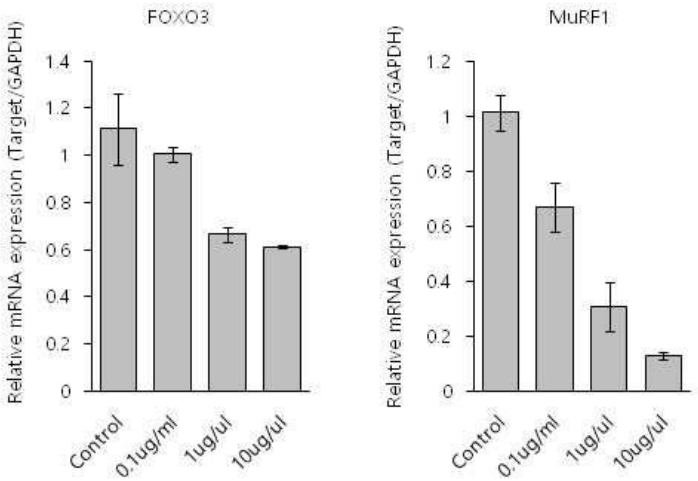
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 **그릴루스 비마쿨라투스를 유효성분으로 포함하는 근위축증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 그릴루스 비마쿨라투스(*Gryllus bimaculatus*), 보다 구체적으로는 그릴루스 비마쿨라투스 분말 또는 그릴루스 비마쿨라투스의 단백질 추출물을 유효성분으로 포함하는 근위축증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 근위축증(muscle atrophy) 관련 핵심 전사인자인 FoxO3 및 MuRF-1의 발현 억제 효과가 있어 근위축증 및 이로 인한 각종 질환, 근육의 노화, 영양부족 환자나 성장기 및 노인 등에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A23L 35/00 (2016.08)
A61K 35/64 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
A61P 21/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/316 (2013.01)
A23V 2300/14 (2013.01)
A23V 2300/31 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345312467
과제번호	2019R1I1A1A01041076
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	창의도전연구기반지원
연구과제명	노인 근감소 예방 위한 쌍별 귀뚜라미 이용 개호식품(선식)제조 및 효능평가
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2019.06.01 ~ 2021.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

그릴루스 비마쿨라투스(*Gryllus bimaculatus*)를 유효성분으로 포함하는, 근위축증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 그릴루스 비마쿨라투스는 그릴루스 비마쿨라투스 분말인 것을 특징으로 하는, 근위축증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 그릴루스 비마쿨라투스 분말은 그릴루스 비마쿨라투스를 100 내지 150 ℃에서 40분 내지 60분 동안 쪄서 분말화한 것을 특징으로 하는, 근위축증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 그릴루스 비마쿨라투스는 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물인 것을 특징으로 하는, 근위축증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물은 탈지된 것을 특징으로 하는, 근위축증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물은 수산화나트륨 및 염화나트륨 함유 인산나트륨 용액으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출된 것을 특징으로 하는, 근위축증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물은 30 내지 50℃에서 30 내지 120분 동안 추출된 것을 특징으로 하는, 근위축증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물은 0.1 내지 0.5 M의 수산화나트륨을 1 : 10 내지 20 (그릴루스 비마쿨라투스 분말 : 수산화나트륨) 중량비로 첨가하여 추출된 것을 특징으로 하는, 근위축증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 조성물은 FoxO3(Forkhead box protein O3) 또는 MuRF-1(Muscle RING-finger protein-1) 유전자의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 근위축증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 그릴루스 비마쿨라투스는 전체 조성물 대비 0.1 μg/ml 내지 10 μg/ml의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는, 근위축증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 근위축증은 근육을 사용하지 않음으로써 발생하는 근육 조직의 손실로 인한 근위축, 근육 자체의 병으로 인한 근위축, 근육을 지배하는 신경의 손상으로 인한 근위축, 또는 노화에 의한 근위축인 것을 특징으로 하는, 근위축증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 근위축증은 노화성 근위축증, 퇴행성 근위축증, 당뇨병성 근위축증, 지대형(limb-girdle type) 근위축증, 베커 근위축증(Becker muscular dystrophy), 뒤센 근위축증(Duchenne muscular dystrophy), 근긴장성 근위축증(myotonic muscular dystrophy), 에머리-드레이푸스 근위축증(Emery-Dreifuss muscular dystrophy), 원위 근위축증(Distal Muscular Dystrophy), 안면견갑상완근위축증(facioscapulohumeral muscular dystrophy), 선천성 근위축증(congenital muscular dystrophy) 및 근위축성 비만(sarcopenic obesity)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 근위축증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 13

그릴루스 비마쿨라투스(*Gryllus bimaculatus*)를 유효성분으로 포함하는, 근위축증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 14

그릴루스 비마쿨라투스(*Gryllus bimaculatus*)를 유효성분으로 포함하는, 근위축증의 예방 또는 치료용 약학적

조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 그릴루스 비마쿨라투스는 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물인 것을 특징으로 하는, 근위축증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 근위축증은 노화성 근위축증, 퇴행성 근위축증, 당뇨병성 근위축증, 지대형(limb-girdle type) 근위축증, 베커 근위축증(Becker muscular dystrophy), 뒤센 근위축증(Duchenne muscular dystrophy), 근긴장성 근위축증(myotonic muscular dystrophy), 에머리-드레이푸스 근위축증(Emery-Dreifuss muscular dystrophy), 원위 근위축증(Distal Muscular Dystrophy), 안면견갑상완근위축증(facioscapulohumeral muscular dystrophy), 선천성 근위축증(congenital muscular dystrophy) 및 근위축성 비만(sarcopenic obesity)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 근위축증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 17

하기의 단계를 포함하는 근위축증의 예방 또는 개선용 그릴루스 비마쿨라투스(*Gryllus bimaculatus*) 단백질 추출물의 제조방법:

(a) 그릴루스 비마쿨라투스를 분말화하는 단계;

(b) 상기 분말화된 그릴루스 비마쿨라투스를 탈지하는 단계; 및

(c) 상기 탈지된 그릴루스 비마쿨라투스 분말로부터 단백질을 추출하는 단계.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 제조방법은 단계 (a) 전에 하기의 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물의 제조방법.

