



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0066091
(43) 공개일자 2017년06월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/201 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/201 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0172678
(22) 출원일자 2015년12월04일
심사청구일자 2015년12월04일

(71) 출원인
연세대학교 원주산학협력단
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
(72) 발명자
김택중
강원도 원주시 흥업면 분지동1길 46-11
김한성
강원도 원주시 관부면 시청로 264, 108동 602호
(원주더샵아파트)
이명현
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1, 미래관 416호
(74) 대리인
특허법인미주

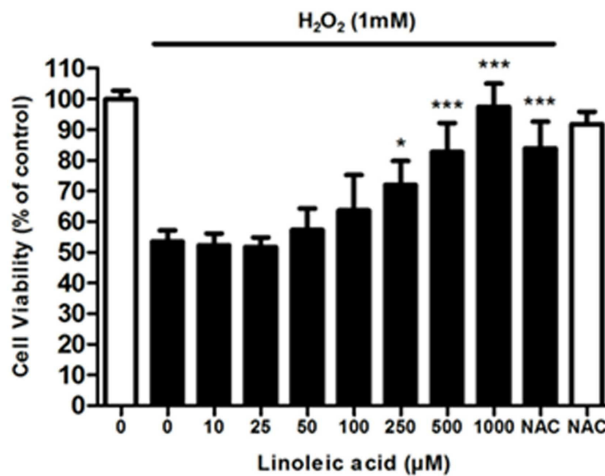
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 리놀레산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 근육손실 예방 및 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 리놀레산(linoleic acid) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근위축증(muscle atrophy) 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 리놀레산은 산화스트레스(Oxidative stress)에 의한 근육세포의 손상 및 세포사멸을 억제하여 현저한 근위축 치료효과를 나타내므로, 본 발명의 리놀레산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 근위축증 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)
A23V 2250/1872 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2010-00757
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	해외우수연구기관유치사업
연구과제명	Fraunhofer IZFP-Yonsei BME Joint Research Center 유치사업
기여율	1/1
주관기관	연세대학교(원주캠퍼스)
연구기간	2015.09.01 ~ 2016.08.31

명세서

청구범위

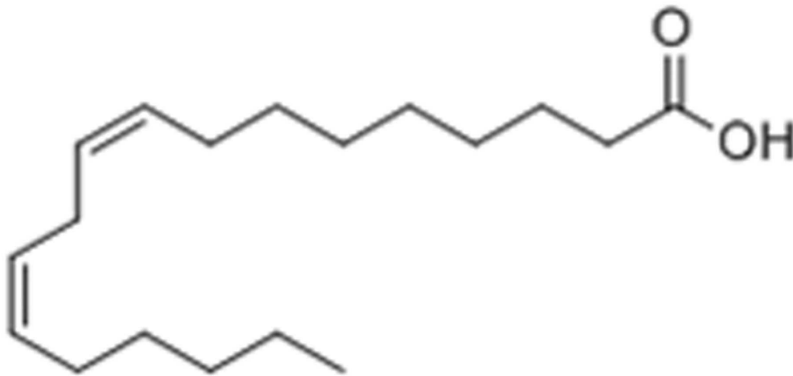
청구항 1

리놀레산(linoleic acid) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근위축증(muscle atrophy) 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 리놀레산은 하기 [화학식 1]로 기재되는 화학식을 갖는 것을 특징으로 하는 근위축증 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 리놀레산은 근육세포 손상 또는 근육세포 사멸을 억제하는 것을 특징으로 하는 근위축증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 근위축증은 근육을 사용하지 않음으로써 발생하는 근육 조직의 손실로 인한 근위축, 근육 자체의 병으로 인한 근위축 또는 근육을 지배하는 신경의 손상으로 인한 근위축인 것을 특징으로 하는 근위축증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 근육을 사용하지 않음으로써 발생하는 근육 조직의 손실로 인한 근위축은 무용성근위축(disuse atrophy)인 것을 특징으로 하는 근위축증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 근육 자체의 병으로 인한 근위축은 중증 근무력증(myasthenia gravis) 또는 근이영양증(dystrophy)인 것을 특징으로 하는 근위축증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제 4항에 있어서, 근육을 지배하는 신경의 손상으로 인한 근위축은 척수성 근위축(spinal muscular amyotrophy), 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 및 척수구근 근위축(sphingobular muscular atrophy)으로 구성된 군으로 부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 근위축증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

리놀레산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근위축증 예방 및 개선용 건강식품.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 리놀레산은 근육세포 손상 또는 근육세포 사멸을 억제하는 것을 특징으로 하는 근위축증 예방 및 개선용 건강식품.

