

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

정정판

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 1월 24일 (24.01.2019)

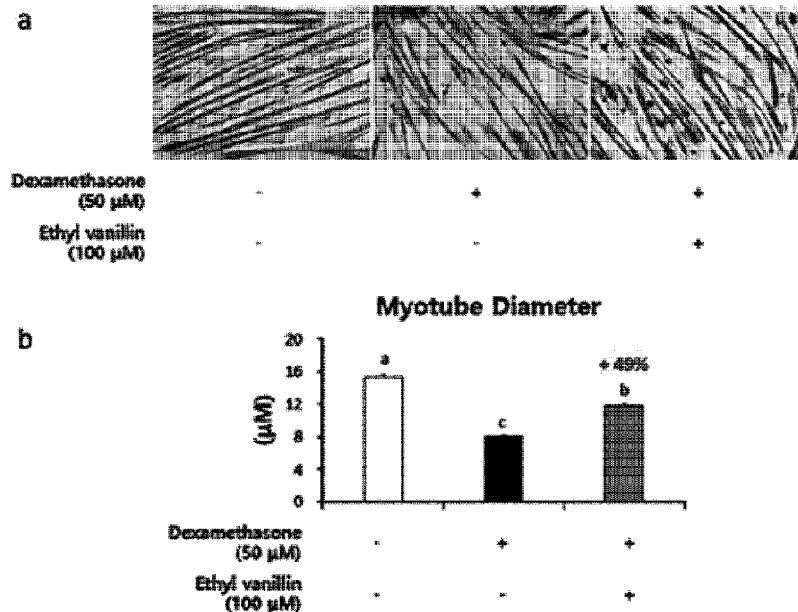


(10) 국제공개번호
WO 2019/017676 A9

- (51) 국제특허분류: **A61K 31/11** (2006.01) **A61K 8/33** (2006.01) **A23L 33/105** (2016.01) **A61Q 19/00** (2006.01) **UNIVERSITY** [KR/KR]; 03722 서울시 서대문구 연세로 50, Seoul (KR).
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/008071
- (22) 국제출원일: 2018년 7월 17일 (17.07.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2017-0090885 2017년 7월 18일 (18.07.2017) KR
- (71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (**INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY**) [KR/KR]; 03174 서울시 종로구 사직로8길 20, 101동 1103호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (**ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM**); 06575 서울시 서초구 사평대로 108, 3층 (반포동), 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, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING ETHYL VANILLIN AS EFFECTIVE INGREDIENT FOR EXHIBITING EFFECT OF MUSCLE STRENGTHENING, MUSCLE ENHANCEMENT, MUSCLE DIFFERENTIATION, MUSCLE REGENERATION, OR SARCOPENIA SUPPRESSION

(54) 발명의 명칭: 에틸바닐린을 유효성분으로 함유하는 근력강화, 근육증강, 근육분화, 근육재생 또는 근감소증 억제효과를 갖는 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition comprising ethyl vanillin or a pharmaceutically acceptable salt thereof as an effective ingredient for preventing or treating muscle disease or for improving a muscle function. Having the capability of upregulating the expression of a protein associated with muscle protein synthesis and muscle mass increase in myocytes and downregulating at an mRNA level the expression of an enzyme involved in muscle protein degradation, ethyl vanillin can exhibit effects of muscle differentiation, muscle regeneration, and muscle strengthening through an increase in muscle mass against muscle diseases attributed to muscle function decrease, muscle consumption, or muscle degradation and can suppress sarcopenia. Thus, ethyl vanillin can be used for



WO 2019/017676 A9

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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
- 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못의 정정 허가에 관한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

(88) 국제조사보고서 공개일: 2019년 2월 21일 (21.02.2019)

(48) 본 정정판 공개일: 2019년 3월 14일 (14.03.2019)

(15) 정정사항에 관한 정보: 2019년 3월 14일 (14.03.2019) 자 공지 참조

preventing or treating muscle diseases or for promoting muscle differentiation, muscle regeneration and muscle strengthening, muscle mass increase, or muscle generation or for improving muscle functions.

(57) 요약서: 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 치료용, 또는 근 기능 개선용 조성물에 관한 것으로, 상기 에틸바닐린은 근육 세포에서 근단백질 합성 및 근육량 증가와 관련된 단백질의 발현을 증가시킬 수 있고, 근 단백질 분해에 관여하는 효소의 발현은 mRNA 수준에서부터 억제할 수 있으므로 근기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환에 있어서 근육 분화, 근육 재생, 근육량 증가를 통해 근력 강화 효과를 나타낼 수 있으며, 근육 감소를 억제할 수 있는 바, 근육 질환 예방 또는 치료용, 근육 분화, 근육 재생 및 근육 강화 또는 근육 양(muscle mass) 증가 또는 근육 생성 촉진 또는 근 기능 개선에 이용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 에틸바닐린을 유효성분으로 함유하는 근력강화, 근육증강, 근육분화, 근육재생 또는 근감소증 억제효과를 갖는 조성물

기술분야

- [1] 본 출원은 2017년 7월 18일 출원된 대한민국 특허출원 제10-2017-0090885호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.
- [2] 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanillin) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 근육 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[3]

배경기술

- [4] 대한민국은 2000년 노인인구가 전체인구의 7.2%를 차지하여 고령화 사회에 진입하였으며, 2050년에는 초고령화사회(20% 이상)에 진입할 것으로 예측된다(2013년 고령자 통계, 통계청). 사람의 근육량은 나이가 들면서 감소하고(50 ~ 70세에 10 ~ 15% 정도, 그리고 70 ~ 80세에서 30% 이상 감소), 이에 따라 근력과 근기능도 약화되는데, 이를 노인성 근감소증(sarcopenia)이라 한다. 노인성 근감소증은 활동장애와 보행장애를 유발하여 노인들의 독립적인 생활을 제한하는 주요 원인이 된다. 또한, 근감소증은 기초대사율을 저하시켜 인슐린 저항성을 높이고 2형 당뇨병 발생을 촉진하며, 고혈압 및 심혈관계 질환 발생위험을 3-5배 증가시킨다. 현재 근감소증 치료용도로 승인된 의약품은 전무한 실정이며, myostatin 억제물질 또는 기존 FDA 승인을 받은 타질환 치료제를 근감소증에 적용하는 약물재배치(drug repositioning) 기술이 개발 중에 있다.

[5]

- [6] 근육은 크게 골격근(skeletal muscle), 심장근(cardiac muscle), 평활근(visceral muscle)으로 구분되고, 이 중 골격근은 인체에서 가장 많은 양으로 존재하는 조직으로, 체중의 40 ~ 45%를 차지한다. 골격근은 건(tendon)을 통해 뼈(bone)에 붙어서 뼈의 움직임 또는 힘을 만들어 내는 역할을 한다. 하나의 근육은 수많은 근섬유로 구성되어 있으며, 다시 근섬유는 액틴과 미오신으로 구성된 수많은 근원섬유로 만들어진다. 액틴과 미오신이 서로 겹쳐서 움직이면 근육의 길이가 짧아지거나 길어지면서 전체적인 근육의 수축과 이완을 유발하게 된다. 근원섬유 크기의 증가는 근섬유 두께의 증가를 의미하고, 그 결과 근육의 증가가 일어나게 된다.