(a-1) 그릴루스 비마쿨라투스를 절식키시는 단계; 및

(a-2) 상기 절식시킨 그릴루스 비마쿨라투스를 찌는 단계.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 단계 (a-1)의 절식은 24시간 내지 72시간 동안 이루어지는 것을 특징으로 하는, 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물의 제조방법.

청구항 20

제18항에 있어서,

상기 단계 (a-2)의 찌는 단계는 100 내지 150℃에서 40분 내지 60분 동안 이루어지는 것을 특징으로 하는, 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물의 제조방법.

청구항 21

제17항에 있어서,

상기 단계 (b)의 탈지는 에탄올, 헥산(hexane) 및 석유에테르(petroleum ether)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물의 제조방법.

청구항 22

제17항에 있어서,

상기 단계 (c)의 추출은 수산화나트륨 및 염화나트륨 함유 인산나트륨 용액으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물의 제조방법.

청구항 23

제17항에 있어서,

상기 제조방법은 (d) 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물을 탈염하는 단계;를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 그릴루스 비마쿨라투스(*Gryllus bimaculatus*), 보다 구체적으로는 그릴루스 비마쿨라투스 분말 또는 그릴루스 비마쿨라투스 분말의 단백질 추출물을 유효성분으로 포함하는 근위축증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 국제식량농업기구(FAO)에 따르면, 2050년경에는 2010년 대비 두 배 이상의 식량 자원이 필요할 것으로 예상되어 에너지 공급원인 쌀, 보리, 밀 등의 식물 자원뿐 아니라 단백질 공급원으로 식용되고 있는 축산류, 어패류, 가금류 등의 부족이 심각하게 우려되고 있다. 특히 동물성 단백질 급원의 공급 부족이 가장 큰 문제로 지목되고 있다. 이러한 동물성 단백질 공급원 부족을 해결하기 위한 방안으로서 FAO에서는 영양적 측면, 환경적 측면 및 경제적 측면을 고려하여 오래 전부터 전 세계에서 식용되어 온 다양한 식용 곤충을 제시하고 있다.

[0004] 식용 곤충은 종과 서식지 차이에 따라 어느 정도의 영양성분 함량 차이가 있으나, 일반적으로 50-60%의 조단백질, 8.1-59%의 조지방, 4.9-12.1%의 조섬유가 함유되어 있으며, 철(Fe), 칼슘(Ca), 아연(Zn) 등의 각종 무기성분과 비타민도 함유하고 있어 식량자원으로 활용될 가능성이 높다. 또한, 탄수화물 함량은 많지 않으나 글루코사민 계열이 차지하고 있으며, 불포화 지방산이 풍부하고 토코페롤 등 항산화 물질이 일반적인 동물성 급원 식품에 비해 풍부하다. 게다가 콜레스테롤이 거의 함유되어 있지 않으며, 키틴 등의 물질이 함유되어 있어 각종 대사질환, 특히 골격계 질환의 예방과 치료에 이용될 수 있을 것으로 기대되는 식소재이다.

[0005] 식용곤충은 2013년 FAO에서 미래 식량자원으로서의 활성화 방안을 발표한 이후, 세계 각국에서 이에 대한 연구와 산업화가 진행되고 있으며, 국내에서도 2016년 그릴루스 비마쿨라투스(*Gryllus bimaculatus*)가 식품의약품안전처에서 인정한 식품 원료로 정식 등록된바 있다.

[0006] 한편, 근위축증(muscle atrophy)은 신체 활동의 부족, 부상 등으로 인한 침상 휴식이나 당뇨병, 노화 등에 의해 발생하며, 근세포의 크기 및 수가 감소하고 골격근의 질량이 시간이 경과함에 따라 감소할 뿐만 아니라 단백질

함량 저하 및 근력 상실의 결과를 초래하는 증상을 말한다. 전 세계적으로 노령인구의 급격한 증가와 함께 노인성 근위축(senile atrophy)으로 인한 노인의 낙상사고 위험성이 지속적으로 증가되고 있을 뿐만 아니라, 사회 구성원 대다수가 신체적 활동의 부족으로 인한 활동저하성 근위축도 빈번히 나타나고 있다. 특히, 고령인의 경우 소화기능 쇠퇴나 단백질 분해 효소의 감소, 위산 분비 감소, 식욕 저하, 치아 기능의 문제 등으로 인해 단백질 섭취가 부족해지면서 근육 단백질의 합성이 감소하는 것으로 알려져 있다. 이러한 근위축증은 다양한 합병증과 신체적 문제를 일으킬 수 있는 염증, 감염 등의 위험이 높아지고 골다공증의 발현 위험을 증가시키고 각종 골격계 질환의 발현을 유발하여 삶의 질을 저하시키는 것으로 알려져 있다. 현재까지 그릴루스 비마쿨라투스에 대한 연구는 사육 조건, 일반성분, 사육 밀도에 따른 섭식량, 식품 용도 개발에 따른 절식 조건 등에 관한 연구만 이루어져 있을 뿐이며, 근위축증과 관련한 그릴루스 비마쿨라투스의 효능에 대한 연구는 전무한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) KR 10-2019-0050540 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 그릴루스 비마쿨라투스에 근위축증과 관련된 핵심 전사인자인 FoxO3 및 MuRF-1의 발현 감소 효과가 있음을 발견하고, 이를 이용하면 근위축증을 예방하고 개선하며 치료할 수 있음을 실험적으로 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 그릴루스 비마쿨라투스(*Gryllus bimaculatus*)를 유효성분으로 포함하는, 근위축증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 그릴루스 비마쿨라투스를 유효성분으로 포함하는, 근위축증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 그릴루스 비마쿨라투스를 유효성분으로 포함하는, 근위축증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 근위축증의 예방 또는 개선용 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0014] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 그릴루스 비마쿨라투스(*Gryllus bimaculatus*)를 유효성분으로 포함하는, 근위축증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 그릴루스 비마쿨라투스(*Gryllus bimaculatus*)를 유효성분으로 포함하는, 근위축증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 그릴루스 비마쿨라투스(*Gryllus bimaculatus*)를 유효성분으로 포함하는, 근위축증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 더욱이, 본 발명은 상기 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 근위축증의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0020] 뿐만 아니라, 본 발명은 그릴루스 비마쿨라투스의 근위축증에 대한 예방, 개선 또는 치료 용도를 제공한다.