청구항 10

제 8항에 있어서, 상기 근위축증은 근육을 사용하지 않음으로써 발생하는 근육 조직의 손실로 인한 근위축, 근육 자체의 병으로 인한 근위축 또는 근육을 지배하는 신경의 손상으로 인한 근위축인 것을 특징으로 하는 근위축증 예방 및 개선용 건강식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 리놀레산(linoleic acid) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근위축증(muscle atrophy) 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 근위축(muscle atrophy)은 근육의 사용 감소와 같은 기계적 자극의 부재에 의한 근육 조직의 손상, 직접적인 상해나 물리적 요인에 의한 근육의 파괴, 노화에 의한 근육 세포의 회복력 장애, 그리고 근육의 작용을 조절하는 신경의 손상으로 인한 근육 사용의 장애와 같은 요인에 의해 발생한다(Booth FW., J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol., 1982). 일반적인 경우 장애나 사고에 의해 장기간 해당 부위와 주변부의 근육을 사용하지 않아 근육 강도의 소실로 인해 점차 근위축으로 진행되는 무용성근위축(disuse atrophy)이 나타나며, 근육 자체의 질병으로 인한 중증 근무력증(myasthenia gravis), 근이영양증(dystrophy): 진행성 근이영양증, 근긴장성 근이영양증, 듀센형, 베커형, 지대형, 안면견갑상완형, 근육 자체에 발생하는 염증, 근육을 지배하는 신경의 손상으로 인한 근위축인 척수성 근위축(spinal muscular amyotrophy) : 베라드니히-호프만형, 쿠젤베르그, 벨란더병, 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS) : 루게릭병, 척수구근 근위축(sphingobular muscular atrophy) : 케네디병 등의 형태로도 발병된다.

[0004] 오늘날 윤택해진 삶의 질과 생활을 토대로 사람들의 관심사는 의식주에 집중되었던 과거에 비해 점점 복지와 여과생활로 집중되고 있으며 운동을 통한 건강한 삶을 영위하려 노력하고 있다. 그리고 이러한 생활을 적용하기 위해서는 수의근의 자유로운 조절과 사용이 전제되어야 하며, 근육 기능의 이상으로 인한 수의근의 사용이 불가능한 상황은 사람의 활동 범위를 한정시키고 이로 인한 삶의 질을 저하시키는 결과를 초래한다.