- [7] 근육을 구성하는 근섬유의 유형은 ATP를 발생시키는 대사과정과 수축속도에 의해 주로 TypeI, Type IIA 그리고 Type IIB로 구분된다. '타입I 근섬유'는

수축속도가 느리고 많은 수의 미오글로빈과 미토콘드리아를 함유하고 있어 지속적이면서 낮은 강도의 유산소 활동을 하는데 적절하다. 타입 I 근섬유는 적색을 띄고 있어서 적색근이라고도 일컬어지며 대표적으로 가자미근(soleus)이 이에 속한다. 반면, '타입 II B 근섬유'는 수축속도가 빨라 매우 짧지만 높은 강도의 무산소 운동을 하는데 쓰이며, 미오글로빈의 함량이 적어 백색을 띄고 있다. '타입 II A 근섬유'는 앞서 언급한 두 가지 근섬유의 중간적인 특성을 띤다. 나이가 들에 따라 근육의 부위별 타입 I, II 근섬유의 조성이 달라질 뿐 아니라 모든 타입의 근섬유가 감소하게 된다.

- [8] 골격근은 환경에 따라 재생되어 유지되는 특징을 가지고 있으나, 이러한 특징은 나이가 들에 따라 소실되고 결과적으로 노화가 진행되면서 근육양이 감소될 뿐 아니라 근력 역시 상실된다. 근육의 성장 및 재생에 관여하는 신호전달체계로는 insulin like growth factor 1(IGF-1)/AKT에 의해 매개되어 단백질 합성을 조절하는 신호전달이 있다. 근육세포막에 존재하는 IGF-1 receptor(IGF-1R)가 활성화되면 IRS1 및 PI3K 인산화를 통해 AKT 인산화가 증가되고 후자는 mTORC 인산화를 활성화시킨다. mTORC의 활성화는 ribosomal protein S6 kinase beta-1(p70S6K1)의 인산화를 증가시켜 mRNA 번역(translation)을 증가시키는 동시에 eukaryotic translation initiation factor 4 G(eIF4G)의 활성을 증가시키고, eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1(4E-BP1) 단백질을 인산화시킨다. eIF4G와 4E-BP1은 eIF4F 복합체를 형성하는데 관여하는데 즉, eIF4G는 eIF4A 그리고 eIF4E와 결합하여 eIF4F 복합체를 형성하는 한편, 4E-BP1은 인산화되면 eIF4E와의 결합능이 저해되어 유리상태의 eIF4E를 증가시키게 된다. 후자는 다른 translation initiation factor들(eIF4G 및 eIF4A)와 결합하여 eIF4F 복합체를 형성하고, 이렇게 형성된 eIF4F 복합체는 리보솜 구조를 안정화시킴으로써 번역개시(translation initiation)를 촉진하여 궁극적으로 단백질 합성을 증가시키게 된다(Bodine et al., Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. Nature cell biology, 3, 1014-1019, 2001).

- [9] 또한 AKT 인산화는 glycogen synthase kinase 3 (GSK3)를 통해 eIF2B 발현을 증가시켜 근섬유 성장을 촉진시키는 한편 단백질 분해 관련 전사인자인 forkhead box O(FOXO)의 발현을 억제함으로써 근손실을 억제하기도 한다. 근손실은 myostatin, transforming growth factor beta(TGF- β), 그리고 activin을 포함하는 TGF- β family의 receptor에 의해 매개되는 신호전달에 의해 조절된다. TGF- β type II receptor에 리간드가 결합하면 type I receptor를 인산화시키고, 후자는 smad 2/3 complex를 인산화시켜 결국 FOXO를 활성화시킨다. 후자는 muscle-specific ubiquitin-ligase인 muscle RING-finger protein-1(MURF1) 및 Muscle Atrophy F-Box(MAFbx)/atrogin-1의 유전자 발현을 증가시키고, 이는 ubiquitin을 표적단백질의 lysine 부위에 부착시켜 단백질 분해를 촉진시키고, 결국 근육의 감소를 유도한다. (Gumucio et al., Atrogin-1, MuRF-1, and sarcopenia. Endocrine,

43, 12-21, 2013).

[10]

[11] 한편, 에틸바닐린은 유럽 Council of Europe (COE), 한국 식품첨가물공전(Korean Food Additives Codex, KFAC) 및 미국 Food and Drug Association (FDA) 식품첨가물 데이터베이스에 착향료로 등록되어 보조제 등으로 사용되고 있으며, 대한화장품협회의 화장품원료 등재집에는 화장품의 감미제, 향료배합의 목적으로 사용할 수 있다고 등재되어 있다. 현재까지 에틸바닐린은 항산화, 항균의 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며(비특허문헌 1, 비특허문헌 2), 경구 투여 또는 경피 투여 등의 경로로 투여되었을 때 생체 내 독성이 유발되지 않음과 동시에 유의적인 생리활성을 나타낼 수 있음이 보고된 바 있다(비특허문헌 1 내지 비특허문헌 4).

[12]

[13] 이에, 본 발명자들은 노령화가 계속되는 현대 사회에서 근육 감소 예방 및 근기능 개선 효과를 나타내는 약학적 조성물, 건강기능식품 또는 화장품 조성물의 수요가 지속적으로 증가할 것으로 판단하여, 근기능 개선 효과를 나타낼 수 있는 활성 화합물을 스크리닝한 결과, 에틸바닐린(ethyl vanillin)이 근육 세포에서 근기능 감소 효과 및 근육 합성 증진 효과를 나타낼 수 있을 것으로 확인하였다.

[14]

[15] (비특허문헌 1) Tai et al. "Antioxidant Properties of Ethyl Vanillin in vitro and in vivo." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 75. 2346-2350. 2011

[16] (비특허문헌 2) Yemiet al. "Effect of vanillin, ethyl vanillin, and vanillic acid on the growth and heat resistance of Cronobacter species." *Journal of Food Protection* 74. 2062-2069. 2011

[17] (비특허문헌 3) American Pharmaceutical Association. *Journal of the American Pharmaceutical Association*. American Pharmaceutical Association 1. 1912

[18] (비특허문헌 4) Monsanto Co., 1991a. Final report of several tests with ethavan with cover letter dated 112191. EPA Doc 86-920000149, microfiche no. OTS0534355. Date 8/17/76. Unpublished report submitted by EFFA to FLAVIS Secretariat

[19]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[20] 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[21] 본 발명의 또 다른 목적은 에틸바닐린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 개선, 근육 분화 촉진,

근육 재생, 근 기능 개선 또는 근육 강화용 건강기능성 식품 조성물, 또는 가축 사료용 조성물을 제공하는 것이다.

- [22] 본 발명의 또 다른 목적은 에틸바닐린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근 기능 개선용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.
- [23] 본 발명의 또 다른 목적은 에틸바닐린 유도체 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여 또는 복용시키는 단계를 포함하는 근육 질환 예방 또는 치료 방법, 근육 분화 촉진, 근육 재생 또는 근육 강화 방법을 제공하는 것이다.
- [24] 본 발명의 또 다른 목적은 에틸바닐린 유도체 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 조성물의 근육 질환 예방 또는 치료, 근육 분화 촉진, 근육 재생 또는 근육 강화 용도를 제공하는 것이다.

