

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2022년 10월 6일 (06.10.2022) WIPO | PCT

WO 2022/211396 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 36/537 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)
A61K 31/216 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 31/352 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2022/004284

(22) 국제출원일: 2022년 3월 28일 (28.03.2022)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2021-0042450 2021년 4월 1일 (01.04.2021) KR

(71) 출원인: 한양대학교 에리카산학협력단 (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY ERICA CAMPUS) [KR/KR]; 15588 경기도 안산시 상록구 한양대학교로 55, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 김철영 (KIM, Chul Young); 14070 경기도 안산시 동안구 귀인로 237, 210-1102, Gyeonggi-do (KR). 김영미 (KIM, Young Mi); 05502 서울특별시 송파구 올림픽로 135, 242동 2803호, Seoul (KR). 이윤정 (LEE, Yun Jung); 15577 경기도 안산시 상록구 성안길 85, 201

호, Gyeonggi-do (KR). 김지훈 (KIM, Ji Hoon); 15347 경기도 안산시 단원구 적금로 164, 104-902, Gyeonggi-do (KR). 송재숙 (SONG, Jae Sook); 15341 경기도 안산시 단원구 큰우물길 42, 다동 205호, Gyeonggi-do (KR). 김재용 (KIM, Jae-Yong); 06800 서울특별시 서초구 헌릉로 8길 58, 111동 802호, Seoul (KR).

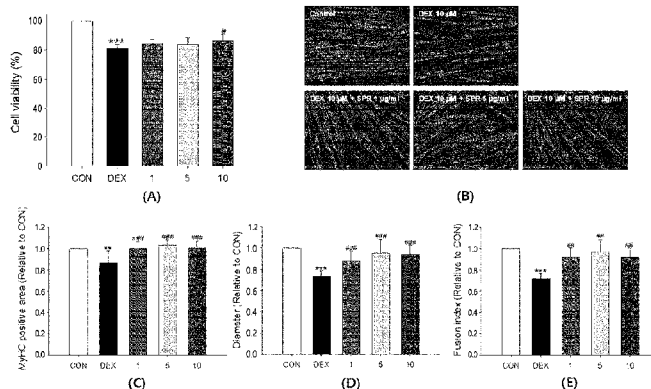
(74) 대리인: 특허법인 무한 (MUHANN PATENT & LAW FIRM); 06144 서울특별시 강남구 언주로 560, 8층, Seoul (KR).

(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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION INCLUDING SALVIA PLEBEIA R. BR. EXTRACT OR COMPOUND DERIVED THEREFROM AS ACTIVE INGREDIENT FOR PREVENTION OR TREATMENT OF MUSCULAR DYSTROPHY

(54) 발명의 명칭: 배암차즈기 추출물 또는 이의 유래 화합물을 유효성분으로 포함하는 근위축 예방 또는 치료용 약학적 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition including a *Salvia plebeia* R. Br. extract or its derived compound rosmarinic acid and/or hispidulin as an active ingredient for prevention, palliation, or treatment of muscular dystrophy. The extract or the compound derived therefrom inhibits the expression of a muscular dystrophy-related protein and increases the activity of a protein involved in the synthesis of muscular proteins, thus preventing muscle fibers from decreasing in thickness. Since the extract or the compounds are derived from a natural product, they have almost no side effects and are highly safe, thus finding advantageous applications in preventing or treating muscular dystrophy.

(57) 요약서: 본 발명은 배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.) 추출물 또는 이의 유래 화합물인 로즈마린산(rosmarinic acid) 및/또는 히스피둘린(hispidulin)을 유효성분으로 포함하는 근위축 예방, 개선 또는 치료용 조성물 등에 관한 것으로서, 상기 추출물 또는 이의 유래 화합물은 근섬유 위축 관련 단백질의 발현을 저해하고, 근육 단백질 합성에 관여하는 단백질의 활성을 높여 근섬유 굵기 감소를 예방하며, 천연물 유래로 부작용이 거의 없고 안전성이 높으므로, 근위축을 예방 또는 치료하는데 유용하게 활용될 수 있다.

[다음 쪽 계속]



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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 배암차즈기 추출물 또는 이의 유래 화합물을 유효성분으로 포함하는 근위축 예방 또는 치료용 약학적 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.) 추출물 또는 이의 유래 화합물인 로즈마린산(rosmarinic acid) 및/또는 히스피둘린(hispidulin)을 유효성분으로 포함하는 근위축 예방 또는 치료용 약학적 조성물 등에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 우리의 신체에는 약 460개의 근육이 있으며, 근육은 우리 몸의 자세 및 균형을 유지하거나 이동 등 신체 기능에 중요한 역할을 하고 있다. 또한, 근육은 체중의 45-55%를 차지하는 가장 큰 장기이며 에너지 대사 및 열 생성에서도 중요한 역할은 담당한다. 여러 가지 원인으로 인해 이들 근육량이 감소하게 되면, 신체활동을 위한 근력이 약화되는 것을 기본으로, 근골격계 퇴화의 악순환 고리가 시작된다. 보행 속도의 감소 및 악력의 약화 등이 근육량 감소의 주된 증상이자 지표가 되며, 이는 추가적으로 낙상, 골절, 관절의 손상, 대사장애 및 심혈관 질환 등으로 이어질 수 있다.
- [3] 근육 소실(Decreased muscle mass)은 신체의 노화에 따라 자연스럽게 발생할 수 있고, 근육의 미사용이나 운동량 부족 등이 원인이 되어 나타나거나 다른 병적 상태(악액질, 패혈증, 기아, 항암치료, 스트레스 호르몬에의 과도한 노출)가 원인이 되어 2차적으로 발생할 수도 있다. 이는 제1형 및 제2형 근섬유(muscle fibers)의 반-동화(Anti-anabolic)작용 및 이화(Catabolic)작용으로 인한 근육세포 위축으로 일괄할 수 있다.
- [4] 따라서, 노화성, 미사용성, 질환성으로 야기될 수 있는 근감소에 대한 한 가지 치료법으로서 근육섬유 단백질들의 감소를 유도하는 상태에서도 근육량을 유지하도록 도울 수 있는 천연물 유래 생물소재를 이용할 수 있다.
- [5] 대부분의 경우, 우리 몸의 스트레스호르몬(Cortisol, Glucocorticoids 등)은 근섬유의 분자생물학적 변화를 야기하여 반-동화작용 및 이화작용에 직·간접적으로 관여하게 된다. 글루코코르티코이드(Glucocorticoids)는 반-동화작용(Anti-anabolic action)으로서 PI3K/Akt/mTOR Pathway를 저해하는 역할을 하는데, 이는 downstream effectors인 4E-BP1과 p70S6K 등의 활성을 저해시켜 eIF4G(Eukaryotic translation initiation factor 4 G) 및 eIF4E(Eukaryotic translation initiation factor 4 E)의 작동을 막는다. 이는 곧 단백질 합성을 위한 mRNA 번역과정을 억제하는 것으로써 근섬유의 합성 저해 및 단백질 분해에 의한 근섬유 위축으로 나타난다.
- [6] 글루코코르티코이드(Glucocorticoids)는 근육의 합성 저해뿐만 아니라 단백질을 분해시켜 근육의 위축을 유도하는 역할을 한다. 이는 'PI3K/Akt에 의한

FOXO(Forkhead box O 전사인자) 활성화 및 GSK3(Glycogen synthase kinase 3) 불활성화'로 이어지는 기전에 따라 근위축(Muscle atrophy)을 유도하는 유전자가 Atroгене(Atrogin-1/MAFbx, MuRF-1 등)을 발현하는데, 상기 유전자는 유비퀴틴/프로테아좀 시스템(Ubiquitin-Proteasome system)으로 대표되는 단백질의 분해를 유도한다.

- [7] 배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.)는 꿀풀과의 두해살이풀로, 잎의 모양이 쭈글쭈글 하여 곱보배추, 뱀의 비늘처럼 생겼다고 뱀배추 등으로 불린다. 본초강목(本草綱目)에 향기로운 가지가 달린 풀이라 하여 여지초(枝草)라고 기록되어 있다. 잎은 길이 3~8 cm로 뿌리에서 뭉쳐나고 땅 위로 퍼지며, 2개씩 마주 나며, 잎 가장자리에 둔한 톱니가 있고, 앞 뒷면에 간혹 잔털이 있어 잎자루가 길다. 어릴 때에는 쭈글쭈글하고 납작하게 땅에 붙어서 월동하며, 자라면서 잎이 덜 쭈글거리며 완만하게 네모지고 곧게 자란다. 풀 전체를 약용으로 하며 랑혈, 이수, 해독, 살충의 효능이 있어, 해혈, 토혈, 혈뇨, 인후종통, 치창 등의 치료에 이용된다.
- [8] 배암차즈기와 관련된 선행기술로서, 대한민국 등록특허 제10-1794567호에는 배암차즈기 추출물 또는 분획물의 알리지성 천식 억제 활성이, 대한민국 등록특허 제10-1702120호에는 배암차즈기 추출물 또는 분획물의 통풍 예방 또는 치료 효과가 개시되어 있으나, 배암차즈기 추출물 또는 이의 유래 화합물의 근위축 예방 또는 치료 효과는 알려진바 없다.
- [9] 이에, 본 발명자들은 골격근(skeletal muscle) 감소를 완화할 수 있는 천연물 유래 성분에 관하여 예의 연구한 결과, 배암차즈기의 추출물 및 이의 유래된 화합물인 로즈마린산(rosmarinic acid) 및/또는 히스피둘린(hispidulin)을 포함하는 조성물의 근위축 예방 또는 치료효과가 우수한 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 배암차즈기 추출물을 유효성분으로 포함하는 근위축 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 다른 목적은 배암차즈기 추출물을 유효성분으로 포함하는 근 손실 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 배암차즈기 추출물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [13] 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.