- [0006] 일반적으로 일상에서 근위축의 발병을 예방하기 위해 할 수 있는 가장 좋은 방법은 지속적인 근육의 사용을 통한 근육의 소실 예방이지만 부상이나 장애 등과 같이 본인의 의지와 상관없이 근육의 사용이 불가능해지는 경우에도 근육의 퇴화에 의한 근위축이 발생할 수 있으므로, 이러한 경우에도 근육에 자극을 주거나 근육의 퇴화를 예방하여 근위축을 막을 수 있는 대응책과 그에 대한 연구가 필요하다.
- [0008] 활성 산소 종(reactive oxygen species)은 화학적으로 반응성이 큰 분자 집단으로써 주변 물질들과 전자를 주고 받으려는 산화 환원 반응에 대한 성질이 강하여 높은 반응성을 나타내는 물질이다. 이러한 활성 산소 종의 반응성으로 인해 세포 내 단백질분자나 DNA와 같은 주위 물질들은 전자를 잃고 산화되어 변이를 나타내게 되고 올바른 기능을 수행하지 못하게 되며 올바른 기능을 수행할 수 없게 된 세포는 생존이 불가능해져 세포사멸이 유도될 수 있다. 이와 같은 스트레스의 여러 요인 중 활성 산소 종에 의한 산화 스트레스는 근육세포에서도 나타나며 이러한 산화 스트레스에 의해 근육 세포의 소실과 근위축이 유도될 수 있다. 다양한 스트레스 요인들은 근육 조직의 손상뿐만 아닌 생체 내 여러 조직에 영향을 주어 여러 가지 질병의 요인들로 주목받고 있다 (MCKinnell IW., and Rudnicki MA., Cell, 2004).
- [0010] 스트레스 자극에 의해 세포가 더 이상 생존하지 못하고 죽게 될 경우 진행되는 방식은 세포가 유전정보에 의해 스스로 분해되어 제거되는 세포사멸(apoptosis)과 세포가 팽창하여 터지면서 세포 내에 존재하던 물질들을 밖으로 배출시키며 제거되는 괴사(necrosis)가 존재한다. 산화 스트레스에 의해 세포가 죽게 될 경우 세포사멸이 진행되며 세포사멸의 과정 중 핵 내에 존재하는 DNA가 여러 조각들로 잘려지게 된다. 세포사멸의 정도를 확인하는 실험 방법 중 하나인 DAPI 염색법(DAPI staining)은 세포의 핵 내에 존재하는 DNA를 구성하는 아데닌(adenine), 티민(thymine), 구아닌(guanine), 시토신(cytosine) 중 아데닌과 티민 염기쌍에 특이적으로 결합하는 원리를 이용한 실험기법이다. DNA가 여러 조각으로 잘려져 아데닌과 티민 염기쌍이 외부로 많이 노출될 경우 형광물질인 DAPI가 더 많이 DNA에 결합할 수 있게 되며, 이때 DNA에 결합한 DAPI에 300~400nm의 자외선을 조사해 줄 경우 400~500nm의 형광을 발생하여 DAPI가 DNA에 결합한 정도를 확인할 수 있다. 이를 통해 DNA가 분해된 정도를 파악하여 세포사멸이 진행된 정도를 알 수 있다.
- [0011] 리놀레산(linoleic acid)은 2개의 이중결합을 지니는 불포화지방산의 일종으로 콩기름 또는 면실유 등에 다량 포함되어 있는 물질이다. 녹는점 -12℃, 끓는점 230℃으로 상온에서는 액체상으로 존재하며, 물에는 녹지 않고 알코올이나 에테르와 같은 유기용매에는 녹는다. 세포막을 구성하는 인지질 이중층의 성분으로 일부 발견되며, 체내에서 스스로 합성할 수 없기 때문에 섭취를 통해 획득해야 하는 필수 지방산의 일종이다. 리놀레산의 유도체인 감마리놀렌산(γ -linolenic acid), 공액리놀레산(conjugated linoleic acid)의 경우 항산화력이 있는 물질로 알려져 있으나 근육에서의 항산화 활성을 통해 근위축을 억제하는 효과에 대한 연구는 아직까지 밝혀진바 없으며, 특히 전구체인 리놀레산에 대한 근육에서의 항산화 활성을 통한 근위축 억제에 대한 연구도 이루어지지 않은 실정이다(Marineli Rda S., Marques AY., Furlan CP., Marostica MR Jr., J food reseach international, 2012).
- [0012] 한편, 근위축증 치료제에 관한 선행문헌으로, 한국등록특허 제1560799호에는 hnRNP M(Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M) 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 척수성 근위축증 치료용 조성물이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1468123호에는 포유동물 뱀줄 유래 줄기세포를 유효성분으로 포함하는 근위축 질환 개선 또는 치료용 조성물이 개시되어 있으며, 한국등록특허 제1385191호에는 치커리(*Cichorium intybus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 근위축 예방 및 치료용 의약 조성물이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1349361호에는 등골나물(*Eupatorium chinensis* var. *simplicifolium*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 근위축 예방 및 치료용 의약 조성물이 개시되어 있을 뿐, 리놀레산의 근위축에 대한 효과에 대해서는 전혀 알려진 바 없다.
- [0013] 이에, 본 발명자들은 세포독성이 없고, 인체에 안전성이 확보된 신규한 근위축증 치료제를 개발하기 위해 노력

한 결과, 천연물 유래 리놀레산이 천연물 유래 물질로 세포독성이 없고, 인체에 안정성이 확보되어 있으며, 산화스트레스(Oxidative stress)에 의한 근육세포의 손상 및 세포사멸을 억제하여 현저한 근위축 치료효과를 나타냄을 확인함으로써, 리놀레산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 근위축증 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 리놀레산(linoleic acid) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근위축증(muscle atrophy) 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 또는 근위축증 예방 또는 개선용 건강식품을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 리놀레산(linoleic acid) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근위축증(muscle atrophy) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 아울러, 본 발명은 리놀레산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근위축증 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 리놀레산(linoleic acid)은 세포독성이 없고, 산화스트레스(Oxidative stress)에 의한 근육세포의 손상 및 세포사멸을 억제하여 현저한 근위축 치료효과를 나타내므로, 본 발명의 리놀레산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 근위축증 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 리놀레산(linoleic acid)의 세포독성을 확인한 도이다.