[25]

- [26] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

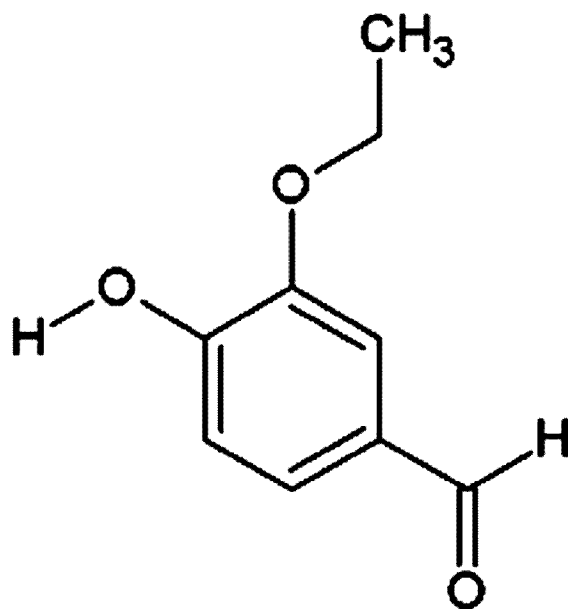
[27]

과제 해결 수단

- [28] 상기 과제를 해결하기 위해서, 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [29] 본 발명의 일 양상에 따르면, 상기 에틸바닐린은 하기 [화학식 1]의 구조를 가지는 화합물일 수 있다:

[30] [화학식 1]

[31]



- [32] 본 발명의 일 양상에 따르면, 상기 조성물은 p-4E-BP1 및 p-p70S6K1 단백질의 발현을 증가시킬 수 있다.
- [33] 본 발명의 일 양상에 따르면, 상기 조성물은 MuRF1(Muscle Ring-Finger Protein), MaFbx(Muscle atrophy F-box) 또는 미오스타틴(Myostatin)의 발현을 감소시킬 수 있다.
- [34] 본 발명의 일 양상에 따르면, 상기 근육 질환은 근 기능 저하, 근육 감소, 근육 위축, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환일 수 있고, 보다 구체적으로 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증, 악액질(cachexia), 경직성 척추 증후군(rigid spinesyndrome), 근위축성 측삭경화증(루게릭병, amyotrophic lateral sclerosis), 샤르코-마리-투스병(Charcot-Marie-Tooth disease) 및 근육 감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [35] 또한, 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 분화 촉진, 근육 재생 또는 근육 강화용 약학적 조성물을 제공한다.
- [36] 또한, 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 분화 촉진, 근육 재생, 근 기능 개선 또는 근육 강화용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [37] 또한, 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 양(muscle mass) 증가 또는 근육 생성 촉진용 약학적 조성물을 제공한다.
- [38] 또한, 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 양(muscle mass) 증가 또는 근육 생성 촉진용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [39] 또한, 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근 기능 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [40] 또한, 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 개선용 가축 사료용 조성물을 제공한다.
- [41] 또한, 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 분화 촉진, 근육 재생, 근 기능 개선 또는 근육 강화용 가축 사료용 조성물을 제공한다.
- [42] 또한, 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근 기능 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [43] 또한, 본 발명의 다른 구현예는 에틸바닐린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용

가능한 염을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여 또는 복용시키는 단계를 포함하는 근육 질환 예방 또는 치료 방법, 근육 분화 촉진, 근육 재생 또는 근육 강화 방법을 제공한다.

- [44] 본 발명의 또 다른 구현에는 에틸바닐린 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물의 근육 질환 예방 또는 치료, 근육 분화 촉진, 근육 재생 또는 근육 강화 용도를 제공한다.

[45]

발명의 효과

- [46] 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 치료용, 또는 근 기능 개선용 조성물에 관한 것으로, 상기 에틸바닐린은 근육 세포에서 근단백질 합성 및 근육량 증가와 관련된 단백질의 발현을 증가시킬 수 있고, 근 단백질 분해에 관여하는 효소의 발현은 mRNA 수준에서부터 억제할 수 있으므로 근기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환에 있어서 근육 분화, 근육 재생, 근육량 증가를 통해 근력 강화 효과를 나타낼 수 있으며, 근육 감소를 억제할 수 있는 바, 근육 질환 예방 또는 치료용, 근육 분화, 근육 재생 및 근육 강화 또는 근육 양(muscle mass) 증가 또는 근육 생성 촉진 또는 근 기능 개선에 이용될 수 있다.

[47]

도면의 간단한 설명

- [48] 도 1은 마우스 근아세포(myoblast)에서 근관세포(myotube)의 두께 변화를 나타낸 것이다.
- [49] 도 2는 에틸바닐린을 처리한 마우스 근아세포에서 단백질 분해 및 합성 관련 분자들의 mRNA 발현 수준(도 2a) 및 단백질 발현 수준(도 2b) 변화의 확인을 나타낸 것이다.
- [50] 도 3은 정상식이군(Chow), 고지방식이군(HFD) 및 에틸바닐린 섭취군(Ethyl vanilline) 마우스의 체중(A), 악력(B), 및 매달리는 시간(C) 변화로부터 에틸바닐린 섭취에 의한 근력 증가를 확인한 결과이다.
- [51] 도 4는 에틸바닐린 섭취에 의한 마우스 근육조직의 섬유직경을 전경골근(Tibialis anterior)에서 확인한 결과이다. 정량값은 8마리에 대한 각 근육의 섬유 직경을 평균±표준오차로 나타낸 것이다. $P < 0.05$ 는 통계적 유의성을 나타낸다.

[52]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [53] 이하, 본 발명의 용어에 대하여 설명한다.

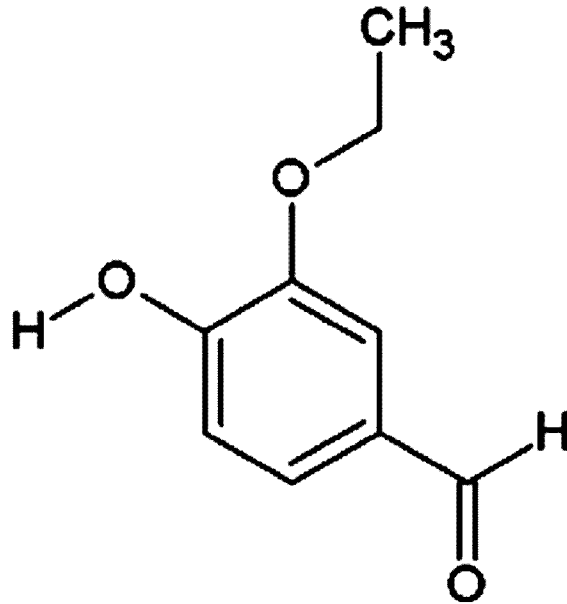
[54]

- [55] 본 발명의 “에틸바닐린(ethyl vanillin)”은 분자식 $C_9H_{10}O_3$ 의 페놀릭 알데히드계

물질이다. 분자량은 166.18 g/mol이며, 하기 [화학식 1]의 구조를 가진다:

[56] [화학식 1]

[57]



[58] 에틸바닐린의 IUPAC 명칭은

3-에톡시-4-하이드록시벤잘데히드(3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde)이며, 이 외에도 보우르보날(bourbonal) 등의 이명으로도 불린다.

[59] 에틸바닐린은 실온에서 흰색 또는 옅은 흰색의 파우더 형상으로 존재하며, 물에는 녹지 않고 클로로포름과 에탄올에 용해된다. 에틸바닐린은 향기 성분으로 알려져 있는데, 향 계열은 바닐라, 상세하게는 sweet, creamy, vanilla 및 caramel odor 향을 지닌다고 알려져 있다.