[0021] 나아가, 본 발명은 근위축증에 대한 예방 또는 치료에 이용되는 약제를 생산하기 위한 그릴루스 비마쿨라투스의 용도를 제공한다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 그릴루스 비마쿨라투스는 그릴루스 비마쿨라투스 분말일 수 있다.

[0023] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 그릴루스 비마쿨라투스 분말은 그릴루스 비마쿨라투스를 100 내지 150℃에서 40분 내지 60분 동안 쪄서 분말화한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 그릴루스 비마쿨라투스는 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물일 수 있다.

[0025] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물은 탈지된 것일 수 있다.

[0026] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물은 수산화나트륨 및 염화나트륨 함유 인산나트륨 용액으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물은 30 내지 50℃에서 30 내지 120분 동안 추출된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물은 0.1 내지 0.5 M의 수산화나트륨을 1 : 10 내지 20 (그릴루스 비마쿨라투스 분말 : 수산화나트륨) 중량비로 첨가하여 추출된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물은 FoxO3(Forkhead box protein O3) 또는 MuRF-1(Muscle RING-finger protein-1) 유전자의 발현을 감소시키는 것일 수 있다.

[0030] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 그릴루스 비마쿨라투스는 전체 조성물 대비 0.1 μg/ml 내지 10 μg/ml의 농도로 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 근위축증은 근육을 사용하지 않음으로써 발생하는 근육 조직의 손실로 인한 근위축, 근육 자체의 병으로 인한 근위축, 근육을 지배하는 신경의 손상으로 인한 근위축, 또는 노화에 의한 근위축일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 근위축증은 노화성 근위축증, 퇴행성 근위축증, 당뇨병성 근위축증, 지대형(limb-girdle type) 근위축증, 베커 근위축증(Becker muscular dystrophy), 뒤센 근위축증(Duchenne muscular dystrophy), 근긴장성 근위축증(myotonic muscular dystrophy), 에머리-드레이푸스 근위축증(Emery-Dreifuss muscular dystrophy), 원위 근위축증(Distal Muscular Dystrophy), 안면견갑상완근위축증(facioscapulohumeral muscular dystrophy), 선천성 근위축증(congenital muscular dystrophy) 및 근위축성 비만(sarcopenic obesity)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 또한, 본 발명은 (a) 그릴루스 비마쿨라투스를 분말화하는 단계; (b) 상기 분말화된 그릴루스 비마쿨라투스를 탈지하는 단계; 및 (c) 상기 탈지된 그릴루스 비마쿨라투스 분말로부터 단백질을 추출하는 단계를 포함하는, 근위축증의 예방 또는 개선용 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물의 제조방법을 제공한다.

[0034] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 제조방법은 단계 (a) 전에 (a-1) 그릴루스 비마쿨라투스를 절식키시는 단계; 및 (a-2) 상기 절식시킨 그릴루스 비마쿨라투스를 찌는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0035] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 단계 (a-1)의 절식은 24시간 내지 72시간 동안 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 단계 (a-2)의 찌는 단계는 100 내지 150℃에서 40분 내지 60분 동안 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 단계 (b)의 탈지는 에탄올, 헥산(hexane) 및 석유에테르(petroleum ether)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 단계 (c)의 추출은 수산화나트륨 및 염화나트륨 함유 인산나트륨 용액으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 제조방법은 (d) 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물을 탈염하는 단계를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0041] 본 발명에 의하면, 그릴루스 비마쿨라투스는 근위축증(muscle atrophy) 관련 핵심 전사인자인 FoxO3 및 MuRF-1의 발현 억제 효과가 있다. 따라서 현재 급증하고 있는 노령인구의 근위축증 및 이로 인한 질환, 노화 및 영양부족, 골다공증, 골절 등의 노인성 질환을 예방하는데 일조할 수 있을 뿐 아니라 침상 상태의 환자나 암 등으로 인해 발생하는 심각한 근위축 예방하고 치료하는 데에도 도움이 될 수 있다. 또한, 근위축성 비만(sarcopenic obesity)으로 인한 여러 가지 질환 예방과 치료에도 도움이 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1a 및 도 1b는 MTT 분석을 이용하여 추출물의 각 농도별 세포 생존력 분석 결과를 나타낸 도로서, 도 1a는 그릴루스 비마쿨라투스 분말을 DMSO에 용해하여 처리한 결과이고, 도 1b는 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물을 DMSO에 용해하여 처리한 결과이다.

도 2는 DMSO에 용해한 그릴루스 비마쿨라투스 분말을 근골격세포에 농도별로 처리하여 FoxO3(좌측 그래프) 및 MuRF-1(우측 그래프)의 mRNA 발현 수준을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 근위축증의 예방 또는 개선용 그릴루스 비마쿨라투스 분말과 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물의 제조방법을 시계열적으로 나타낸 흐름도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 골격근의 근위축(muscle atrophy)이 발생하는 기전에 대해서는 다양한 원인들이 제시되고 있는데, 그 중 근위축과 관련된 핵심 전사인자(transcription factor)로 알려져 있는 MuRF-1(Muscle RING-finger protein-1) 인자가 발현되면 근육의 성장 및 분화를 억제하고 골격근 단백질의 이화작용(catabolism)이 활성화되어 근육이 위축되고 각종 근육 관련 질환이 유발될 수 있음이 알려져 있다. FoxO3(Forkhead box protein O3) 전사인자 또한 근위축과 관련 있는 핵심 전사인자로서, 골격근 섬유가 위축되는 동안 발현되어 위성세포의 증식과 분화를 억제하고 단백질 분해를 촉진한다고 보고되어 있다.