과제 해결 수단

- [14] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 배암차즈기 추출물을 유효성분으로

포함하는 근위축 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[15] 또한, 본 발명은 상기 배암차즈기 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 근위축예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[16] 또한, 본 발명은 근위축의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 상기 배암차즈기 추출물의 용도를 제공한다.

[17] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 배암차즈기 추출물은 물(H_2O), C_1 내지 C_4 의 저급알코올, n-헥산, 에틸아세테이트, 아세톤, 부틸아세테이트, 1,3-부틸렌 글리콜, 메틸렌클로라이드, 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 용매로 추출된 것일 수 있으며, 바람직하게는 50% 에탄올을 용매로 추출된 것일 수 있다.

[18] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 조성물은 근섬유다발의 감소, 근육의 염증세포 침윤 및 국소섬유화에 대한 예방 및/또는 개선 효과를 가지는 것일 수 있다.

[19] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 근위축은 근감소증(Sarcopenia), 불용성 근위축(Disuse atrophy), 기계적 자극 부재에 의한 근위축, 신경 지배 상실성 근위축(Denervational atrophy), 약물유인성 근 위축(Drug induced atrophy), 영양결핍성 근위축(Malnutritional atrophy), 및 근이영양증(Muscular dystrophy)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

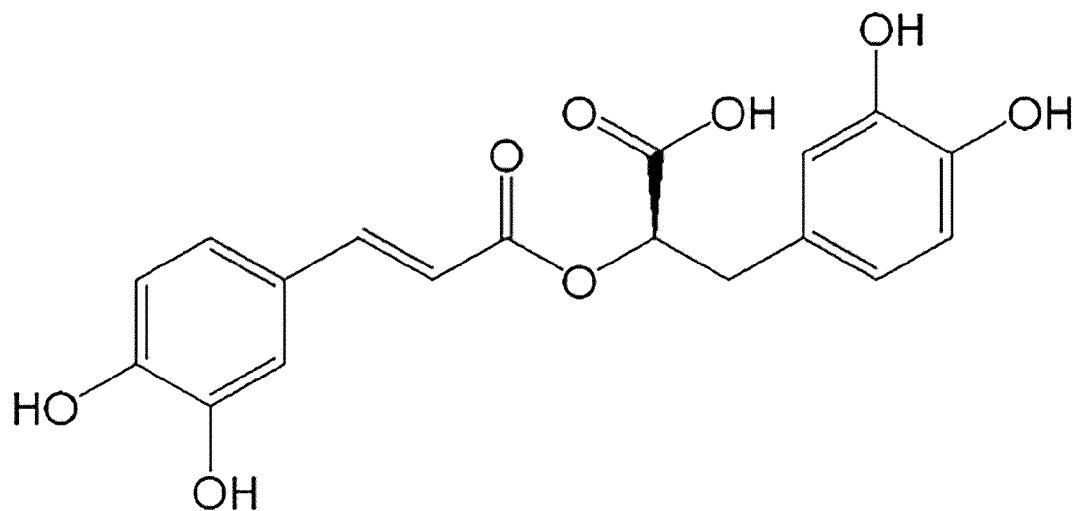
[20] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 근관세포에서 MuRF-1 및 Atrogin-1/MAFbx로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 발현을 감소시킬 수 있다.

[21] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 근관세포에서 p70S6K의 인산화를 증가시킬 수 있다.

[22] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 배암차즈기 추출물은 하기 [화학식 1]로 표시되는 로즈마린산(rosmarinic acid)을 유효성분으로 포함하는 것일 수 있다.

[23] [화학식 1]

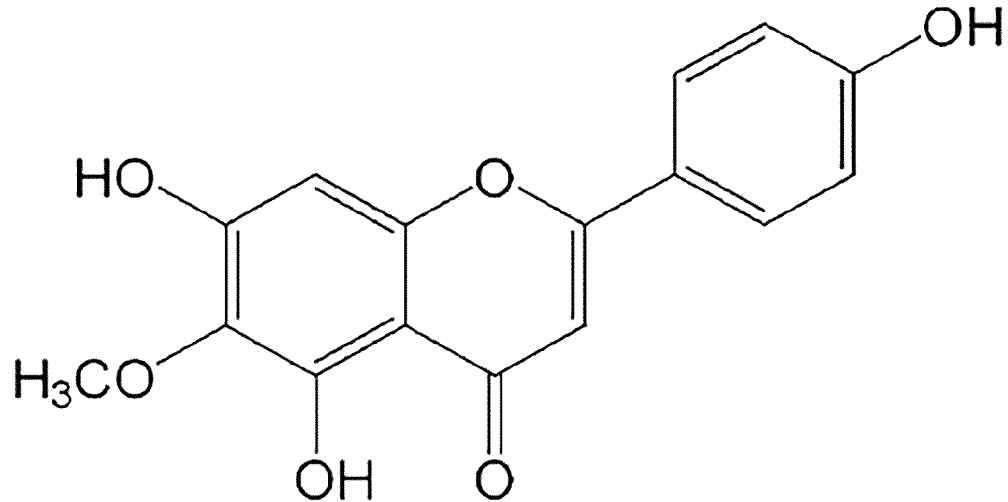
[24]



[25] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 배암차즈기 추출물은 하기 [화학식 2]로 표시되는 히스피둘린(hispidulin)을 유효성분으로 포함하는 것일 수 있다.

[26] [화학식 2]

[27]



[28] 또한, 본 발명은 배암차즈기 추출물을 유효성분으로 포함하는 근 손실 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[29] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 배암차즈기 추출물은 물(H₂O), C₁ 내지 C₄의 저급알코올, n-헥산, 에틸아세테이트, 아세톤, 부틸아세테이트, 1,3-부틸렌 글리콜, 메틸렌클로라이드, 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 용매로 추출된 것일 수 있으며, 바람직하게는 50% 에탄올을 용매로 추출된 것일 수 있다.

[30] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 근 손실은 근관세포의 직경 감소에 의한 질적 손실을 포함하는 의미이고, 근관세포의 수 감소에 의한 양적 손실을 모두 포함하는 의미일 수 있다.

[31] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 근관세포에서 MuRF-1 및 Atrogin-1/MAFbx로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 발현을 감소시킬 수 있다.

[32] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 근관세포에서 Akt의 인산화를 증가시킬 수 있다.

[33] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 배암차즈기 추출물은 상기 [화학식 1]로 표시되는 로즈마린산(rosmarinic acid)을 유효성분으로 포함하는 것일 수 있다.

[34] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 배암차즈기 추출물은 상기 [화학식 2]로 표시되는 히스피둘린(hispidulin)을 유효성분으로 포함하는 것일 수 있다.

[35]

[36] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 근위축 예방, 개선 또는 치료용 조성물 제조방법을 제공한다.

[37] (a) 건조된 배암차즈기를 분쇄하여 배암차즈기 분말을 제조하는 배암차즈기

분쇄단계; 및

- [38] (b) 상기 분쇄된 배암차즈기 분말을 물(H₂O), C1 내지 C4의 저급 알코올, n-헥산, 에틸아세테이트, 아세톤, 부틸아세테이트, 1,3-부틸렌 글리콜, 메틸렌클로라이드, 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 용매와 혼합하여 추출하는 단계.
- [39] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 (b)단계 이후, 추출된 추출물을 농축한 후 동결건조하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [40] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 근위축은 근감소증(Sarcopenia), 불용성 근위축(Disuse atrophy), 기계적 자극 부재에 의한 근위축, 신경 지배 상실성 근위축(Denervational atrophy), 약물유인성 근 위축(Drug induced atrophy), 영양결핍성 근위축(Malnutritional atrophy), 및 근이영양증(Muscular dystrophy)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [41] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 로즈마린산 및/또는 상기 화학식 2로 표시되는 히스피둘린을 유효성분으로 포함하는 근 위축 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [42] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 로즈마린산 및/또는 상기 화학식 2로 표시되는 히스피둘린을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 근 위축 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [43] 또한, 본 발명은 근위축의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 상기 화학식 1로 표시되는 로즈마린산 및/또는 상기 화학식 2로 표시되는 히스피둘린의 용도를 제공한다.
- [44] 한편, 본 발명의 예방 또는 치료 방법에 있어서 상기 개체는 근위축 질환의 유전적 소인이 있거나 근위축 질환 환자일 수 있다.
- [45] 또한, 본 발명의 일 구현예로서, 상기 예방 또는 치료 방법은 상기 투여 전 및/또는 후로 개체의 하기 (1) 내지 (6) 단계 중 1 이상의 단계를 추가로 수행하는 것일 수 있다:
- [46] (1) 개체의 근관세포의 직경 또는 개수의 측정
- [47] (2) 개체의 근육 내 염증 수준 측정
- [48] (3) 개체의 근육 세포 섬유화 관찰
- [49] (4) 개체의 근관세포에서 MuRF-1 및/또는 Atrogin-1/MAFbx의 발현 수준 측정
- [50] (5) 개체의 근관세포에서 Akt 인산화 수준 측정
- [51] (6) 개체의 운동능력 및/또는 근력 측정.