[60]

[61] 본 발명에서 사용되는 용어 “근”은 심줄, 근육, 건을 포괄적으로 지칭하고, “근 기능”은 근육의 수축에 의해 힘을 발휘하는 능력을 의미하며, 근육이 저항을 이겨내기 위하여 최대한으로 수축력을 발휘할 수 있는 능력인 근력, 근육이 주어진 중량에 얼마나 오랫동안 또는 얼마나 여러 번 수축과 이완을 반복할 수 있는지를 나타내는 능력인 근지구력, 단시간 내에 강한 힘을 발휘하는 능력인 순발력을 포함한다. 이러한 근 기능은 근육량에 비례하고, “근 기능 개선”은 근 기능을 더 좋게 향상시키는 것을 의미한다.

[62]

[63] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[64]

[65] 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물

[66] 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[67] 또한, 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 분화 촉진, 근육 재생 또는 근육 강화용

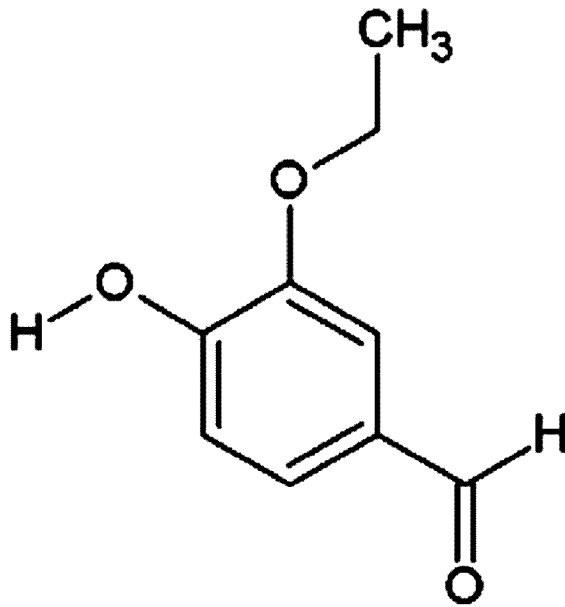
약학적 조성물을 제공한다.

[68] 또한, 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 양(muscle mass) 증가 또는 근육 생성 촉진용 약학적 조성물을 제공한다.

[69] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 상기 에틸바닐린은 하기 [화학식 1]의 구조를 가지는 화합물인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않으며, 에틸바닐린과 동일 또는 유사 활성을 가지는 것으로 당업자에 의해 이해될 수 있는 범위의 이성질체, 수화물 또는 유도체라면 모두 적용 가능하다:

[70] [화학식 1]

[71]



[72] 상기 에틸바닐린의 수득방법은 특별히 한정되지 않으며, 상기 에틸바닐린을 함유하고 있는 식물로부터 분리하거나, 공지된 제법을 사용하여 화학적으로 합성하거나, 시판되는 것을 사용할 수 있다.

[73] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 상기 에틸바닐린 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 p-4E-BP1 및 p-p70S6K1 단백질의 발현을 증가시킬 수 있으며, MuRF1(Muscle Ring-Finger Protein), MaFbx(Muscle atrophy F-box) 또는 Myostatin의 발현을 감소시킬 수 있다. 구체적으로, 단백질 합성과 관련이 있는 대표적인 분자로는 p70S6K1, 4E-BP1, 그리고 eIF members가 있고, 이 세 가지 분자들은 상위의 mTORC에 의해 활성이 조절된다. mTORC의 활성화는 p70S6K1를 인산화시키고, 활성화된 p70S6K1은 40S 리보솜단백질(ribosomal protein) S6를 인산화시켜서 mRNA 번역(translation)을 증가시키게 된다. 또한 mTORC의 활성화는 eIF4G의 활성을 증가시키는 동시에 4E-BP1을 인산화시키는데, 이 두 분자는 eIF4F 복합체를 형성하는데 관여한다. 즉, eIF4G는 eIF4A 그리고 eIF4E와 결합하여 eIF4F 복합체를 형성하는 한편, 4E-BP1은 인산화되면 eIF4E와의 결합능이 저해되어 유리상태의 eIF4E를 증가시키게 된다. 후자는 다른 translation initiation factor들(eIF4G 및 eIF4A)과 결합하여 eIF4F

복합체를 형성하고, 이렇게 형성된 eIF4F 복합체는 리보솜 구조를 안정화시킴으로써 번역개시(translation initiation)를 촉진하여 궁극적으로 단백질 합성을 증가시키게 된다. MAFbx/Atrogin-1과 MuRF1은 muscle-specific ubiquitin-ligase로, ubiquitin을 표적단백질의 lysine 부위에 부착시켜 단백질 분해를 촉진시키고, 근육의 감소를 유도하는 대표적인 단백질로서, 본 발명의 약학적 조성물은 MuRF1(Muscle Ring-Finger Protein) 또는 MaFbx(Muscle atrophy F-box)의 발현을 감소시킴으로써, 근육의 감소를 저해할 수 있다.

[74] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 상기 근육 질환은 근 기능 저하, 근육 감소, 근육 위축, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인해 유발되는 질병의 범위를 포함한다. 구체적으로, 상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증, 악액질(cachexia), 경직성 척추 증후군(rigid spinesyndrome), 근위축성 측삭경화증(루게릭병, amyotrophic lateral sclerosis), 샤르코-마리-투스병(Charcot-Marie-Tooth disease) 및 근육 감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 근육 소모 또는 퇴화는 전적 요인, 후천적 요인, 노화 등을 원인으로 발생하며, 근육 소모는 근육량의 점진적 손실, 근육, 특히 골격근 또는 수의근 및 심장근육의 약화 및 퇴행을 특징으로 한다.

[75] 또한, 본 발명의 약학적 조성물을 근육 분화 촉진, 근육 재생 또는 근육 강화 용도로 사용한다는 관점에서, 근세포의 분화는 수축기관(미오피브릴)과 같은 근섬유의 성분들을 특징하는 근육 발생 프로그램(muscle developmental program)의 유도를 의미한다. 분화를 위한 유용한 치료제는 유사하게 처리된 대조군 동물에 있는 동등한 조직에 비하여, 질병에 걸린 조직에 있는 모든 근섬유 성분의 양을 약 10%이상, 더욱 바람직하게 50%이상, 및 가장 바람직하게 100%이상 증가시킨다.

[76] 또한, 본 발명의 약학적 조성물을 근육 분화 촉진, 근육 재생 또는 근육 강화용도로 사용하거나, 근육량 증가 용도로 사용한다는 관점에서, 근육의 성장은 섬유크기(fiber size)의 증가에 의해 및/또는 섬유수의 증가에 의해 일어날 수 있다. 상기 근육의 성장은 A) 습윤중량(wet weight)의 증가, B) 단백질 함량의 증가, C) 근섬유 수의 증가, D) 근섬유 직경의 증가에 의해 측정될 수 있다. 근섬유 성장의 증가는 직경을 단면 타원체의 단축으로 정의할 때 직경의 증가로 정의될 수 있다. 유용한 치료제는 이전에 유사하게 처리된 대조군 동물(즉, 근육 성장 화합물로 처리되지 않은 퇴행된 근육조직을 갖는 동물)에 비해 적어도 10% 정도 근육이 퇴행된 동물에 있어서 습윤중량, 단백질 함량 및/또는 직경을 10% 이상, 더욱 바람직하게 50% 이상, 및 가장 바람직하게 100% 이상 증가시키는 것이다. 근섬유의 수를 증가시킴으로써 성장을 증가시키는 화합물은 그것이 질병에 걸린 조직에서 근섬유의 수를 적어도 1%, 더욱 바람직하게 적어도 20%, 그리고 가장 바람직하게 적어도 50% 증가시킬 때 치료제로 유용하다. 이러한 백분율값은 화합물이 투여되어 국부적으로 작용하는 경우에 비처리되고 질병에

걸리지 않은 비교 포유동물에 있어서 또는 대측성인 병에 걸리지 않은 근육에 있어서의 기초수준에 대하여 상대적으로 결정된 것이다.