도 2는 산화스트레스(Oxidative stress)로 유도된 근육세포 손상에 대한 리놀레산의 효과를 확인한 도이다:

NAC: 양성대조군인 N-아세틸 시스테인 처리군.

도 3은 산화스트레스 환경에서 세포사멸이 유도된 근육세포에서 본 발명의 리놀레산의 세포사멸 억제 효과를 확인한 도이다:

NAC: 양성대조군인 N-아세틸 시스테인 처리군.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명의 용어를 설명한다.

[0020] 본 명세서에서 사용되는 용어 "예방"은 조성물의 투여로 발병을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에 있어서, "개선" 또는 "치료"란 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

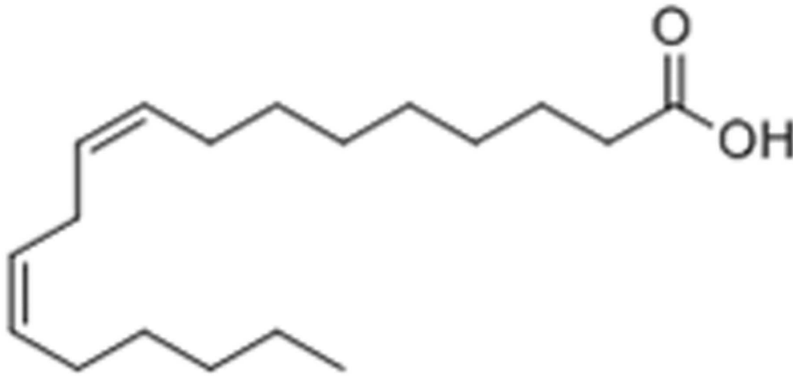
[0021] 본 발명에 있어서 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 모든 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 조성물은 활성물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0022] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0023] 본 발명은 리놀레산(linoleic acid) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근위축증(muscle atrophy) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0024] 상기 리놀레산은 콩기름 또는 면실유 등으로부터 분리하거나, 시판되는 것, 또는 공지된 화학적 합성법으로 제조된 것 어느 것을 이용하여도 무방하며, 천연물 유래 물질이므로, 독성을 나타내지 않고, 인체에 무해하며, 하기 [화학적 1]로 기재되는 화학식을 가진다.

[0025] [화학적 1]



[0026]

[0027] 또한, 상기 리놀레산은 다가불포화지방산(Polyunsaturated fatty acids)의 한 종류로 IUPAC 명칭은 (9Z,12Z)-9,12-Octadecadienoic acid이며, 이 물질의 분자식은 $C_{18}H_{32}O_2$ 이고, 분자량은 280.45이다.

[0028] 상기 리놀레산은 근육세포 손상 또는 근육세포 사멸을 억제하는 것이 바람직하고, 상기 근위축은 근육을 사용하지 않음으로써 발생하는 근육 조직의 손실로 인한 근위축, 근육 자체의 병으로 인한 근위축 또는 근육을 지배하는 신경의 손상으로 인한 근위축인 것이 바람직하고, 상기 근육을 사용하지 않음으로써 발생하는 근육 조직의 손실로 인한 근위축은 무용성근위축(disuse atrophy), 상기 근육 자체의 병으로 인한 근위축은 중증 근무력증(myasthenia gravis) 또는 근이영양증(dystrophy), 근육을 지배하는 신경의 손상으로 인한 근위축은 척수성 근위축(spinal muscular amyotrophy), 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 또는 척수구근 근위축(sphingobular muscular atrophy)인 것이 보다 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0029] 아울러, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 근육세포를 배양한 후, 리놀레산의 세포독성을 확인한 결과, 리놀레산은 근육세포에서 세포독성이 없는 것을 확인하였다(도 1 참조).

[0030] 또한, 본 발명자들은 산화스트레스로 유도된 근육세포 손상에 대한 리놀레산의 효과를 확인한 결과, H_2O_2 를 처리 시 근육세포의 생존율이 떨어졌으나, 본 발명의 리놀레산을 처리하였을 경우, 농도 의존적으로, 근육세포의 생존율을 회복시키는 것일 확인하였다(도 2 참조).