[0045] 본 발명자들은 그릴루스 비마쿨라투스(*Gryllus bimaculatus*)가 근육 세포에 대한 독성은 없으면서도(실시예 2 참조), 근위축 관련 전사인자인 FoxO3 및 MuRF-1에 대한 발현 억제 효과를 확인하여(실시예 3 참조), 상기 그릴루스 비마쿨라투스를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하면 근위축증을 예방하고 증상을 개선하며, 나아가 근위축증을 치료할 수 있음을 발견하였다.

[0046] 따라서 본 발명은 그릴루스 비마쿨라투스를 유효성분으로 포함하는, 근위축증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공할 수 있다.

[0047] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 그릴루스 비마쿨라투스를 유효성분으로 포함하는, 근위축증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공할 수 있다.

[0048] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 그릴루스 비마쿨라투스를 유효성분으로 포함하는, 근위축증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0049] 본 명세서에서 사용된 용어 “그릴루스 비마쿨라투스(*Gryllus bimaculatus*)”는 우리말로 쌍별귀뚜라미 또는 쌍별이라고도 하며, 메뚜기목 귀뚜라미과 곤충으로서 메뚜기, 식용 번데기, 백강잠누에, 갈색거저리 애벌레(고소애), 흰점박이꽃무지 애벌레(꽃무지), 장수풍뎅이 유충과 함께 국내에 식품원료로 등록되어 있는 곤충이다. 본 발명에 따른 그릴루스 비마쿨라투스는 자연에서 채집된 것 또는 상업적으로 판매되는 것을 이용할 수 있다.

[0050] 본 명세서에서 사용된 용어 “근위축 또는 근위축증(muscle atrophy)”은 근육 조직의 감소 또는 근육의 퇴행이 나타나는 모든 증상을 의미한다.

[0051] 본 발명에 있어서, 상기 그릴루스 비마쿨라투스는 그릴루스 비마쿨라투스 분말 또는 그릴루스 비마쿨라투스 단

백질 추출물일 수 있다.

[0052] 본 발명에 있어서, 상기 그릴루스 비마쿨라투스 분말은 그릴루스 비마쿨라투스를 100 내지 150 ℃에서 40분 내지 60분 동안 쪄서 분말화한 것일 수 있다.

[0053] 본 발명에 있어서, 상기 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물은 탈지된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 탈지 용매로는 에탄올, 헥산(hexane), 석유에테르(petroleum ether) 등이 사용될 수 있으며, 그 외 공지된 방법, 예를 들면 압착추출법 등을 이용하여 탈지할 수 있다.

[0054] 본 발명에 있어서, 상기 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물은 수산화나트륨 및 염화나트륨 함유 인산나트륨 용액으로 이루어진 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 본 발명에 있어서, 상기 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물은 30 내지 50℃에서 30 내지 120분 동안 추출된 것일 수 있으며, 추출 용매로서 수산화나트륨을 사용하는 경우에는 0.1 내지 0.5 M의 수산화나트륨을 1 : 10 내지 20 (그릴루스 비마쿨라투스 분말 : 수산화나트륨) 중량비로 혼합하여 추출할 수 있다.

[0056] 본 발명에 있어서, 상기 식품 조성물, 건강기능식품 조성물 및 약학적 조성물은 FoxO3(Forkhead box protein O3) 또는 MuRF-1(Muscle RING-finger protein-1) 유전자의 발현을 감소시키는 효과가 있다. 이를 통해 근위축증의 예방, 개선 및 치료 효과를 향유할 수 있는 것이다.

[0057] 본 발명에 있어서, 상기 그릴루스 비마쿨라투스는 본 발명에 따른 전체 조성물 대비 0.1 μg/ml 내지 10 μg/ml의 농도로 포함될 수 있다. 상기 농도 범위에서 근골격세포에 대한 독성은 없으면서도 근위축증 관련 핵심 전사인자의 발현을 유의미하게 억제하는 것을 확인하였다.

[0058] 본 발명에 있어서, 상기 근위축증은 근육을 사용하지 않음으로써 발생하는 근육 조직의 손실로 인한 근위축, 근육 자체의 병으로 인한 근위축, 근육을 지배하는 신경의 손상으로 인한 근위축, 또는 노화에 의한 근위축일 수 있으며, 보다 구체적으로는 노화성 근위축증, 퇴행성 근위축증, 당뇨병성 근위축증, 지대형(limb-girdle type) 근위축증, 베커 근위축증(Becker muscular dystrophy), 뒤센 근위축증(Duchenne muscular dystrophy), 근긴장성 근위축증(myotonic muscular dystrophy), 에머리-드레이푸스 근위축증(Emery-Dreifuss muscular dystrophy), 원위 근위축증(Distal Muscular Dystrophy), 안면견갑상완근위축증(facioscapulohumeral muscular dystrophy), 선천성 근위축증(congenital muscular dystrophy), 근위축성 비만(sarcopenic obesity) 등을 예시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0059] 한편, 본 발명에 따른 그릴루스 비마쿨라투스를 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 그릴루스 비마쿨라투스를 분말 또는 단백질 추출물 형태로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 그릴루스 비마쿨라투스는 원료에 대하여 20에서 40 중량%의 양으로 첨가될 수 있다.