[77] 또한, 본 발명의 약학적 조성물을 근육 분화 촉진, 근육 재생 또는 근육 강화용으로 사용한다는 관점에서, 근육 재생은 근육 모세포로부터 새로운 근섬유가 형성되는 과정을 의미한다. 재생을 위한 유용한 치료제는 상술한 바와 같이 적어도 약 1%, 더욱 바람직하게 적어도 20%, 및 가장 바람직하게 적어도 50% 새로운 섬유(new fiber)의 수를 증가시킨다.

[78] 근세포의 분화는 수축기관(미오피브릴)과 같은 근섬유의 성분들을 특정하는 근육 발생 프로그램(muscle developmental program)의 유도를 의미한다. 분화를 위한 유용한 치료제는 유사하게 처리된 대조군 동물에 있는 동등한 조직에 비하여, 질병에 걸린 조직에 있는 모든 근섬유 성분의 양을 약 10% 이상, 더욱 바람직하게 50% 이상, 및 가장 바람직하게 100% 이상 증가시킨다.

[79] 또한, 본 발명의 약학적 조성물을 근육 양 증가 또는 근육 생성 촉진용으로 사용한다는 관점에서, “근육 양 증가”는 신체 성분 중에서도 특히 근육의 성장을 향상시키는 것으로, 육체적 운동 및 지구력 향상을 통해 근육량을 증가시킬 수 있고, 근육 증가 효과를 가지는 물질을 체내에 투여하는 방식으로 근육량을 증가시킬 수 있으며, 근육의 종류는 제한되지 않는다.

[80] 구체적으로, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 덱사메타손(dexamethasone)에 의해 감소한 마우스 근아세포에 에틸바닐린을 처리한 경우, 상기 마우스 근아세포의 근관세포(myotube)가 유의적으로 증가하였음을 확인할 수 있다. 즉, 본 발명의 에틸바닐린은 마우스 근아세포에서 근관세포의 두께를 증가시킴으로써 근손실을 억제하고, 근육의 성장을 촉진시킬 수 있다.

[81] 또한, 덱사메타손에 의해 감소한 마우스 근아세포에 에틸바닐린을 처리한 경우, 단백질 합성에 관련이 있는 p-4E-BP1 및 p-p70S6K1 단백질의 발현을 유의적으로 증가시킬 뿐만 아니라, 근육 감소를 유도하는 단백질인 MuRF1 및 Mafbx/atrogen1의 발현을 유의적으로 감소시킴을 확인할 수 있다. 즉, 본 발명의 에틸바닐린은 마우스 근아세포에서 4E-BP1 및 p70S6K 단백질의 인산화를 증가시키고, MuRF1 및 Mafbx/atrogen1 유전자 발현을 억제함으로써 근육의 양을 증가시킬 수 있다.

[82] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 상기 조성물은 에틸바닐린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 것이라면 그 함량을 특별히 제한하지는 않으며, 바람직하게 상기 에틸바닐린의 용량은 0.1 μM 내지 1000 μM 의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 이때, 에틸바닐린이 상기 농도 범위 미만인 경우, 근육세포에서 단백질 합성 및 분해 활성이 저하되어, 근육 질환 예방 또는 치료 효과를 발휘하기 어려운 문제점이 있고, 에틸바닐린이 상기 농도 범위를 초과하는 경우, 세포독성을 포함한 독성의 우려사항이 있을 수 있다.

[83]

[84] 본 발명의 에틸바닐린은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수

있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 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, 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, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

- [85] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 상기 에틸바닐린을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 동량의 에틸바닐린 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.
- [86] 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. 또한, 본 발명의 에틸바닐린은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함한다.
- [87] 본 발명에 따른 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 에틸바닐린을 수산화성 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세토니트릴 등에 녹이고 과량의 유기산을 가하거나 무기산의 산 수용액을 가한 후 침전시키거나 결정화시켜서 제조할 수 있다. 이어서 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시켜서 부가염을 얻거나 또는 석출된 염을

흡인 여과시켜 제조할 수 있다.

[88]

[89] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 상기 조성물을 제형화할 경우에는 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS), 항산화제, 정균제, 킬레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 충전제, 증량제, 결합제, 아췌반트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제 습윤제, 봉해제 또는 계면활성제, 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[90]

경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분(옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분 등 포함), 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 덱스트로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 말티톨, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 예컨대, 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다.

[91]

또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 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 또는 보존제 등이 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 봉해제로 첨가할 수 있으며, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유효제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[92]

비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제 또는 좌제 등이 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 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.

[93]

[94]

본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 피부외용; 복강내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사하는 주사제; 경피 투여제; 또는 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법에 따라 제형화할 수 있다.

[95]

상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지 않는 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌

글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 포함하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 보다 바람직하게는, 적합한 담체로는 헵스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS (phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 텍스트로즈와 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 나트륨 클로라이드와 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.

- [96] 경피 투여제의 경우 연고제, 크림제, 로션제, 겔제, 외용액제, 파스타제, 리니먼트제, 에어로졸제 등의 형태가 포함된다. 상기에서 경피 투여는 약학 조성물을 국소적으로 피부에 투여하여 약학 조성물에 함유된 유효한 양의 활성성분이 피부 내로 전달되는 것을 의미한다.
- [97] 흡입 투여제의 경우, 본 발명에 따라 사용되는 화합물은 적합한 추진제, 예를 들면, 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체를 사용하여, 가압 팩 또는 연무기로부터 에어로졸 스프레이 형태로 편리하게 전달 할 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투약 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공하여 결정할 수 있다. 예를 들면, 흡입기 또는 취입기에 사용되는 젤라틴 캡슐 및 카트리지는 화합물, 및 락토즈 또는 전분과 같은 적합한 분말 기체의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화할 수 있다. 비경구 투여용 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042, Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기재되어 있다.
- [98]
- [99] 본 발명의 약학적 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 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 즉, 본 발명의 약학적 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 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.