[0031] 또한, 산화스트레스로 유도된 근육세포 세포사멸에 대한 리놀레산의 효과를 확인한 결과, H_2O_2 에 의해 근육세포의 세포사멸이 유도되었으나, 본 발명의 리놀레산은 농도 의존적 근육세포의 세포사멸을 억제함을 확인하였다(도 3).

[0032] 따라서, 본 발명의 리놀레산은 세포독성이 없고, 근육세포의 손상 및 세포사멸을 억제하여 현저한 근위축 치료 효과를 나타내므로, 본 발명의 리놀레산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 근위축증 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0033] 본 발명은 화학식 1로 표시되는 리놀레산뿐만 아니라, 이의 약학적으로 허용되는 염, 이로부터 제조될 수 있는

가능한 용매화물, 수화물, 라세미체, 또는 입체이성질체를 모두 포함한다.

- [0034] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 리놀레산은 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 설포산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부탄-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.
- [0035] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 화학식 1로 표시되는 리놀레산을 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 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.
- [0036] 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.
- [0037] 상기 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.
- [0038] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 화학식 1로 표시되는 리놀레산에 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.
- [0039] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다.
- [0040] 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.
- [0041] 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 부작

용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [0042] 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.
- [0043] 또한, 본 발명은 리놀레산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근위축증 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.
- [0044] 상기 리놀레산은 근육세포 손상 또는 근육세포 사멸을 억제하고, 상기 근위축증은 근육을 사용하지 않음으로써 발생하는 근육 조직의 손실로 인한 근위축, 근육 자체의 병으로 인한 근위축 또는 근육을 지배하는 신경의 손상으로 인한 근위축인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0045] 따라서, 본 발명의 리놀레산은 근육세포의 손상 및 세포사멸을 억제하여 현저한 근위축 치료효과를 나타내므로, 본 발명의 리놀레산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 근위축증 예방 및 개선용 건강식품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 리놀레산이 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.
- [0047] 본 발명의 리놀레산은 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.
- [0048] 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 텍스트린, 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.
- [0049] 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), 펙틴산 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.
- [0050] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 제한되지 않으나, 본 발명의 리놀레산 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0051] 이하 본 발명을 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.
- [0052] 단, 하기 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 실험예 및 제조예에 한정되는 것은 아니다.

[0053] <실시예 1> 리놀레산의 준비

[0054] 리놀레산은 당업계에서 공지된 화학적 합성법으로 제조된 제품을 구매하여 사용하였다.

[0055] <실시예 2> 세포의 배양

[0056] 정상 근육세포(C2C12)를 우태아 혈청(fetal bovine serum; FBS)이 5% 함유된 DMEM 배지에서 배양하였다. 즉, 75cm² 플라스틱 플라스크(SPL life science Co., Ltd. Korea)에 정상 골격근육세포를 10% FBS, 7.5% NaHCO₃ 150 μg/ml, 글루타민 58.4 μg/ml 및 항생제(antibiotic)/항진균제(antimycotics) 4.4 μl/ml가 함유된 DMEM 배지에서 37℃, 5% CO₂의 조건하에서 배양하였다. 2~3일마다 한 번씩 2차 배양하여 세포주를 유지하였다.

[0057] <실시예 3> 세포 정량

[0058] 세포가 자란 75cm² 플라스틱 플라스크에서 배지액을 제거하고, CMF-PBS (calcium magnesium free-phosphate buffered saline, pH 7.2)로 세척한 후, 0.25% 트립신/EDTA를 처리하여 세포를 플라스크 바닥으로부터 떼어낸 후 세포 배양액으로 중화시켜서 원심분리(1200 rpm, 5min) 하였다. 남은 세포의 펠렛(pellet)에 배양액을 가한 다음, 멸균 피펫으로 반복 흡입하여 단일세포 부유액을 만든 후 트립판 블루(trypsin blue)를 세포 부유액과 1:1의 비율로 혼합하여 광학현미경 상에서 혈구계산판(hemocytometer)을 이용하여 측정하였다.