발명의 효과

- [52] 본 발명은 배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.) 추출물 또는 이의 유래 화합물인 로즈마린산(rosmarinic acid) 및/또는 히스피둘린(hispidulin)을 유효성분으로 포함하는 근위축 예방, 개선 또는 치료용 조성물 등에 관한 것으로서, 상기 추출물 또는 이의 유래 화합물은 근섬유 위축 관련 단백질의 발현을 저해하고,

근육 단백질 합성에 관여하는 단백질의 활성을 높여 근섬유 굵기 감소를 예방하며, 천연물 유래로 부작용이 거의 없고 안전성이 높으므로, 근위축을 예방 또는 치료하는데 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [53] 도 1은 본 발명의 배암차즈기 추출물의 HPLC 크로마토그래피 결과 및 이의 유래 화합물인 로즈마린산과 히스피둘린의 구조를 나타낸 것이다.
- [54] 도 2는 본 발명의 대조군, 텍사메타손(dexamethasone)을 처리하여 근위축을 유도한 음성 대조군, 배암차즈기 추출물 처리군, 및 텍사메타손과 배암차즈기 추출물 처리군에서 근관세포 C2C12 세포의 (A) 세포독성, (B) myosin heavy chain(MHC)의 염색 (C) myosin heavy chain의 면적, (D) 세포의 굵기 변화와 (E) Fusin index의 변화를 비교한 것이다.
- [55] 도 3은 본 발명의 대조군, 음성 대조군, 배암차즈기 추출물 처리군, 텍사메타손과 배암차즈기 처리군의 (A)western blot 결과, (B) myosin heavy chain의 발현 정도, (C) Atrogin-1/MAFbx, (D) MuRF-1와 (E) Akt의 인산화 정도를 나타낸 것이다.
- [56] 도 4는 본 발명의 대조군, 텍사메타손(dexamethasone)을 처리하여 근위축을 유도한 음성 대조군, 텍사메타손과 로즈마린산 처리군, 텍사메타손과 히스피둘린 처리군에서 근관세포 C2C12 세포의 굵기 변화를 비교한 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [57] 본 발명자들은 배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.) 추출물 또는 이의 유래된 화합물인 로즈마린산(rosmarinic acid) 및/또는 히스피둘린(hispidulin)에 대해 예의 연구한 결과, 상기 추출물 또는 화합물의 근비대 관련 단백질 발현 증가 및 골격근 감소 완화 효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [58] 보다 구체적으로, 근관세포 C2C12에서 텍사메타손을 처리하여 근위축을 유도한 후, 상기 추출물 또는 화합물을 처리한 결과 근관(myotube)의 직경이 증가하고, 근육 단백질 합성을 촉진하는 단백질의 인산화 및/또는 발현 정도가 회복된다는 점을 확인하였다.
- [59]
- [60] 상기 결과로부터, 본 발명은 배암차즈기 추출물 또는 이의 유래 화합물을 유효성분으로 포함하는 근위축 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [61] 본 발명에서 용어, "추출물(extract)"은 목적하는 물질을 다양한 용매에 침지한 다음, 상온 또는 가온상태에서 일정시간 동안 추출하여 수득한 액상성분, 상기 액상성분으로부터 용매를 제거하여 수득한 고형분 등의 결과물을 의미한다. 뿐만 아니라, 상기 결과물에 더하여, 상기 결과물의 희석액, 이들의 농축액, 이들의 조정제물, 정제물 등을 모두 포함하는 것으로 포괄적으로 해석될 수 있다.
- [62] 본 발명에 있어서, 상기 추출물은 배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.) 추출물로서

천연, 잡종, 변종식물의 다양한 기관으로부터 추출될 수 있고, 예를 들어 뿌리, 지상부, 줄기, 잎, 꽃잎, 꽃봉오리, 열매의 몸통, 열매의 껍질뿐만 아니라 식물 조직 배양물로부터 추출 가능하다.

- [63] 본 발명의 배암차즈기 추출물은 천연물로부터 추출물을 수득하는 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라, 즉, 통상적인 온도, 압력의 조건 하에서 통상적인 용매를 사용하여 추출할 수 있다. 예컨대, 상기 배암차즈기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, n-헥산, 에틸아세테이트, 아세톤, 부틸아세테이트, 1,3-부틸렌 글리콜, 메틸렌클로라이드, 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매를 사용하여 추출할 수 있으나, 근위축 예방 또는 치료효과를 갖는 추출물을 수득할 수 있는 한 특별히 제한되지 않는다. 다만, 바람직하게는 물과 탄소수 1 내지 4의 알코올의 혼합용매를 사용하여 추출할 수 있고, 이 경우 물과 알코올은 1:5 내지 1:1의 부피비로 혼합된 것일 수 있으나, 더욱 바람직하게는 50% 에탄올을 사용하여 추출할 수 있다. 배합비에 따라 방기의 근위축 개선효과가 있는 유효물질 추출효율이 달라질 수 있다.
- [64] 상기 추출물을 수득하기 위한 방법 역시 근위축의 예방 또는 치료효과를 갖는 추출물을 수득할 수 있는 한, 10 내지 25°C의 상온에서 추출하는 냉침추출법, 40 내지 100°C로 가열하여 추출하는 열수추출법, 초음파를 가하여 추출하는 초음파추출법, 환류냉각기를 이용한 환류추출법 동일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [65] 상기 제조된 추출물은 이후 여과하거나 농축 또는 건조과정을 수행하여 용매를 제거할 수 있으며, 여과, 농축 및 건조를 모두 수행할 수 있고, 여과, 농축 또는 건조 과정은 수 회 수행될 수 있다. 예컨대, 여과는 여과지를 이용하거나 감압여과기를 이용할 수 있으며, 농축은 감압 농축기, 건조는 분무 건조법, 동결건조법 등을 수행할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [66] 또한, 상기 용매로 추출한 추출물은 이후 부탄올, n-헥산, 메틸렌클로라이드, 아세톤, 에틸아세테이트, 에틸에테르, 클로로포름, 물, 또는 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매로 분획과정을 추가로 실시할 수도 있으나, 이에 제한되지 아니한다.
- [67] 이에, 본 발명은 (a) 건조된 배암차즈기를 분쇄하여 배암차즈기 분말을 제조하는 배암차즈기 분쇄단계; (b) 상기 분쇄된 배암차즈기 분말을 50% 에탄올의 용매로 추출하는 단계; 및 (c) 상기로부터 추출된 추출물을 농축한 후 동결건조하는 단계를 포함하는 근위축을 예방, 개선 또는 치료하는 배암차즈기 추출물의 제조방법을 제공한다.
- [68]
- [69] 본 발명에서 용어 "근위축"은 근육이 위축되거나 근육 점유의 수 또는 단면적의 감소로 근육량이 감소한 상태를 의미한다. 일반적으로 근위축은 근육 단백질의 감소에 의한 생리학적, 조직화학적 및 생화학적 변화를 동반하며 골격근의 고유 기능 장애를 초래할 수 있는데, 본 발명의 배암차즈기 추출물과

이의 유래 화합물인 로즈마린산 및/또는 히스피둘린은 근섬유의 활성을 상승시키고 근섬유를 보호하는 기능으로부터 상기 근위축으로부터 야기되는 골격근 고유 기능을 유지, 보존하는 목적으로 사용될 수 있다.

[70] 상기 근위축은 비제한적인 예로서, 상기 근위축은 근감소증(Sarcopenia), 불용성 근위축(Disuse atrophy), 기계적 자극 부재에 의한 근위축, 신경 지배 상실성 근위축(Denervational atrophy), 약물유인성 근 위축(Drug induced atrophy), 영양결핍성 근위축(Malnutritional atrophy), 근이영양증(Muscular dystrophy) 등을 포함한다.

[71] 상기 불용성 근위축은 노화·질병 등에 의한 활동 제약, 오랜 침상생활, 부목(cast) 또는 석고고정(Gips) 시행 등에 의해 근육의 두께가 감소하는 것을 포함하며, 말초신경 손상, 암, 패혈증 등의 다양한 임상 질환뿐만 아니라 장기간의 침상안정, 및 노화과정 등이 동반된다. 상기 기계적 자극 부재 및 신경 지배 상실성 근위축은 미토콘드리아의 양적 감소와 기능 이상을 초래하고, 미토콘드리아의 활성산소(Reactive oxygen species: ROS) 생성을 증가시켜, 산화적 손상에 의한 근육세포의 세포자살(apoptosis)에 의한 근위축을 유발한다. 상기 근이영양증은 유전자 돌연변이에 의해 횡문근 형질막 구성성분인 디스트로핀-당단백질 복합체 형성부재로 발생하는 근육 위축과 근력 약화를 주 증상으로 한다.

[72] 또한, 코티솔(cortisol)은 다양한 급성 스트레스가 원인이 되어 체내에서 분비될 수 있는 물질로, 스트레스에 대항하는 에너지를 공급해주는 역할을 하지만, 이의 기전에 따라 신체의 근육 위축을 야기하기도 한다. 또한, 합성 부신피질호르몬제는 이상 반응으로서 스테로이드성 근병증(steroid induced atrophy), 근육실질의 손상 등을 야기할 수 있다.

[73] 본 발명의 배암차즈기 추출물 또는 이의 유래 화합물을 포함하는 근위축 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 염증성 사이토카인의 발현을 감소시켜 간접적으로 근손실을 예방하는 것을 넘어 근섬유의 굵기 내지 근량을 증가시키고, 단백질 분해에 의한 근육 위축 유도를 억제함으로써 직접적으로 상술한 근위축을 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

[74]

[75] 본 발명에서 용어, "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 근위축의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"는 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 근위축 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[76] 본 발명에서 용어, "약학적 조성물"은 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 각각 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

- [77] 본 발명에서, "유효성분으로 포함"은 원하는 생물학적 효과를 실현하는데 필요하거나 또는 충분한 양으로 해당 성분이 포함되는 것을 의미한다. 실제 적용에 있어서 유효 성분으로 포함되는 양의 결정은 대상 질병을 치료하기 위한 양으로서, 다른 독성을 야기하지 않는 사항을 고려해서 결정될 수 있으며, 예를 들어 치료되는 질병 또는 병태, 투여되는 조성물의 형태, 피험체의 크기, 또는 질병 또는 병태의 심각도 등과 같은 다양한 인자에 따라서 변화될 수 있다. 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 기술을 지닌 기술자라면 과도한 실험을 동반하지 않고 개별적 조성물의 유효량을 경험적으로 결정할 수 있다.
- [78] 또한, 본 발명의 조성물은, 각각의 제형에 따라 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로오스 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 하나 이상의 혼합물일 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수도 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수도 있다. 더 나아가, 당분야의 적절한 방법으로, 또는 Remington's Pharmaceutical Science (Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수도 있다.
- [79] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 약학적으로 유효한 양으로 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 본 발명의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [80] 본 발명에서 용어, "개체"는 쥐, 가축, 생쥐, 인간 등 포유류일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [81] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에 투여를 위한 다양한 형태로 제형화 될 수 있으며, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 주사용 제형은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에서 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 각 성분을 식염수 또는 완충액에 용해시켜 주사용으로 제형화 될 수 있다. 또한, 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 섭취형 정제, 협착 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽 및 웨이퍼 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제 (예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신)와 활탁제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 포함할 수 있다. 상기 정제는 마그네슘 알루미늄

실리카이트, 전분페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 포함할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제, 흡수제, 착색제, 향미제 및/또는 감미제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

[82] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 결합제, 활택제, 붕해제, 착색제, 보존제, 감미제, 향미제, 안정화제, 희석제, 방부제, 수화제, 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 또는 완충제와 같은 보조제와 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 포함할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 제제화 될 수 있다.