- [100] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설을 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량으로는, 비경구 투여 시 에틸바닐린을 기준으로 하루에 체중 1 kg당 바람직하게 0.01 내지 50 mg, 더 바람직하게는 0.1 내지 30 mg의 양으로 투여되도록, 그리고 경구 투여 시는 본 발명의 에틸바닐린을 기준으로 하루에 체중 1 kg당 바람직하게 0.01 내지 100 mg, 더 바람직하게는 0.01 내지 10 mg의 양으로 투여되도록 1 내지 수회에 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.
- [101]
- [102] 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [103] 본 발명의 약학 조성물은 또한 에틸바닐린을 유효성분으로 포함하는 외용제의 제형으로 제공할 수 있다. 본 발명의 근육 질환 예방 및 치료용 약학 조성물을 피부외용제로 사용하는 경우, 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 유화제, 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 활성제, 친유성 활성제 또는 지질 소낭 등 피부 외용제에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 피부 과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 또한 상기 성분들은 피부 과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.
- [104] 본 발명의 근육 질환 예방 및 치료용 약학 조성물이 피부 외용제로 제공될 경우, 이에 제한되는 것은 아니나, 연고, 패취, 겔, 크림 또는 분무제 등의 제형일 수 있다.
- [105]
- [106] 근육 분화 촉진, 근육 재생 또는 근육 강화용 건강기능성 식품 조성물
- [107] 또한, 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [108] 또한, 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 분화 촉진, 근육 재생 또는 근육 강화용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [109] 또한, 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 양(muscle mass) 증가 또는 근육 생성 촉진용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [110] 또한, 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한

염을 유효성분으로 포함하는 근 기능 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다.

[111] 상기 건강기능성 식품 조성물에 있어서, 상기 에틸바닐린에 대한 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.

[112]

[113] 본 발명에 따른 근육 분화 촉진, 근육 재생 또는 근육 강화용 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 에틸바닐린을 건강기능식품의 첨가물로 사용하는 경우 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 예방, 건강 또는 치료 등의 각 사용 목적에 따라 적합하게 결정할 수 있다.

[114] 건강기능식품의 제형은 산제, 과립제, 환, 정제, 캡슐제의 형태뿐만 아니라 일반 식품 또는 음료의 형태 어느 것이나 가능하다.

[115] 상기 식품의 종류에는 특별히 제한은 없고, 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함할 수 있다.

[116] 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 상기 에틸바닐린은 원료 100 중량부에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가할 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 또한 본 발명은 천연물로부터의 분획물을 이용하는 점에서 안전성 면에서 문제가 없으므로 상기 범위 이상의 양으로도 사용할 수 있다.

[117] 본 발명에 따른 건강기능식품 중 음료는 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명에 따른 음료 100 mL당 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g일 수 있다.

[118] 상기 외에 본 발명에 따른 근육 분화 촉진, 근육 재생 또는 근육 강화용 건강기능식품 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, 탄산음료에 사용되는 탄산화제를 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 근육 분화 촉진, 근육 재생 또는 근육 강화용 건강기능성 식품 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할

수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 제한되지 않으나 본 발명의 건강기능식품 100 중량부 대비 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[119]

[120] 근육 분화 촉진, 근육 재생 또는 근육 강화용 가축 사료용 조성물

[121] 또한, 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 개선용 가축 사료용 조성물을 제공한다. 상기 에틸바닐린의 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.

[122] 또한, 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 분화 촉진, 근육 재생, 근 기능 개선 또는 근육 강화용 가축 사료용 조성물을 제공한다. 상기 에틸바닐린의 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.

[123] 상기 가축은 소, 돼지, 닭, 오리, 염소, 양 및 말로 이루어진 군 중에서 선택된 1종의 가축인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[124] 상기 사료용 조성물은 사료 첨가제를 포함할 수 있다. 본 발명의 사료첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당한다.

[125] 본 발명에서 용어, "사료"는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미할 수 있다.

[126] 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[127] 또한 상기 사료첨가제는 추가적으로 단위 동물에 허용되는 담체를 함유할 수 있다. 본 발명에 있어서는 상기 사료첨가제를 그대로 또는 공지의 담체, 안정제 등을 가할 수 있으며, 필요에 따라 비타민, 아미노산류, 미네랄 등의 각종 양분, 항산화제 및 기타의 첨가제 등을 가할 수도 있으며, 그 형상으로서는 분체, 과립, 펠릿, 현탁액 등의 적당한 상태일 수 있다. 본 발명의 사료첨가제를 공급하는 경우는 단위 동물에 대하여 단독으로 또는 사료에 혼합하여 공급할 수 있다.

[128]

[129] 근 기능 개선용 화장료 조성물

[130] 또한, 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근 기능 개선용 화장료 조성물을 제공한다. 상기 화장료 조성물은 특히 제한되는 것은 아니나, 피부 외용으로 사용하거나, 경구 섭취할 수 있다.

[131]

- [132] 본 발명의 근 기능 개선용 조성물은 또한 화장료 조성물일 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물은 에틸바닐린을 유효성분으로 함유하며 피부학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 기초 화장품 조성물(화장수, 크림, 에센스, 클렌징 폼 및 클렌징 워터와 같은 세안제, 팩, 보디오일), 색조 화장품 조성물(화운데이션, 립스틱, 마스크라, 메이크업 베이스), 두발 제품 조성물(샴푸, 린스, 헤어컨디셔너, 헤어젤) 및 비누 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [133] 상기 부형제로는 이에 한정되지는 않으나 예를 들어, 피부연화제, 피부 침투 증강제, 착색제, 방향제, 유향제, 농화제 및 용매를 포함할 수 있다. 또한, 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제 및 보습제 등을 추가로 포함할 수 있으며, 물성개선을 목적으로 점증제, 무기염류, 합성 고분자 물질 등을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 화장료 조성물로 세안제 및 비누를 제조하는 경우에는 통상의 세안제 및 비누 베이스에 상기 에틸바닐린을 첨가하여 용이하게 제조할 수 있다. 크림을 제조하는 경우에는 일반적인 수중유적형(O/W)의 크림베이스에 에틸바닐린 또는 이의 염을 첨가하여 제조할 수 있다. 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등과 물성개선을 목적으로 한 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 추가로 첨가할 수 있다.
- [134] 본 발명의 화장료 조성물에 함유되는 에틸바닐린의 함량은 이에 한정되지 않지만 전체 조성물 총중량에 대하여 0.001 내지 10 중량%인 것이 바람직하고, 0.01 내지 5중량%인 것이 더욱 바람직하다. 상기 함량이 0.001중량% 미만에서는 목적하는 항노화 또는 주름개선 효과를 기대할 수 없고, 10중량% 초과에서는 안전성 또는 제형상의 제조에 어려움이 있을 수 있다.
- [135]
- [136] 또한, 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여 또는 복용시키는 단계를 포함하는 근육 질환 예방 또는 치료 방법, 근육 분화 촉진, 근육 재생 또는 근육 강화 방법을 제공한다.
- [137] 또한, 본 발명은 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 조성물의 근육 질환 예방 또는 치료 용도, 근육 분화 촉진, 근육 재생 또는 근육 강화 용도를 제공한다.
- [138] 상기한 바와 같이, 본 발명의 에틸바닐린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물은 근아세포에서 4E-BP1 및 p70S6K1 단백질 인산화를 증가시키고, MuRF1 및 MaFbx/atrogen1 유전자 발현을 억제함으로써 근기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환에 있어서 근육 분화, 근육 재생, 근육량 증가를 통해 근력 강화 효과를 나타낼 수 있으며, 근육 감소를 억제할 수 있는 바, 근육 질환 예방 또는 치료용, 근육 분화 촉진, 근육 재생 및 근육량 증가용 또는 근 기능 개선에 이용될 수 있다.
- [139]
- [140] 이하, 실시예 및 제조예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들

실시에 및 제조에는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 제조예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[141]

[142] **실시예 1. 마우스근아세포를 이용한 에틸바닐린의 근손실 억제 효과의 확인**

[143] 에틸바닐린의 근손실억제 효과를 확인하고자, 마우스근아세포로부터 분화 유도된 근관세포(myotube)에서 근육 손상을 유발시키고, 에틸바닐린을 처리하여 근관세포의 손상 정도를 확인하였다.