[0060] 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0061] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 소스, 젤리류, 에너지 바, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료, 숙취 해소제 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0062] 본 발명에 따른 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당 및 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스 및 수크로오스와 같은 다이사카라이드, 덱스트린 및 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 및 자일리톨, 소르비톨 및 에리트리톨 등의 당 알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 0.01-0.20 g, 또는 약 0.04-0.10 g 이다.

[0063] 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, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음

료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01-0.20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0064] 본 명세서에서 사용된 용어 “건강기능식품”이란, 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처가 승인한 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0065] 한편, 본 발명에 따른 그릴루스 비마쿨라투스를 유효성분으로 포함하는 근위축증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0066] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캅셀제, 연질캅셀제, 서방캅셀제, 장용캅셀제, 환제, 틴크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.

[0067] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0068] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0069] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 1928, 2208, 2906, 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젖산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제쉘락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 덱스트란, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 붕해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에칠렌글리콜 4000,6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에칠렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.

[0070] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에칠렌소르비톨지방산에스텔류(트윈에스텔), 폴리옥시에칠렌모노알킬에텔류, 라놀린에텔류, 라놀린에스텔류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민,

폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

[0071] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.

[0072] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.

[0073] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 1828, 2906, 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.

[0074] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9% 염화나트륨주사액, 링겔주사액, 덱스트로스주사액, 덱스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이티드 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메칠아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모니움), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨($NaHSO_3$) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($Na_2S_2O_3$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소디움비설파이드 0.1%, 소디움포름알데히드 설폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소디움비설파이트와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

[0075] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위텝솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스판, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아뎁스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 태고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16 (Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈(Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입(AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈(N, Es), 웨코비(W, R, S, M ,Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제(TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.

[0076] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

[0077] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0078] 본 발명의 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 예를 들면, 경구 투여, 비강 내 투여, 경기관지 투여, 경관투여, 동맥 주사, 중심정맥 주사, 말초정맥주사, 피하 주사, 근육 주사 또는 복강 내 주사, 위조루술(gastrostomy), 장조루술(enterostomy) 등에 의해 투여될 수 있다. 일일 투여량은 하루 일회 내지 수회 나누어 투여할 수 있다.

[0080] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 (a) 그릴루스 비마쿨라투스를 분말화하는 단계; (b) 상기 분말화된 그릴루스 비마쿨라투스를 탈지하는 단계; 및 (c) 상기 탈지된 그릴루스 비마쿨라투스 분말로부터 단백질을 추출하는 단계를 포함하는, 근위축증의 예방 또는 개선용 그릴루스 비마쿨라투스(*Gryllus bimaculatus*) 단백질 추출물의

제조방법을 제공할 수 있다.

[0081] 본 발명에 있어서, 상기 제조방법은 단계 (a) 전에 (a-1) 그릴루스 비마쿨라투스를 절식키시는 단계; 및 (a-2) 상기 절식시킨 그릴루스 비마쿨라투스를 찌는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0082] 본 발명에 있어서, 상기 단계 (a-1)의 절식은 24시간 내지 72시간 동안 이루어질 수 있다. 상기 그릴루스 비마쿨라투스는 적당한 온도와 습도를 유지시켜 생육되는 것으로, 주로 톱밥이나 밀겨 등의 식이로 생육되는데, 그릴루스 비마쿨라투스를 절식 없이 가공하였을 때는 그릴루스 비마쿨라투스의 내장에 있던 잔여 사료 및 배설물로 인하여 가공에도 불구하고 강한 이미, 이취가 있어 기호도를 떨어뜨리는 문제가 있다. 그러나 그릴루스 비마쿨라투스를 절식시킴으로써 내장의 사료 및 배설물의 함량을 낮출 수 있다. 더욱 구체적으로 상기 절식은 24 내지 72시간동안 이루어질 수 있다. 절식이 1시간 미만 이루어질 경우 그릴루스 비마쿨라투스의 내장의 사료 및 배설물이 충분히 제거되지 않아 가공 후에도 이미, 이취가 남을 수 있고, 72시간 초과하여 절식이 이루어질 경우 그릴루스 비마쿨라투스의 생육이 저해될 수 있는 문제가 있다. 또한 상기 절식단계 이전에 밀가루 식이로 생육하여 그릴루스 비마쿨라투스의 이미, 이취를 더욱 감소시킬 수 있다.

[0083] 본 발명에 있어서, 상기 단계 (a-2)의 찌는 단계는 100 내지 150 ℃에서 40분 내지 60분 동안 이루어질 수 있다.

[0084] 본 발명에 있어서, 상기 단계 (b)의 탈지는 에탄올, 헥산(hexane) 및 석유에테르(petroleum ether)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0085] 본 발명에 있어서, 상기 단계 (c)의 추출은 수산화나트륨 및 염화나트륨 함유 인산나트륨 용액으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 용매와 상기 단계 (b)에서 수득한 탈지된 그릴루스 비마쿨라투스 분말을 충분히 혼합한 후 원심분리하여 상층액을 취한 다음, 다시 원심분리하여 이의 침전물(pellet)을 수득하여 단백질 추출물을 얻을 수 있다.

[0086] 또한, 본 발명에 있어서 상기 제조방법은 (d) 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물을 탈염하는 단계를 더 포함할 수 있다. 탈염은 공지된 방법을 사용할 수 있으며, 본 발명의 일 구현 예에서는 투석백(12 kDa MWCO)을 이용하여 12시간 동안 탈염하였다.

[0088] 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

[0089] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0091] **[실시예]**

[0092] **실시예 1. 그릴루스 비마쿨라투스 분말 및 단백질 추출물의 제조**

[0093] **1.1. 그릴루스 비마쿨라투스 분말**

[0094] 그릴루스 비마쿨라투스 분말은 귀뚜라미 농원(대한민국 충북)에서 구입하여 사용하였다. 상기 분말은 2일간 절식시킨 그릴루스 비마쿨라투스를 세척한 다음 스팀(steam)으로 40-60분 동안 쪄준 후 60℃에서 약 18시간 동안 건조하고, 이를 마쇄하여 분말화한 것이다. 구입한 그릴루스 비마쿨라투스 분말은 -24℃ 이하에서 냉동 저장하며 사용하였다.