[83] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 목적하는 효과를 상승시킬 수 있는 공지의 화합물과도 병행하여 투여할 수 있다.

[84] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로로는 경구적으로 또는 정맥 내, 피하, 비강 내 또는 복강 내 등과 같은 비경구적으로 사람과 동물에게 투여될 수 있다. 경구 투여는 설하 적용도 포함한다. 비경구적 투여는 피하주사, 근육 내 주사 및 정맥 주사와 같은 주사법 및 점적법을 포함한다.

[85]

[86] 한편, 본 발명은 상기 배암차즈기 추출물 또는 이의 유래 화합물인 로즈마린산 및/또는 히스피둘린을 유효성분으로 포함하는 근위축 및/또는 근감소 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물로 이용될 수 있다.

[87] 본 발명에서 용어, "건강기능식품 조성물"은 상기 배암차즈기 추출물 또는 이의 유래 화합물은 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다.

[88] 상기 건강기능식품 조성물은 육류, 곡류, 카페인 음료, 일반음료, 초콜렛, 빵류, 스낵류, 과자류, 피자, 젤리, 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올성 음료, 술, 비타민 복합제 및 그 밖의 건강보조식품류 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[89] 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.

[90]

[91] 실시예 1. 배암차즈기 추출물의 제조

[92] 건조된 배암차즈기 지상부를 구매하여 분쇄기를 통해 평균 입경 기준으로 0.30 내지 0.50 mm로 분쇄하고, 에탄올과 물의 50:50 혼합용매로 1 내지 4 시간동안 추출을 진행하였다. 추출물을 Rotary vaccum evaporator를 통해 농축한 후 Heto Power Dry LL3000을 이용하여 동결 건조하여 500 g의 배암차즈기, 279 g 원물로부터 14.9 g의 추출물을 수득하였다. 배암차즈기의 추출물의 구성성분 확인을 위하여 배암차즈기 추출물 및 로즈마린산(rosmarinic acid) 표준품과 히스피둘린(hispidulin) 표준품을 HPLC를 통하여 확인한 결과를 도 1에 나타내었다. 이 때, HPLC 조건은 하기 표 1과 같다.

[93] [표1]

Column	Shiseido Capcell Pak UG120 (4.6 x 250 mm, 5 μ m)
Solvent condition	acetonitrile with 0.1% formic acid (A), water with 0.1% formic acid (B), 0 min, 95% B; 10 min, 80% B; 55 min, 60% B.
Flow rate	1 ml/min
UV	254 nm

[94] 상기 HPLC 결과, 본 발명의 배암차즈기 추출물은 로즈마린산과 히스피둘린을 함유하고 있다는 점을 확인하였다(도 1).

[95]

[96] 실시예 2. *In vitro*에서 배암차즈기 추출물의 근위축 근위축 예방, 개선 또는 치료 효과 확인

[97] 2-1. C2C12 세포의 배양 및 분화 유도

[98] 본 실험에서 사용한 C2C12 mouse myoblast cell은 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 제공받았고, 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 성장배지로 사용하여 5% CO₂, 37°C 조건 하에서 배양하였다. C2C12 myoblast를 12 Well plate에 분주하고 배양하여 세포밀도가 80~85% 되었을 때, 분화배지(2% horse serum, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin이 포함된 DMEM)를 사용하여 이틀마다 새 배지로 교체해주며 6일동안 분화하였다.

[99]

[100] 2-2. 덱사메타손으로 근위축 유도 및 배암차즈기 추출물의 처리

[101] 덱사메타손(dexamethasone)은 근육의 합성 저해 및 단백질 분해를 야기하여 근육의 위축을 유도한다. 배암차즈기 추출물의 근위축 예방, 개선, 또는 치료의 효과를 확인하고자 상기 실시예 2-1에서 분화를 유도한 C2C12 세포에 상기 덱사메타손을 처리하여 근위축을 유도하고 근위축이 유도된 세포에 배암차즈기

추출물을 처리하였다. 구체적인 실험 조건은 다음과 같다.

- [102] (1) 대조군(control)은 분화가 완료된 C2C12 근관세포에 1% Penicillin만 첨가된 분화배지를 24시간동안 처리하여 제작하였다.
- [103] (2) 음성 대조군(negative control)으로서 텍사메타손 처리군은 1% Penicillin이 첨가된 분화배지를 10 μ M의 Dexamethasone 조성이 갖춰지도록 제조 후, 분화가 완료된 C2C12 근관세포에 24시간동안 처리하여 제작하였다.
- [104] (3) 텍사메타손 및 배암차즈기 추출물 처리군은 상기 (2)의 음성 대조군과 같은 조건에서 추가적으로 배암차즈기 추출물 1, 5, 10 μ g/mL의 조성으로 24시간동안 처리하여 제작하였다.

[105]

[106] 2-3. C2C12 myotube의 생존율 평가

- [107] 배암차즈기 추출물이 텍사메타손에 의한 세포 생존율 감소 작용을 회복하는지를 확인하기 위하여 C2C12 근관세포에 1, 5, 10 μ g/ml 농도의 배암차즈기 추출물과 10 μ M 텍사메타손을 동시에 처리하였다. 24시간 후에 CCK-8 kit를 이용하여 cell viability를 측정하였다.

[108] [표2]

Group	세포 생존율 (%)
대조군	100
텍사메타손	81.19 ^a
텍사메타손 + 배암차즈기 1 μ g/mL	84.64
텍사메타손 + 배암차즈기 5 μ g/mL	83.80
텍사메타손 + 배암차즈기 10 μ g/mL	86.56 ^b

- [109] ^a: 대조군 대비 유의미 ($p < 0.005$), ^b Dex 처리군 대비 유의미 ($p < 0.05$)

- [110] 상기 실험 결과, 텍사메타손 처리에 의해 C2C12 근관세포 생존율은 81.19%로 감소하였으나, 배암차즈기 10 μ g/mL을 처리하였을 때 6.6% 증가함을 확인하였다 (표 2 및 도 2A).

[111]

[112] 2-4. MyHC 양성 근관세포 (positive myotube) 분석, C2C12 myotube diameter의 측정 및 다핵성 근관세포 형성 지수 (Fusion index) 분석

- [113] 상기 실시예 2-2에서 24시간 동안 시료를 처리한 각 대조군과 실험군을 myosin heavy chain(MyHC)을 면역형광 염색을 한 후 결과를 녹색으로 시각화 하고 Hoechst33342로 표지된 세포 핵은 청색으로 시각화 하였다. 이를 Automated cell imaging system인 JuLiomated를 사용하여 촬영하고, ImageJ를 이용하여 분석하였다. 촬영을 마친 각 세포들의 굵기를 세포군당 50개씩 측정하여 평균을 구하였으며, 다핵성(multinucleated)인 근관세포수를 분석한 후, 총 세포수 (total cells)를 적용하여 각 세포에서의 상대적 multinucleated-MHC양성

근관세포수(MHC-positive myotubes)를 산출하였다. 각 실험은 3회 반복하여 수행하였다.

[114] [표3]

Group	MyHC positive area	Diameter	Fusion index
대조군	1.00	1.00	1.00
텍사메타손	0.87 ^a	0.73 ^b	0.72 ^b
텍사메타손 + 배암차즈기 1 $\mu\text{g/mL}$	1.00 ^c	0.88 ^c	0.92 ^d
텍사메타손 + 배암차즈기 5 $\mu\text{g/mL}$	1.03 ^c	0.95 ^c	0.97 ^d
텍사메타손 + 배암차즈기 10 $\mu\text{g/mL}$	1.01 ^c	0.94 ^c	0.92 ^d

[115] ^a대조군 대비 유의미 ($p < 0.01$), ^b대조군 대비 유의미 ($p < 0.005$), ^cDex 처리군 대비 유의미 ($p < 0.005$), ^dDex 처리군 대비 유의미 ($p < 0.01$)

[116]

[117] 상기 실험 결과, 텍사메타손 처리에 의해 C2C12 myotube의 myosin heavy chain (MyHC) positive area, 세포의 지름(diameter), fusion index가 감소하였으나, 배암차즈기 추출물에 의하여 개선되었다 (표 3, 도2(B)-도2(E)).

[118] 보다 구체적으로, (1) 기본 분화배지 투여군인 대조군에 비하여 텍사메타손 10 μM 투여군에서 C2C12 근관세포의 염색된 myosin heavy chain 면적은 13% 감소($p < 0.01$)하였으며, 굵기는 27%($p < 0.005$), fusion index는 28%($p < 0.005$) 감소하였다. (2) 기본 분화배지에 텍사메타손을 투여한 음성 대조군에 비하여 추가적으로 배암차즈기 5 $\mu\text{g/mL}$ 를 투여한 군에서 C2C12 근관세포의 myosin heavy chain 면적은 18.4%($p < 0.005$), 굵기는 30.1%($p < 0.005$), fusion index는 34.7%($p < 0.005$) 증가하였다. 따라서, 본 발명의 배암차즈기 추출물은 텍사메타손으로 유도된 근위축 모델에서 유의미한 회복률을 보이는 것을 확인하였다.