[144]

[145] **1-1. 세포 배양**

[146] 먼저, 마우스근아세포로부터 근관 세포로 분화를 유도하였다.

마우스근아세포(mouse myoblast cell line, C2C12 cell)를 ATCC사(Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 구입한 세포를 10% 소혈청배지(fetal bovine serum media; Gibco-BRL)에 접종하고, 37°C의 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 배지에 부착된 세포의 포화도(confluent)가 80% 이상이 되면, 2% 말혈청 배지(horse serum media; Gibco-BRL)로 세포를 옮겨, 근아세포를 근관세포로 분화시켰다.

[147]

[148] **1-2. 근육 손상 유발**

[149] 근관세포로의 분화 유도 개시 4 일째 되는 날부터 2 일(48 시간) 동안 배지에 50 µM 덱사메타손(dexamethasone, dexamethasone; Sigma Aldrich, USA)을 처리하여 근감소를 유도하였다. 이에 따른 근손실 억제 효과를 확인하기 위해서 덱사메타손과 함께 100 µM 에틸바닐린(CAS No. 112-31-2, Sigma Aldrich, USA)을 처리하여 배양하였다.

[150] 무처리 대조군으로서는, 에틸바닐린을 처리하지 않고 덱사메타손만을 처리한 세포를 사용하였다.

[151]

[152] **1-3. 근관세포의 두께 측정**

[153] 상기 배양 종료 후, 인산염 완충용액(Phosphate buffered saline, PBS)으로 세포를 2회 세척한 후 100% 메탄올을 10 분동안 처리하여 고정하였다. 고정이 완료되면 상온에서 10 분간 자연건조시킨 후 근관세포(myotube)를 특이적으로 염색시키는 giemsa-wright staining solution(아산제약, 서울)을 떨어뜨리고 30 분간 실온방치하여 세포를 염색하였다.

[154] 염색된 근관세포는 형광현미경(IX 71, Olympus)을 이용하여 ×10 배율로 촬영한 후 image J software(USA)를 이용하여 분석하였다. 각 웰에서 6 부분을 무작위로 선택하여 현미경 촬영하였으며, 각 웰로부터 최소 100 개의 근관세포 두께를 분석하였다(3 반복/군).

[155]

[156] **1-4. 실험 결과**

[157] 마우스근아세포로부터 분화된 근관세포에서, 에틸바닐린에 의한 보호 효과를 확인한 결과, 텍사메타손만을 처리한 무처리 대조군(Dexa)에서는 정상 세포(Basal, 텍사메타손 미처리)에 비해 근관 세포의 두께가 현저히 감소하였으며, 에틸바닐린을 처리하였을 때 텍사메타손에 의해 감소한 근관 세포의 두께를 다시 증가시킬 수 있는 것으로 확인하였다(도 1a). 이를 정량적으로 수치화하였을 때, 텍사메타손에 의한 근관세포 감소에 비해 에틸바닐린 처리에 의해 +49% 수준의 증가 효과를 나타내었다(도 1b). 따라서, 에틸바닐린은 마우스근아세포 유래의 근관세포 두께를 증가시켜 근 손실을 억제하고, 근 성장을 촉진시킬 수 있는 것으로 확인하였다.

[158]

[159] **실시예 2. 에틸바닐린에 의한 근육 보호 효과의 작용 기작 규명**

[160] 에틸바닐린이 근관세포를 보호하여, 근 손실을 억제하고 근 성장을 촉진시킬 수 있는 것으로 확인하였으므로, 세포 내에서 어떠한 과정을 통해 에틸바닐린이 근육 보호 효과를 나타낼 수 있는지 확인하기 위해, 단백질 합성과 관련이 있는 대표적인 분자의 발현 수준 변화를 확인하였다.

[161]

[162] **2-1. RNA 추출 및 RT-PCR 수행을 통한 mRNA 발현수준 변화 확인**

[163] 상기 [실시예 1]과 동일한 방법으로 근아세포로부터 근관세포를 분화 유도하고, 이 때 텍사메타손 및/또는 에틸바닐린을 처리하여 배양하였다. 모든 실험군 및 대조군의 배양 종료 후, 각각의 세포를 수득하여 근관세포 1×10^7 세포 당 $334 \mu\text{l}$ 트리졸(trizol) 용액 $334 \mu\text{l}$ 를 첨가하고 갈아준 후, 4°C 에서 $12,000 \times\text{g}$ 로 10 분간 원심분리하였다. 그런 다음, 상층액을 새 튜브로 옮겨 $67 \mu\text{l}$ 클로로포름(chloroform)을 첨가하고 볼텍싱으로 혼합하였다. 혼합된 용액 중 상층액을 다시 새 튜브로 옮겨 상층액과 1:1(v:v)의 비율로 이소프로판올(isopropanol)을 첨가하여 약 10 회 세계 혼든 다음 실온에서 15 분 동안 방치하였다. 다시 4°C 에서 $12,000 \times\text{g}$ 로 10 분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전물에 70% 에탄올 1 ml을 가한 후, 4°C 에서 $7,500 \times\text{g}$ 로 5 분 동안 원심분리하여 에탄올을 제거하고 튜브를 실온에서 15 분 동안 건조시켰다. 최종적으로 침전된 RNA를 nuclease free water에 용해시켜 세포로부터 추출된 RNA를 수득하였다. RNA는 UV/VIS 분광광도계에서 260 nm 및 280 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 농도를 확인하고, 전기영동을 수행하여 RNA 시료의 integrity를 확인하였다.

[164] 준비한 RNA 시료를 사용하여 역전사 PCR(RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction)을 수행하였다. 상기 수득한 RNA 시료를 주형으로 사용하고, 올리고 dT 프라이머 및 역전사효소(superscript reverse transcriptase; GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA)를 사용해 역전사 단계를 수행하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 다시 주형으로 하고 하기 [표

1]에 기재된 프라이머쌍(정방향 프라이머, 역방향 프라이머)을 사용하여 PCR을 수행하였다. 각각의 프라이머는 증폭하고자 하는 주형 유전자 cDNA의 5' 및 3' flanking 서열을 기반으로 제작하였다. PCR 종료 후, 증폭된 PCR 산물 1 μ l를 1% 아가로스 젤에서 전기영동하여 생성된 DNA 밴드를 확인하였다.