[0096] **1.2. 그릴루스 비마쿨라투스 분말의 탈지**

[0097] 단백질 추출 효율을 높이기 위해, 그릴루스 비마쿨라투스 분말에 대한 탈지 공정을 수행하였다. 보다 구체적으로, 상기 그릴루스 비마쿨라투스 분말에 99.5% 에탄올을 1:5 비율로 넣어준 후, 40℃에서 60분 동안 셰이킹 배스(shaking bath; VS-1205SW1, Vision Scientific Co., Ltd., 대한민국)에서 추출하였다. 상기 과정을 2번 반복한 후 12시간 동안 에탄올을 휘발·건조하였다.

[0099] **1.3. 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출 공정**

[0100] 상기 실시예 1.2에서 수득한 탈지된 그릴루스 비마쿨라투스 분말에 0.25 M 수산화나트륨(NaOH)을 1:15의 비율로 넣어준 후, 핫플레이트(Vision Scientific Co., Ltd., 대한민국) 및 자석교반기를 사용하여 40℃에서 60분간 혼합하였다. 이후 원심분리기(VS-24SMTi, Vision Science Co., Ltd., 대한민국)를 이용하여 4℃에서 3,000 rpm으로 10분 동안 원심분리 후, 상층액(supernatant)만 취하였다. 상기 수득한 상층액의 pH를 4.4로 조정해 준 후 다시 4℃에서 3,500 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 침전물(pellet)을 획득하였다.

[0102] **1.4. 침전물의 투석 및 동결건조**

[0103] 상기 실시예 1.3에서 획득한 침전물은 투석백(12 kDa MWCO; Sigma-Aldrich Chemical Co., 미국)에 넣어 12시간 동안 탈염하였다. 이후 36시간 동안 동결건조하여 그릴루스 비마쿨라투스의 단백질 추출물을 수득하였다. 수득한 단백질 추출물은 추가 실험을 위해 -24℃에서 보관하였다. 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물의 제조방법은 도 3에 흐름도로 나타내었다.

[0105] **1.5. 시험관내(in vitro) 실험을 위한 그릴루스 비마쿨라투스를 포함하는 조성물의 제조**

[0106] 상기 실시예 1에서 수득한 그릴루스 비마쿨라투스 분말 또는 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물 10 mg을 1 ml의 DMSO에 넣고, 초음파 균질기(Sonicator Vibra cell, Sonics & Materials; 진폭 조정 40%)를 이용하여 녹여주었다. 13,000 rpm, 10℃에서 10분 동안 원심분리한 후 상층액(supernatant)만 취하여 1 ml e-튜브(Eppendorf tube; micro centrifuge tube)에 옮겨 담았다.

[0108] **실시예 2. 그릴루스 비마쿨라투스의 세포 독성 평가**

[0109] 먼저, 본 발명에 따른 그릴루스 비마쿨라투스 분말 또는 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물이 근골격세포인 C2C12 세포에 미치는 독성을 평가하기 위해, MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 분석을 수행하였다. 노란색의 수용성 MTT 테트라졸륨을 세포에 처리하면, 살아 있는(대사 과정이 온전한) 세포의 미토콘드리아에 존재하는 탈수소효소(dehydrogenase)에 의해 테트라졸륨의 고리 구조가 끊어지면서 청자색을 띄는 비수용성 MTT 포마잔(formazan) 결정으로 환원되는 원리를 이용하여 측정하는 것이다. MTT 포마잔 결정은 일반적으로 다이메틸설폭시화물(dimethyl sulfoxide)과 같은 유기용매에 녹여 ELISA 리더(reader)를 이용하여 흡광도를 측정하는데, 이때 포마잔 염료(formazan dye)의 흡광도는 540 nm 부근으로서, 상기 파장에서의 흡광도는 MTT가 살아있는 세포에 의해 환원되는 양을 나타내므로 각 well에 존재하는 생존 세포 수와 비례한다.

[0110] 상기 실시예 1.5에서 제조한 DMSO에 용해된 그릴루스 비마쿨라투스 분말 또는 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물을 마우스 근골격세포(C2C12 cells)에 각각 농도별로 1 mg/mL, 0.1 mg/mL 및 0.01 mg/mL로 24시간 동안 처리한 후, MTT시약을 처리하고 37℃ 배양기에서 2시간동안 반응시켰다. 이어서, MTT시약을 제거하고, DMSO(dimethyl sulfoxide)를 넣어 well에 생성된 포마잔을 모든 녹인 다음 96-well 플레이트에 200 μl씩 분주하여 ELASA 리더(Microplate Spectrophotometer, Epoch, BioTek)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 세포 생존력(cell viability)을 계산하였다.

[0111] 그 결과 도 1a 및 도 1b에 나타난 바와 같이, 그릴루스 비마쿨라투스 분말(도 1a) 및 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물(도 1b) 모두 근골격세포(C2C12 세포)에 대한 독성은 없는 것으로 확인되었다. 이에, 본 발명자들은 근골격세포에서 그릴루스 비마쿨라투스 분말 또는 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물의 처리에 따른 표적 전사인자의 발현 변화를 관찰하였다.

[0113] **실시예 3. 그릴루스 비마쿨라투스의 근위축 관련 전사인자 FoxO3 및 MuRF-1 발현 억제 효과 확인**

[0114] 그릴루스 비마쿨라투스가 근위축증의 예방, 개선 또는 치료에 효과가 있는지 알아보기 위해, 근위축증 연관 핵심 전사인자 FoxO 및 근단백질 가수분해 유전자 MuRF-1의 mRNA 수준을 비교 분석하였다. 먼저, 동일한 조건에서

준비된 세포를 대상으로 TRIzol 시약(Invitrogen Co., 미국)을 이용하여 총 RNA를 분리하고 정량한 다음 각각의 프라이머, DEPC(diethyl pyrocarbonate) 워터 및 원-스텝 RT PCR 프리믹스 키트(Intron, 대한민국)를 첨가하고 qRT-PCR(quantitative real time polymerase chain reaction; Applied Biosystems, Quantstudio 3)기기를 이용하여 증폭되는 DNA를 검출하였다.