[119]

[120] 2-5. 관련 단백질 확인

[121] 상기 실시예 2-2에서 24시간 동안 시료를 처리한 각 대조군과 실험군들을 근위축/합성의 경로에 작용하는 MyHC, Atrogin-1/MAFbx, MuRF1, Akt, p-Akt 단백질을 웨스턴 블로팅(Western blotting)을 이용하여 확인하였다.

[122] 상기 대조군과 실험군에서 myosin heavy chain (MyHC), Atrogin-1/MAFbx, MuRF1, Akt, p-Akt의 발현량을 하기 표 4에 나타내었다.

[123] 실험 결과, 텍사메타손 처리에 의하여 C2C12 myotubes에서 myosin heavy chain

(MyHC) 단백질은 감소하며, Atrogin-1/MAFbx과 MuRF-1의 단백질은 증가하고, Akt의 인산화 정도는 감소하는 것을 확인하였다. 배암차즈기 추출물 처리에 의하여 감소된 MyHC는 증가하였으며, 증가된 Atrogin-1/MAFbx과 MuRF-1의 단백질은 감소하고, Akt의 인산화 정도가 개선되는 결과를 확인하였다. (표 4 및 도 3).

[124] [표4]

Group	MyHC	Atrogin-1/MAFbx	MuRF1	p-Akt/t-Akt
대조군	1.00	1.00	1.00	1.00
덱사메타손	0.62 ^a	1.16 ^a	1.69 ^a	0.66 ^a
덱사메타손 + 배암차즈기 1 µg/mL	0.90 ^b	1.04	1.54	0.91 ^b
덱사메타손 + 배암차즈기 5 µg/mL	0.81 ^b	0.90	1.32 ^b	0.73
덱사메타손 + 배암차즈기 10 µg/mL	0.82 ^b	0.64 ^b	0.95 ^b	0.88 ^b

[125] ^a대조군 대비 유의미 ($p < 0.05$), ^bDex 처리군 대비 유의미 ($p < 0.05$)

[126]

[127] 보다 구체적으로, (1) 기본 분화배지 투여군인 대조군에 비하여 덱사메타손 10 µg/mL 투여군에서 myosin heavy chain (MyHC)은 38% 감소하였고, Atrogin-1/MAFbx, MuRF1는 각각 16%, 69% 증가하였으며, Akt의 인산화정도(p-Akt/t-Akt)는 38% 감소하였다. (2) 덱사메타손 투여군 대비 배암차즈기 10 µg/mL를 투여한 군에서 myosin heavy chain (MyHC)은 32.2% 증가하였으며, Atrogin-1/MAFbx는 44.8배 감소하였고 MuRF1은 43.8배 감소하였다. 또한 배암차즈기 추출물의 처리에 의하여 Akt의 인산화정도(p-Akt/t-Akt)는 33.3배 증가하였다. 따라서, 본 발명의 배암차즈기 추출물은 덱사메타손에 의한 근세포의 위축을 개선하고 근위축인자의 활성화를 억제하는 것을 확인하였다.

[128]

[129] 실시예 3. *In vitro*에서 배암차즈기 유래 화합물의 근위축 예방, 개선 또는 치료 효과 확인

[130] 3-1. 덱사메타손으로 근위축 유도 및 배암차즈기 유래 화합물의 처리

[131] 배암차즈기 유래 화합물의 근위축 예방, 개선, 또는 치료의 효과를 확인하고자 상기 실시예 2-1에서 분화를 유도한 C2C12 세포에 덱사메타손을 처리하여 근위축을 유도하고 근위축이 유도된 세포에 배암차즈기 추출물에서 유래된 화합물인 로즈마린산 또는 히스피둘린을 처리하였다. 구체적인 실험 조건은 다음과 같다.

- [132] (1) 대조군(control)은 분화가 완료된 C2C12 근관세포에 1% Penicillin만 첨가된 분화배지를 48시간동안 처리하여 제작하였다.
- [133] (2) 음성 대조군(negative control)으로서 텍사메타손 처리군은 1% Penicillin이 첨가된 분화배지를 1 μ M의 Dexamethasone 조성이 갖춰지도록 제조 후, 분화가 완료된 C2C12에 48시간동안 처리하여 제작하였다.
- [134] (3) 텍스메타손 및 로즈마린산 처리군은 상기 (2)의 음성 대조군과 같은 조건에서 추가적으로 로즈마린산 30 μ M의 조성으로 48시간동안 처리하여 제작하였다.
- [135] (4) 텍스메타손 및 히스피둘린 처리군은 상기 (2)의 음성 대조군과 같은 조건에서 추가적으로 로즈마린산 30 μ M의 조성으로 48시간동안 처리하여 제작하였다.

[136]

[137] 3-2. C2C12 myotube diameter의 측정

- [138] 상기 실시예 3-1에서 48시간 동안 시료를 처리한 각 대조군과 실험군들을 Automated cell imaging system인 JuLi™Stage를 사용하여 촬영하고, Cell processing program인 ImageJ를 이용하여 촬영을 마친 각 세포들의 굵기를 세포군당 50개씩 측정하여 평균과 표준오차를 구해 데이터 정리하였다(표 5). 각 실험은 3회 반복하여 수행하였다.

[139] [표5]

	대조군	Dex 처리군	Dex +로즈마린 산	Dex +히스피둘린
C2C12 근관세포의 상대 굵기(% of control)	100%	77.4%	100.6%	104.3%

[140] (Dex : 텍사메타손 (1 μ M), 로즈마린산, 히스피둘린 (30 μ M))

[141]

- [142] 상기 실험 결과, 텍사메타손 처리에 의해 C2C12 myotube의 굵기가 감소하며, 배암차즈기 유래 화합물인 로즈마린산 또는 히스피둘린 처리에 의해 개선 효과가 나타난다는 것을 확인하였다(표 5 및 도 5).

- [143] 보다 구체적으로, (1) 기본 분화배지 투여군인 대조군에 비하여 텍사메타손 1 μ M 투여군에서 C2C12 근관세포의 굵기가 22.6% 감소하였다. (2) 기본 분화배지에 텍사메타손을 투여한 음성 대조군에 비하여 추가적으로 로즈마린산 30 μ M을 투여한 군에서 C2C12 근관세포의 굵기가 23.2% 증가하였다. (3) 기본 분화배지에 텍사메타손을 투여한 음성 대조군에 비하여 추가적으로 히스피둘린 30 μ M을 투여한 군에서 C2C12 근관세포의 굵기가 26.9% 증가하였다.

- [144] 따라서, 본 발명의 배암차즈기 추출물에서 유래한 로즈마린산과 히스피둘린 처리 시 각각 텍사메타손으로 유도된 근위축 모델에서 근관세포의 굵기가

증가하는바, 근위축 예방, 개선 또는 치료 효능을 보이는 것을 확인하였다.

[145]

[146] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

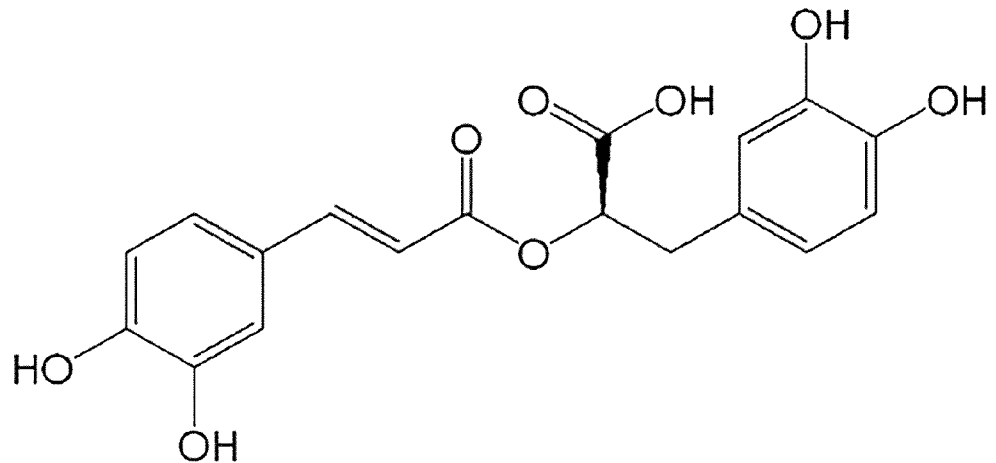
산업상 이용가능성

[147]

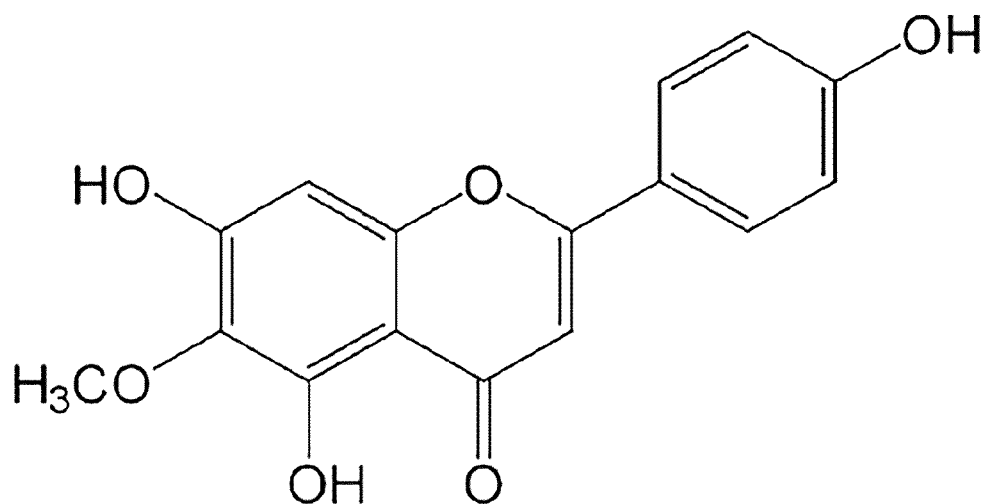
본 발명은 배암차즈기 추출물과 이의 유래인 로즈마린산 및 히스피둘린의 근 위축 관련 단백질의 발현 감소, 근육 단백질 합성 관련 단백질의 활성 증가 효과 등을 확인하였는바, 천연물 유래의 근 위축 질환의 예방 또는 치료용 의약품, 의약외품, 향장소재, 기능성 식품 소재 등에 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