[0059] <실험예 1> 리놀레산의 세포독성(Cell viability) 확인

[0060] 리놀레산의 근육세포에 대한 독성측정은 EzCyttox 키트를 이용하였다. 구체적으로, 정상 근육세포(C2C12)를 96 웰 플레이트에 2×10⁴ cells/well이 되도록 분주하였다. 이를 37℃, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양한 후, 0, 10, 50, 100, 500, 1000 μM의 다양한 농도의 리놀레산을 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 세포생존율을 24시간 동안 배양 한 정상 근육 세포를 대상으로 EzCyttox 키트를 이용하여 리놀레산의 세포독성을 결정하였다.

[0061] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 리놀레산을 첨가하지 않았을 경우 근육세포는 100%의 생존율을 나타내었으며, 리놀레산을 여러 농도로 첨가한 군에서 역시 리놀레산을 첨가하지 않은 군과 비슷한 생존율을 보였다. 따라서 본 발명의 리놀레산은 근육세포에 대하여 세포 독성을 나타내지 않음을 확인하였다(도 1).

[0062] <실험예 2> 산화스트레스로 유도된 근육세포 손상에 대한 리놀레산의 효과 확인

[0063] H₂O₂로 유도된 세포사멸에 대한 리놀레산의 농도별 효과를 확인하기 위하여, 먼저 96well plate에 근육세포를 2×10⁴ cells/well이 되도록 넣고, 24시간 동안 37℃, 5% CO₂의 조건에서 배양기에서 배양하였다. 그런 다음, 리놀레산을 0, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 μM의 농도로 각각 첨가한 후, 10 % FBS-DMEM 배지로 전체부피를 195 μl로 조절하여 37℃, 5% CO₂의 조건에서 24시간 배양하였다. 이 배양액에 H₂O₂를 1 mM 농도로 전체부피가 200μl가 되게 첨가한 다음, 이를 다시 120분 배양하였다. 배양 후, EzCyttox kit 10μl를 첨가하고, 1시간 후 흡광도를 측정하여 그 효과를 결정하였다.

[0064] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, H₂O₂를 첨가하지 않았을 경우 근육세포는 100%의 생존율을 나타내었으며, H₂O₂를 처리 시 세포 생존율이 떨어지는 것을 확인할 수 있다. 또한, 리놀레산을 처리하였을 경우 농도에 따라 근육세포의 생존율이 회복되는 효과를 확인하였다(도 2).

[0065] 따라서, 리놀레산은 농도 의존적으로 산화스트레스에 대한 근육세포의 손상을 유의적으로 회복시킴을 확인하였다.

[0066] <실험예 3> 산화스트레스로 유도된 근육세포 세포사멸에 대한 리놀레산의 효과 확인

[0067] H₂O₂의 세포사멸에 대한 농도별 리놀레산의 효과를 확인하기 위하여, 먼저 커버글라스에 근육세포를 1×10⁵ cells/well이 되도록 넣고 CO₂ 배양기에서 배양시킨 다음, 리놀레산을 0, 25, 50, 100, 200 μM씩 첨가한 후, 10% FBS-DMEM 배지로 37℃, 5% CO₂의 조건에서 24시간 배양하였다. 이 배양액을 H₂O₂를 1 mM 농도로 첨가한 다음, 이를 다시 60 분 배양시킨 후, DAPI 염색한 후 그 효과를 결정하였다.

[0068] 그 결과 도 3에 나타난 바와 같이, H₂O₂에 의해 근육세포의 세포사멸이 유도되었으나, 본 발명의 리놀레산은 농도 의존적 근육세포의 세포사멸을 억제함을 확인하였다(도 3).

[0069] <제조예 1> 약제의 제조

[0070] 1. 산제의 제조

[0071]	본 발명의 리놀레산	500 ng
[0072]	유당	1 g

[0073] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0074] 2. 정제의 제조

[0075]	본 발명의 리놀레산	500 ng
[0076]	옥수수전분	100 mg
[0077]	유당	100 mg
[0078]	스테아린산 마그네슘	2 mg

[0079] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0080] 3. 캡슐제의 제조

[0081]	본 발명의 리놀레산	500 ng
[0082]	옥수수전분	100 mg
[0083]	유당	100 mg
[0084]	스테아린산 마그네슘	2 mg

[0085] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0086] 4. 주사제의 제조

[0087]	본 발명의 리놀레산	500 ng
[0088]	만니톨	180 mg
[0089]	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	26 mg
[0090]	증류수	2974 mg

[0091] 통상적인 주사제의 제조방법에 따라, 상기 성분들을 제시된 함량으로 함유시켜 주사제를 제조하였다.