[0115] 보다 구체적으로, 상기 실시예 2의 MTT 실험을 통하여 주입할 그릴루스 비마쿨라투스의 농도를 확인한 후, C2C12 세포를 37℃ 배양기에서 12시간 이상 배양하였다. 12시간 이상 배양한 C2C12 세포에서 배지를 제거하고, 다시 배지 1 ml를 주입하였다. 이어서, 각 well에 시료 1 μl를 처리하고(대조군에는 PBS 처리) 혼합한 뒤 37℃ 배양기에 넣어주었다. 12시간이 지난 후 배지를 제거한 뒤 PBS로 총 2번 세척하였다. 세척이 끝난 후 각 well에 TRIzol 시약 200 μl를 처리하고 상온에서 5분 방치한 후 클로로폼(Chloroform) 40 μl를 첨가하여 혼합하였다. 이후 13,200 rpm, 4℃에서 15분간 원심분리 후, 상층액에 아이소프로판올(isopropanol) 120 μl를 혼합하여 상온에서 10분간 방치하였다. 10분 후 13,200 rpm, 4℃에서 15분간 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤 70%의 차가운 에탄올 100 μl 주입 후, 다시 13,200 rpm, 4℃에서 15분간 원심분리를 진행하였다. 이때 70% 차가운 에탄올을 주입하여 원심분리하는 과정은 2회 반복하였다. 이후 70% 에탄올을 제거해 주고, DEPC 워터를 넣어준 후 마이크로플레이트 분광광도계(microplate spectrophotometer; Epoch, BioTek)를 이용, RNA의 농도를 측정하였다. 시료의 RNA 농도를 측정한 후 이에 따라 시료와 DEPC 워터를 추가적으로 넣어주고, TOPreal™ qPCR 2X 프리믹스(SYBR Green with high ROX) 2 μl를 주입하였다. 혼합된 시료를 지퍼스트립(zipperstrip) PCR 튜브에 옮겨 담고 PCR 기기(Thermal Cycler; Bio-Rad)를 이용, DNA를 증폭시켰다. 증폭이 완료된 후 마이크로 튜브(microcentrifuge tube)에 옮겨 담고 PCR 플레이트에 시료 2 μl, 2X 마스터믹스 5 μl, 순수(pure water) 2.5 μl, 프라이머 0.5 μl를 주입하였다. 이후 한 시료에 mGAPDH, mMSTN를 각각 주입하였다. 마지막으로 이를 밀봉하여 RT-PCR(Applied Biosystems, Quantstudio 3)기기를 이용, 증폭되는 DNA를 검출하였다.

[0116] 그 결과 도 2에 나타난 바와 같이, 그릴루스 비마쿨라투스, 보다 구체적으로 그릴루스 비마쿨라투스 분말 및 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물은 FoxO3 및 MuRF-1의 발현을 농도 의존적으로 감소시키는 효과가 있음을 확인하였다. 골격근 섬유의 위축 및 손상에 관여하는 핵심인자로 알려져 있는 FoxO 전사인자는 골격근 섬유가 위축되는 동안 발현되어 위성세포의 증식과 분화를 억제할 뿐만 아니라 단백질 분해를 촉진한다고 알려져 있다(Kamei & Ogawa, 2003). 즉, 상기와 같은 결과는 그릴루스 비마쿨라투스 분말 또는 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물이 상기 FoxO의 발현을 억제함으로써 근위축의 억제 및 예방에 매우 긍정적인 역할을 할 수 있음을 시사하는 것이다. 골격근에서 FoxO는 세 개의 다른 형태 즉, FoxO1, FoxO3 및 FoxO4로 구성되어 있으며 FoxO의 발현이 증가될 때 단백질의 합성이 억제된다고 할 수 있으므로 이의 발현을 억제하는 것은 매우 중요하며, 본 발명자들은 도 2 좌측 그래프에서 확인할 수 있는 바와 같이, 그릴루스 비마쿨라투스 분말 또는 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물은 FoxO3 발현을 농도 의존적으로 유의미하게 감소시키는 효과가 있음을 확인하여 근위축증의 예방 및 치료 가능성을 확인하였다.

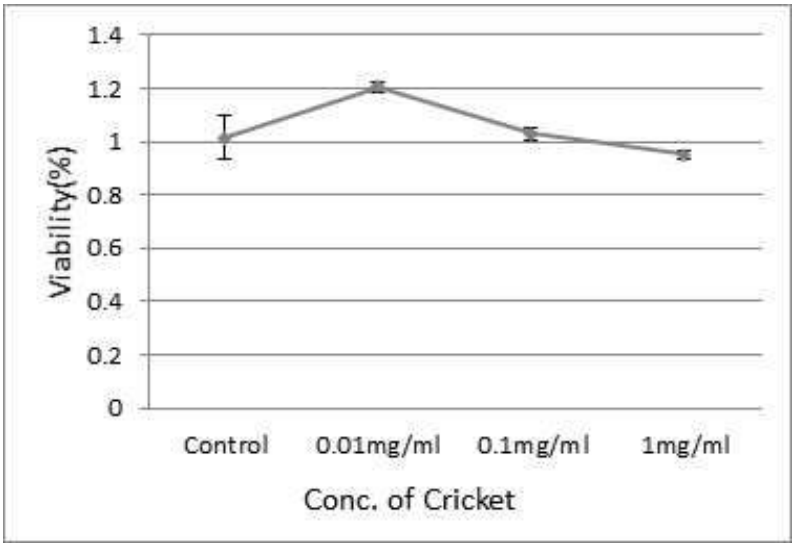
[0117] 또한, 근위축의 유발은 근단백질 가수분해 유전자인 MuRF-1의 발현이 증가됨으로써 발생한다고 알려져 있으며(Cai *et al*., 2004), 골격근의 핵 내에서 FoxO에 의해 발현되는 MuRF-1의 발현을 함께 살펴본 결과, 도 2 우측 그래프에 나타난 바와 같이 그릴루스 비마쿨라투스 분말 또는 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물은 MuRF-1 발현을 농도 의존적으로 유의하게 감소시키는 효과가 있음을 확인하여 근위축증의 억제 가능성을 확인하였다.