청구범위

- [청구항 1] 배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.) 추출물을 유효성분으로 포함하는 근위축 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 배암차즈기 추출물은 물(H₂O), C₁ 내지 C₄의 저급 알코올, n-헥산, 에틸아세테이트, 아세톤, 부틸아세테이트, 1,3-부틸렌 글리콜, 메틸렌클로라이드, 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 용매로 추출된 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 배암차즈기 추출물은 50% 에탄올을 용매로 추출된 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 근위축은 근감소증(Sarcopenia), 불용성 근위축(Disuse atrophy), 기계적 자극 부재에 의한 근위축, 신경 지배 상실성 근위축(Denervational atrophy), 약물유인성 근 위축(Drug induced atrophy), 영양결핍성 근위축(Malnutritional atrophy), 및 근이영양증(Muscular dystrophy)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 근위축인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 근관세포에서 MuRF-1 및 Atrogin-1/MAFbx로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 근관세포에서 Akt의 인산화를 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 배암차즈기 추출물은 하기 [화학식 1]로 표시되는 로즈마린산(rosmarinic acid)을 유효성분으로 포함하는, 근위축 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
[화학식 1]



- [청구항 8] 제1항에 있어서,
 상기 배암차즈기 추출물은 하기 [화학식 2]로 표시되는
 히스피둘린(hispidulin)을 유효성분으로 포함하는, 근위축 예방 또는
 치료용 약학적 조성물.
 [화학식 2]



- [청구항 9] 배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.) 추출물을 유효성분으로 포함하는 근
 손실 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

- [청구항 10] 제9항에 있어서,
 상기 배암차즈기 추출물은 물(H₂O), C₁ 내지 C₄의 저급 알코올, n-헥산,
 에틸아세테이트, 아세톤, 부틸아세테이트, 1,3-부틸렌 글리콜,
 메틸렌클로라이드, 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된
 하나 이상의 용매로 추출된 것을 특징으로 하는, 건강기능식품 조성물.

- [청구항 11] 제9항에 있어서,
 상기 근 손실은 근관세포의 직경 감소에 의한 질적 손실 및 근관세포의 수
 감소에 의한 양적 손실을 포함하는 것을 특징으로 하는, 건강기능식품

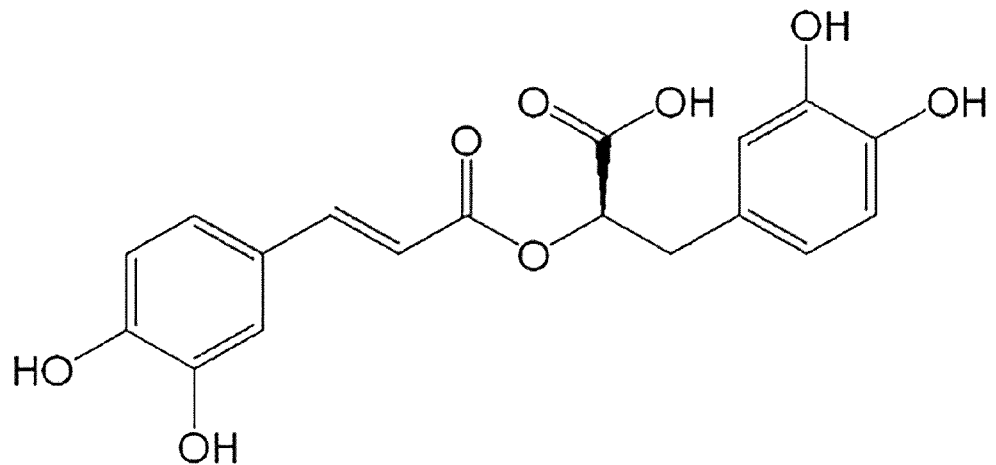
조성물.

[청구항 12] 제9항에 있어서,
상기 조성물은 근관세포에서 MuRF-1 및 Atrogin-1/MAFbx로 이루어진
군으로부터 선택되는 하나 이상의 발현을 감소시키는 것을 특징으로
하는, 건강기능식품 조성물.

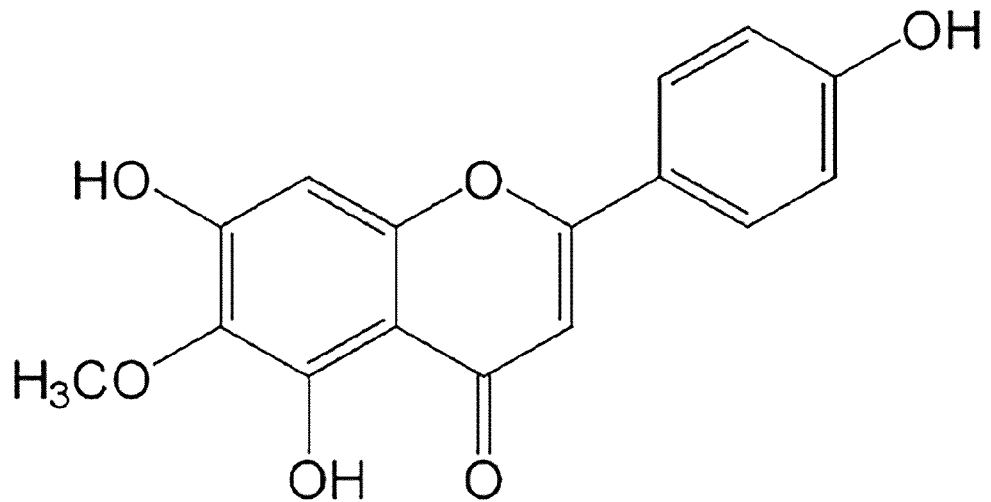
[청구항 13] 제9항에 있어서,
상기 조성물은 근관세포에서 Akt의 인산화를 증가시키는 것을 특징으로
하는, 건강기능식품 조성물.

[청구항 14] 제9항에 있어서,
상기 배암차즈기 추출물은 하기 [화학식 1]로 표시되는
로즈마린산(rosmarinic acid)을 유효성분으로 포함하는, 건강기능식품
조성물.

[화학식 1]

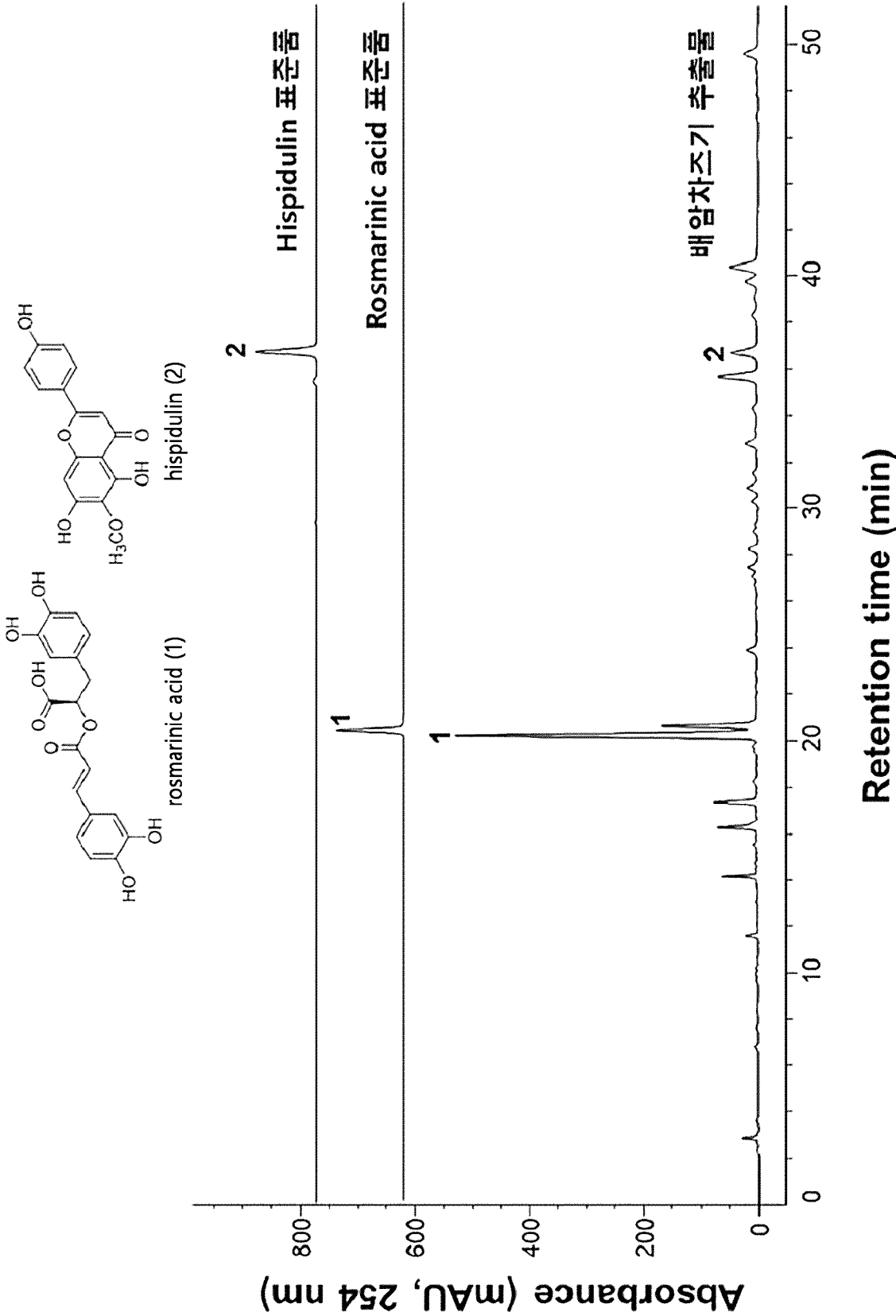


[청구항 15] 제9항에 있어서,
상기 배암차즈기 추출물은 하기 [화학식 2]로 표시되는
히스피둘린(hispidulin)을 유효성분으로 포함하는, 건강기능식품 조성물.
[화학식 2]