[0092] <제조예 2> 건강식품의 제조

[0093] 1. 건강식품의 제조

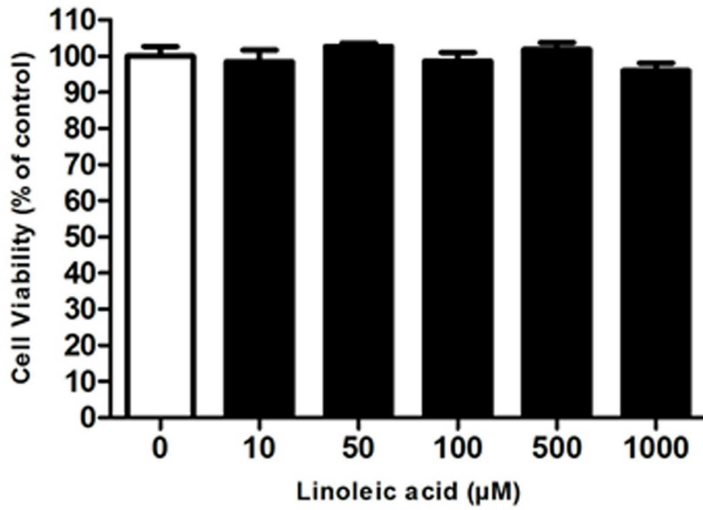
[0094]	본 발명의 리놀레산	500 ng
[0095]	비타민 혼합물	적량
[0096]	비타민 A 아세테이트	70 μ g
[0097]	비타민 E	1.0 mg
[0098]	비타민	0.13 mg
[0099]	비타민 B2	0.15 mg
[0100]	비타민 B6	0.5 mg
[0101]	비타민 B12	0.2 μ g
[0102]	비타민 C	10 mg
[0103]	비오틴	10 μ g
[0104]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0105]	엽산	50 mg
[0106]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0107]	무기질 혼합물	적량
[0108]	황산제1철	1.75 mg
[0109]	산화아연	0.82 mg
[0110]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0111]	제1인산칼륨	15 mg
[0112]	제2인산칼슘	55 mg
[0113]	구연산칼륨	90 mg
[0114]	탄산칼슘	100 mg
[0115]	염화마그네슘	24.8 mg
[0116]	상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.	
[0117]	2. 건강 음료의 제조	
[0118]	본 발명의 리놀레산	500 ng
[0119]	구연산	1000 mg
[0120]	올리고당	100 g
[0121]	매실농축액	2 g
[0122]	타우린	1 g
[0123]	정제수를 가하여 전체	900 ml
[0124]	통상의 건강 음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 건강 음료 조성물 제조에 사용하였다.	
[0125]	상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국	

가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호 도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

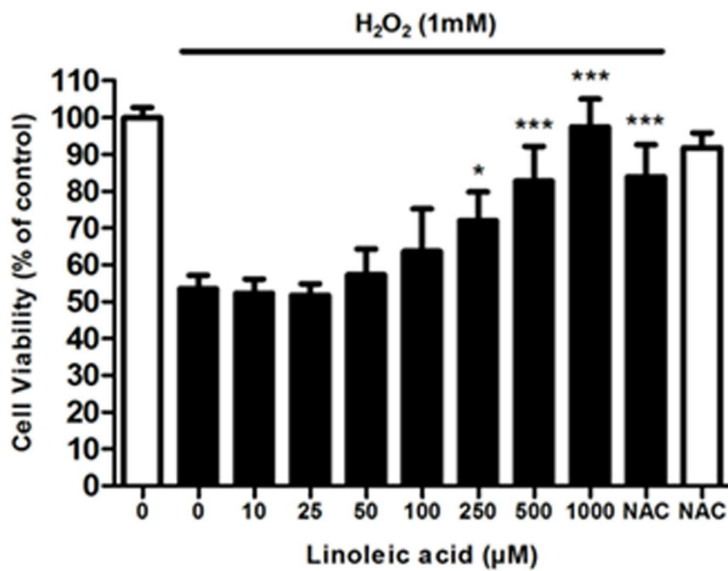
[0126]

도면

도면1



도면2



도면3