[0118] 상기와 같은 발견은 그릴루스 비마쿨라투스 분말 또는 그릴루스 비마쿨라투스 단백질 추출물이 근위축증 발생을 억제함으로써 이를 예방하는 효과가 있으며, 나아가 근위축증의 증세를 개선하고 치료할 수 있음을 증명한 것이다.

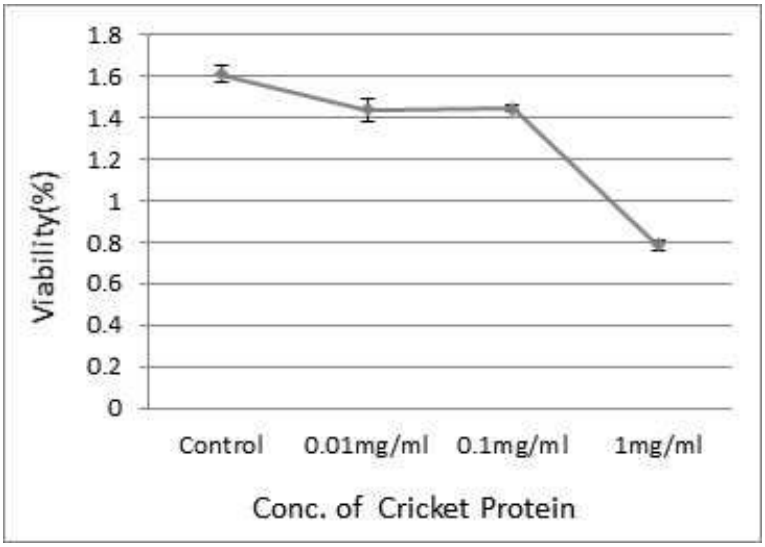
[0120] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

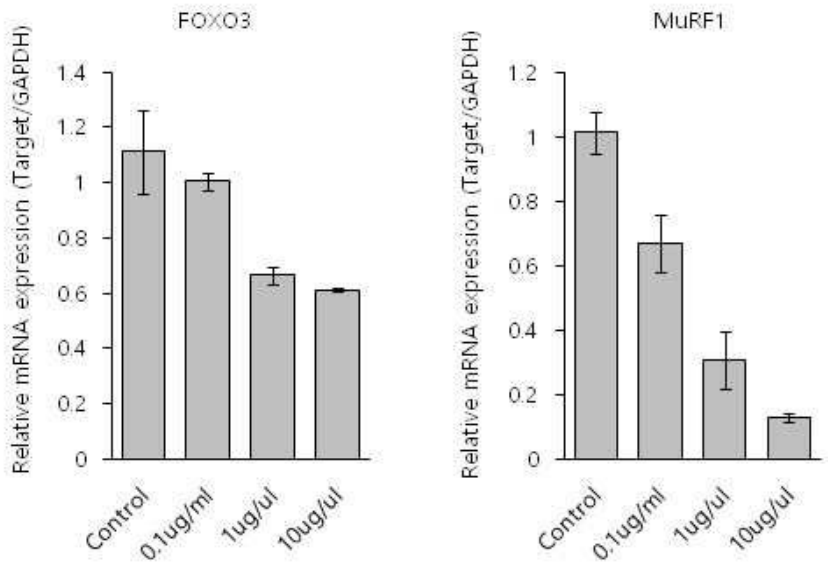
도면1a


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Viability(%)
Control
0.01mg/ml
0.1mg/ml
1mg/ml
Conc. of Cricket

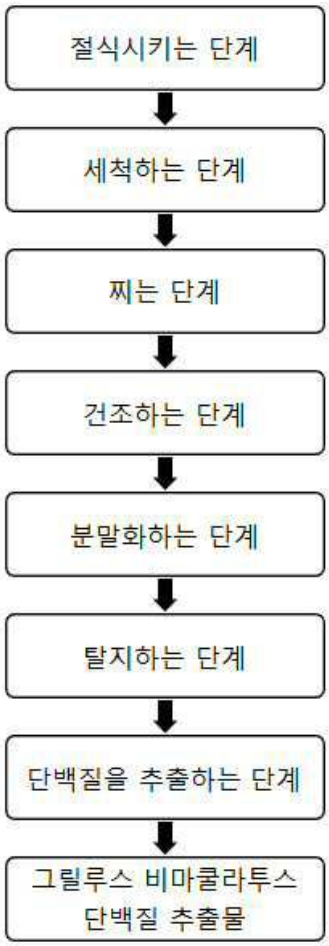
도면1b


1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Viability(%)
Control
0.01mg/ml
0.1mg/ml
1mg/ml
Conc. of Cricket Protein

도면2


FOXO3
Relative mRNA expression (Target/GAPDH)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Control
0.1ug/ml
1ug/ul
10ug/ul
MuRF1
Relative mRNA expression (Target/GAPDH)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Control
0.1ug/ml
1ug/ul
10ug/ul

도면3


절식시키는 단계
세척하는 단계
찌는 단계
건조하는 단계
분말화하는 단계
탈지하는 단계
단백질을 추출하는 단계
그릴루스 비마쿨라투스
단백질 추출물