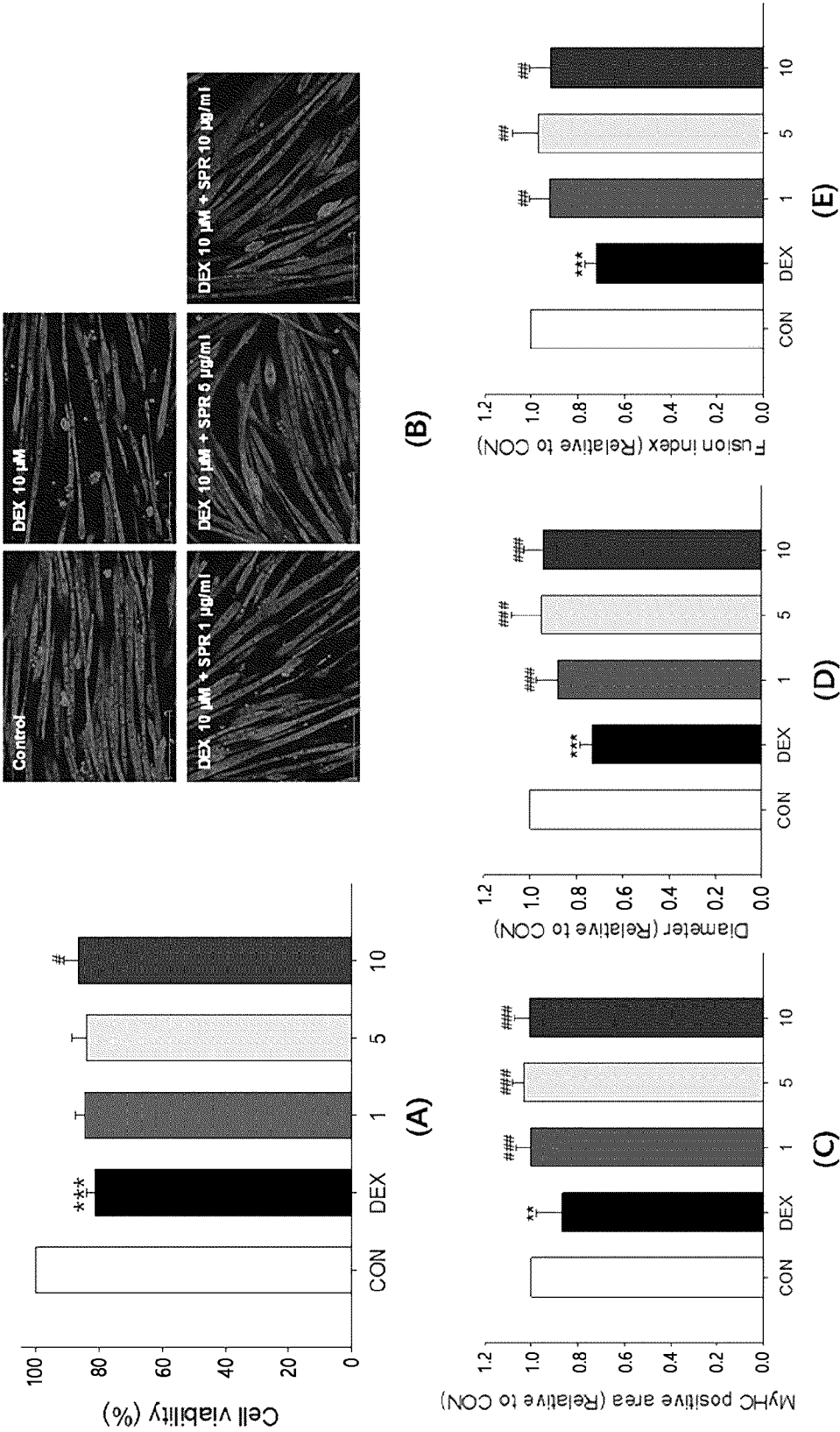


- [청구항 16] 하기 단계를 포함하는 근위축 예방, 개선 또는 치료용 조성물의 제조방법:
 (a) 건조된 배암차즈기를 분쇄하여 배암차즈기 분말을 제조하는 배암차즈기 분쇄단계; 및
 (b) 상기 분쇄된 배암차즈기 분말을 물(H₂O), C₁ 내지 C₄의 저급 알코올, n-헥산, 에틸아세테이트, 아세톤, 부틸아세테이트, 1,3-부틸렌 글리콜, 메틸렌클로라이드, 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 용매와 혼합하여 추출하는 단계.
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
 상기 (b)단계 이후, 추출된 추출물을 농축한 후 동결건조하는 단계를 추가적으로 포함하는, 제조방법.
- [청구항 18] 배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.) 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 근위축 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 19] 근위축의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 배암차즈기(*Salvia plebeia* R. Br.) 추출물의 용도.

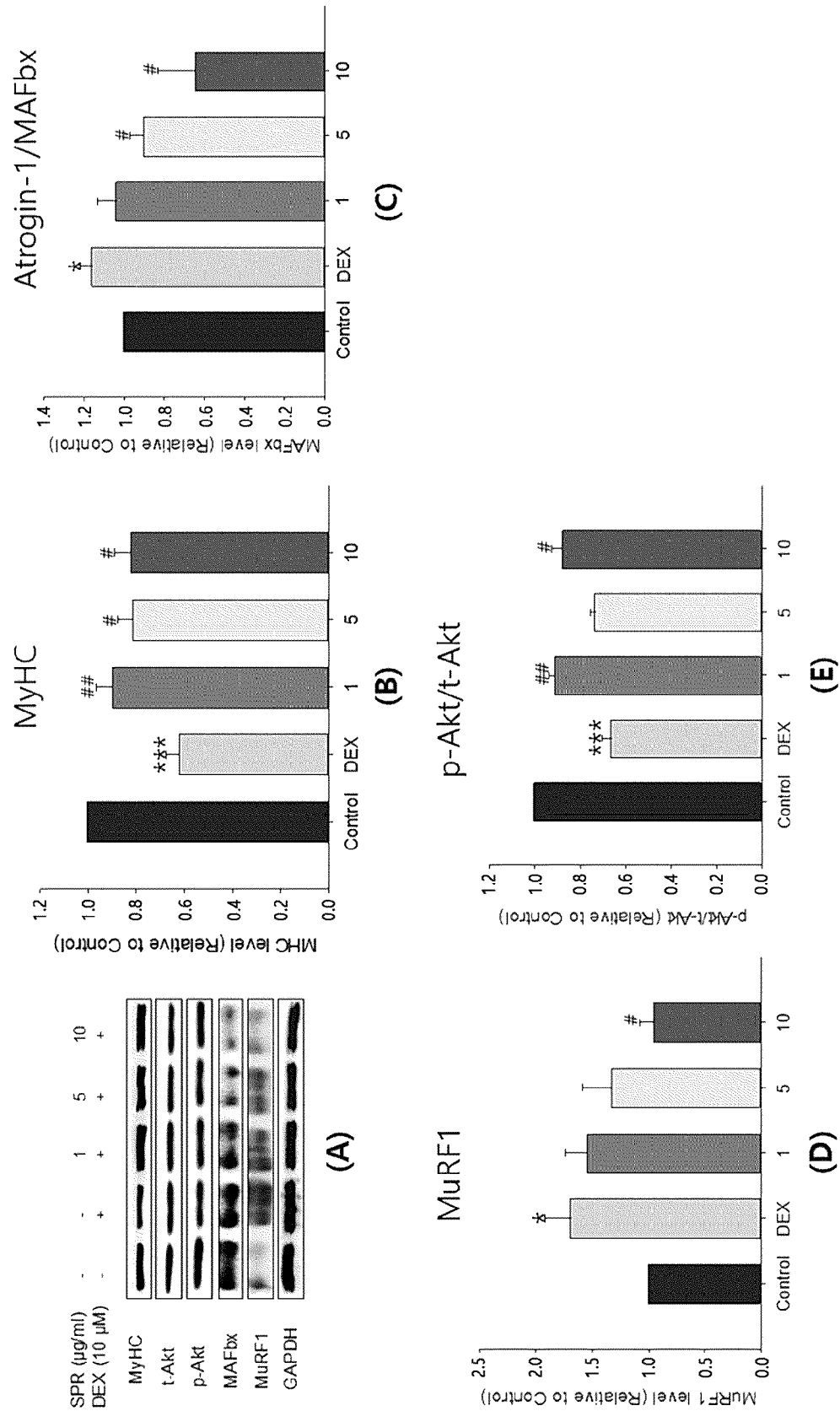
[도1]



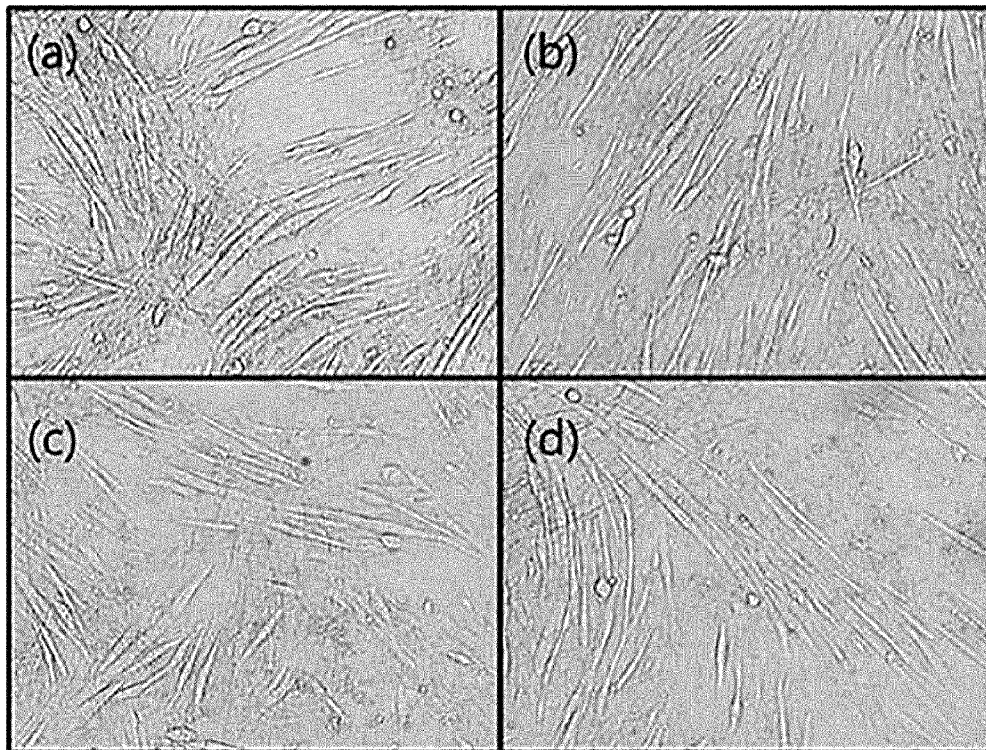
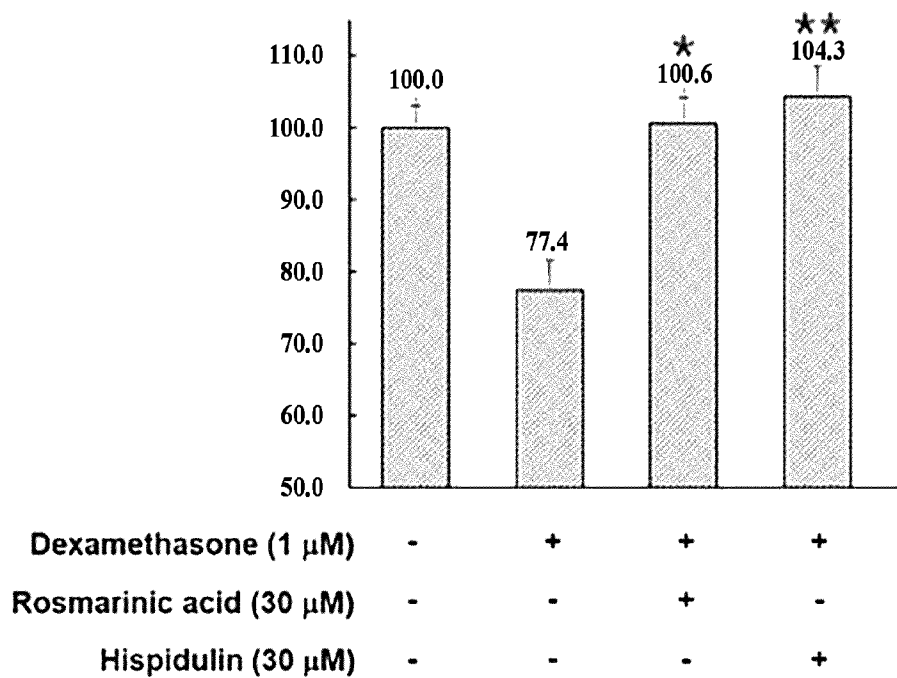
[도2]



[Figure 3]



[도4]

**(A)****(B)**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/004284

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 36/537(2006.01)i; A61K 31/216(2006.01)i; A61K 31/352(2006.01)i; A61P 21/00(2006.01)i; A23L 33/105(2016.01)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)

A61K 36/537(2006.01); A23L 33/105(2016.01); A61K 31/192(2006.01); A61K 31/216(2006.01); A61K 36/31(2006.01); A61K 36/53(2006.01); A61P 1/00(2006.01); A61P 29/00(2006.01)

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), Google & keywords: 배암차즈기(salvia plebeia R. Br.), 근위축(muscular dystrophy), 로즈마린산(rosmarinic acid), 히스피둘린(hispidulin)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2013-0129868 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 29 November 2013 (2013-11-29) See paragraphs [0001], [0012]-[0014], [0025], [0062] and [0063]; and claims 1, 2, 5, 6 and 13.	1-6,9-13,16,17,19
Y		7,8,14,15
Y	신한재 등. 3종의 배암차즈기에 대한 염증억제 활성 비교 및 활성성분 구명. 한약작지. 2016, vol. 24, no. 5, pp. 401-407 (SHIN, Han Jae et al. Anti-Inflammatory Activity of Three Kinds of Salvia and Its Active Compounds. Korean Journal of Medicinal Crop Science.) See pages 404-405.	7,8,14,15
A	JP 2009-256282 A (NAGASE & CO., LTD.) 05 November 2009 (2009-11-05) See paragraphs [0001], [0003], [0011] and [0021]; and claims 1, 3 and 4.	1-17,19
A	US 2012-0196929 A1 (LAURENT, D. et al.) 02 August 2012 (2012-08-02) See claims 9 and 11-13.	1-17,19

☒ 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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

04 July 2022

Date of mailing of the international search report

04 July 2022

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/004284**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RAHBARDAR, M. G. et al. Effects of rosmarinic acid on nervous system disorders: an updated review. Naunyn-schmiedeberg's archives of pharmacology. 2020, vol. 393, no. 10, pp. 1779-1795. See abstract; and page 1787.	1-17,19
A	KR 10-2020-0104749 A (CHONG KUN DANG HEALTHCARE CORP.) 04 September 2020 (2020-09-04) See entire document.	1-17,19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/004284

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 18 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/004284

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2013-0129868	A	29 November 2013	CN	104349787	A	11 February 2015
				CN	104349787	B	15 February 2019
				EP	2878305	A1	03 June 2015
				EP	2878305	A4	25 November 2015
				EP	2878305	B1	19 July 2017
				JP	2015-518861	A	06 July 2015
				JP	6117915	B2	19 April 2017
				KR	10-1487935	B1	02 February 2015
				US	2015-0174186	A1	25 June 2015
				WO	2013-176471	A1	28 November 2013
JP	2009-256282	A	05 November 2009	None			
US	2012-0196929	A1	02 August 2012	AU	2010-277458	A1	01 March 2012
				AU	2010-277458	B2	12 January 2017
				AU	2016-273875	A1	05 January 2017
				EP	2459188	A1	06 June 2012
				FR	2948567	A1	04 February 2011
				FR	2948567	B1	03 November 2017
				JP	2013-500953	A	10 January 2013
				JP	5995235	B2	21 September 2016
				US	9060985	B2	23 June 2015
				WO	2011-012780	A1	03 February 2011
KR	10-2020-0104749	A	04 September 2020	None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 36/537(2006.01)i; A61K 31/216(2006.01)i; A61K 31/352(2006.01)i; A61P 21/00(2006.01)i; A23L 33/105(2016.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 36/537(2006.01); A23L 33/105(2016.01); A61K 31/192(2006.01); A61K 31/216(2006.01); A61K 36/31(2006.01); A61K 36/53(2006.01); A61P 1/00(2006.01); A61P 29/00(2006.01) 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), 구글 & 키워드: 배암차즈기(salvia plebeia R. Br.), 근위축 (muscular dystrophy), 로즈마린산(rosmarinic acid), 히스피둘린(hispidulin)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2013-0129868 A (한국생명공학연구원) 2013.11.29 단락 [0001], [0012]-[0014], [0025], [0062], [0063]; 청구항 1, 2, 5, 6, 13	1-6,9-13,16,17,19
Y		7,8,14,15
Y	신한재 등, "3종의 배암차즈기에 대한 염증억제 활성 비교 및 활성성분 구명", 한약작지, 2016, 24권, 5호, 페이지 401-407 페이지 404-405	7,8,14,15
A	JP 2009-256282 A (NAGASE & CO., LTD.) 2009.11.05 단락 [0001], [0003], [0011], [0021]; 청구항 1, 3, 4	1-17,19
A	US 2012-0196929 A1 (LAURENT, D. 등) 2012.08.02 청구항 9, 11-13	1-17,19
A	RAHBARDAR, M. G. 등, "Effects of rosmarinic acid on nervous system disorders: an updated review", Naunyn-schmiedeberg's archives of pharmacology, 2020, 393권, 10호, 페이지 1779-1795 초록; 페이지 1787	1-17,19
☒ 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 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2022년07월04일(04.07.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년07월04일(04.07.2022)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2020-0104749 A (종근당건강 주식회사) 2020.09.04 전체 문헌	1-17,19

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: **18**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 18은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0129868 A	2013/11/29	CN 104349787 A	2015/02/11
		CN 104349787 B	2019/02/15
		EP 2878305 A1	2015/06/03
		EP 2878305 A4	2015/11/25
		EP 2878305 B1	2017/07/19
		JP 2015-518861 A	2015/07/06
		JP 6117915 B2	2017/04/19
		KR 10-1487935 B1	2015/02/02
		US 2015-0174186 A1	2015/06/25
		WO 2013-176471 A1	2013/11/28
JP 2009-256282 A	2009/11/05	없음	
US 2012-0196929 A1	2012/08/02	AU 2010-277458 A1	2012/03/01
		AU 2010-277458 B2	2017/01/12
		AU 2016-273875 A1	2017/01/05
		EP 2459188 A1	2012/06/06
		FR 2948567 A1	2011/02/04
		FR 2948567 B1	2017/11/03
		JP 2013-500953 A	2013/01/10
		JP 5995235 B2	2016/09/21
		US 9060985 B2	2015/06/23
		WO 2011-012780 A1	2011/02/03
KR 10-2020-0104749 A	2020/09/04	없음	