[165]

[166] [표1]

RT-PCR에 사용한 프라이머 서열

표적 유전자	프라이머 방향	서열(5' → 3')	Tm(°C)	PCR 산물 길이(bp)
MaFbx(synonym: atrogen-1)	F	GTCCAGAGAGTCGGC AAGTC	63	141
	R	GTCGGTGATCGTGAG ACCTT		
MuRF1(synonym: TRAM63)	F	ACATCTACTGTCTCA CGTGT	58	106
	R	TGTCCTTGGAAGATG CTTTG		
Myostatin	F	TCACGCTACCACGGA AACAA	60	166
	R	AGGAGTCTTGACGGG TCTGA		
IGF	F	GGGGACTTTCGTGAC TGAGC	60	165
	R	GGTAGGTCCGGGTCG TTTAC		
GAPDH	F	GTGATGGCATGGACT GTGGT	55	163
	R	GGAGCCAAAAGGGTC ATCAT		

[167]

[168] **2-2. 웨스턴 블롯을 통한 단백질 발현수준 변화 확인**

[169]

상기 [실시에 1]과 동일한 방법으로 근아세포로부터 근관세포를 분화 유도하고, 이 때 텍사메타손 및/또는 에틸바닐린을 처리하여 배양하였다. 모든 실험군 및 대조군의 배양 종료 후, 배지를 제거하고 각 웰에 용해 버퍼를 가하여 세포를 용해시켰다. 상기 용해 버퍼는 5 mM EDTA, 50 mM 피로인산

나트륨(sodium pyrophosphate), 50 mM NaF, 100 mM 오르토바나듐산(orthovanadate), 1% 트리톤 X-100, 1 mM 페닐메탄술포릴 플루오리드(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF), 2 g/mL 아프로티닌(aprotinin), 1 μ g/mL 펩스타틴 A(pepstatin A) 및 1 μ g/mL 류펩틴(leupeptin)을 포함하는 100 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.4)을 사용하였다. 세포를 용해시킨 용해물을 수득한 후, 4°C에서 1,300 \times g로 20 분간 원심분리한 후 가운데 층을 취하여, 세포 추출물 내 단백질층으로 수득하였다. 단백질층을 브레드포드 법으로 단백질의 농도를 정량하였다.

- [170] 정량한 단백질 40 μ g을 SDS-PAGE로 전기영동한 후, 니트로셀룰로오즈 막(Amersham, Buckinghamshire, UK)으로 분리된 단백질을 이동시켰다. 그런 다음, 트리스-완충의 생리식염수(tris-buffered saline) 및 트윈 20 용액(TBS-T)를 이용하여 10 분 동안 3 회 반복하여 막을 세척한 후, 10% 스킴 밀크(skim milk)를 이용하여 60 분간 막을 차단하였다. 차단한 막에 1:1,000의 비율로 희석한 1차 항체를 가하여 4°C에서 12 시간 동안 부드럽게 흔들어 항체를 단백질에 결합시킨 다음 TBS-T를 이용하여 세척하고, 다시 1:2,000의 비율로 희석한 2차 항체를 가하여 60 분 동안 1차 항체에 2차 항체를 결합시킨 다음 세척하였다. 이 때 사용한 1차 항체로, p70S6K1, phospho-p70S6K1(p-p70S6K1), 4E-BP1, phospho-4E-BP1(p-4E-BP1) 및 GAPDH(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 사용하였다. 최종적으로 항체와 결합된 단백질을 ECL 웨스턴 블롯 검출 키트(RPN2106, Amersham, Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 X-ray 필름에 시각화하였다. X-ray 필름에 시각화된 밴드를 스캔하여 Quantity One analysis software(Bio-Rad)로 정량화 하였다.

[171]

[172] **2-3. 실험 결과**

- [173] 마우스근아세포를 대상으로 에틸바닐린에 의한 단백질 합성 및 분해 관련 분자들의 발현변화를 확인하였다. 대조세포(Dexa)에서는 정상세포(Basal)에 비해 단백질 합성과 관련이 있는 p-4E-BP1 및 p-p70S6K1 단백질의 양이 유의적으로 감소한 반면, 단백질 분해 유전자인 MaFbx/atrogen1과 MuRF1 발현은 유의적으로 증가하였다. 에틸바닐린 처리는 데사메타손에 의해 감소한 p-4EBP1 및 p-p70S6K1 단백질 양을 다시 유의적으로 증가시키는 한편, MaFbx/atrogen1, MuRF1, Myostatin의 발현은 유의하게 감소시켰다(도 2). 따라서 에틸바닐린은 마우스근아세포에서 4E-BP1 및 p70S6K1 단백질 인산화를 증가시키고, MaFbx/atrogen1, MuRF1, Myostatin 유전자 발현을 억제함으로써 궁극적으로 근육의 양을 증가시키는데 관여할 수 있을 것으로 판단할 수 있다.

[174]

[175] **실시예 3. 마우스를 이용한 에틸바닐린의 근력강화 효능**

- [176] 실험 동물에 에틸바닐린을 포함한 식이를 섭취시켰을 때 근력 변화를 확인하였다.

[177]

[178] **3-1. 실험방법**[179] **1) 실험식이 제조 및 실험동물의 사육**

[180] 5주령의 수컷 C57BL/6N 마우스 24마리(mating, 한국)를 상업적인 정상식이(rodant chow)로 1주일 간 실험실환경에 적응시킨 후, 난괴법에 따라 세 개의 군(Chow군, HFD군, Ethyl vanillin군)으로 군당 8 마리씩 임의 배치하여 10주간 사육하였다. 본 실험에서 사용한 비만유도식은 고지방대조식이(high fat diet, HFD: 40% fat calorie, 17 g lard + 3% corn oil/ 100 g diet)이며, 에틸바닐린이 보충된 식이(Ethyl vanillin-supplemented high fat diet, Ethyl vanillin)는 HFD와 조성이 동일하되 에틸바닐린이 0.2% 수준으로 포함되었다(표 2). 정상식이군(Chow)은 상업적인 rodent chow를 섭취시켰다. 에틸바닐린은 씨그마-알드리치 사에서 구입하였다.

[181] [표2]

실험식이 조성표

성분	고지방대조식이(HFD)(g/kg diet)	에틸바닐린(Ethyl vanillin)보충식이(g/kg diet)
카제인	200	200
DL-메티오닌	3	3
옥수수 전분	111	109
수크로오스	370	370
셀룰로오스	50	50
옥수수유	30	30
라아드	170	170
비타민 복합물	12	12
미네랄 복합물	42	42
콜린 비타르트리이트	2	2
콜레스테롤	10	10
tert-부티하이드로퀴논	0.04	0.04
실험물질(에틸바닐린)	-	2
총합(g)	1,000	1,000

[182]

[183] **2) 악력 측정시험(grip test)**

[184] 마우스의 악력을 측정하기 위하여, 사육 10주차에 마우스의 네 발을 이용하여 악력을 측정하였다. 철망(20 x 10 cm)이 장착된 악력 측정기((주)대중기기산업,

한국)를 이용하여 마우스가 철망을 잡는 힘(N)을 총 5회 측정하였고, 매 회 측정 사이에 1분 이상의 휴식시간을 주었다. 실험결과는 측정된 힘(N)과 체중(kg)으로 나눈 값으로 구하였다.

[185]

[186] 3) 사지근력 측정시험(four limb hanging test)

[187] 마우스의 사지근력을 측정하기 위하여, 사육 10주차에 마우스의 네 발을 이용하여 거꾸로 매달리는 시간을 측정하였다. 철망 뚜껑(지름 < 0.5 cm)이 장착된 케이지(20 x 30 x 50 cm, (주)정도비엔피, 한국)에 마우스가 거꾸로 매달리는 시간(초)을 총 3회 측정하였고, 매 회 측정 사이에 30분 이상의 휴식시간을 주었다. 실험결과는 매달리는 시간(초)과 그 시간을 체중(kg)으로 곱한 값으로 구하였다.

[188]

[189] 4) 근육조직의 면역조직화학적 염색

[190] 마우스의 근육 조직을 적출하고 10% 포르말린에 고정된 다음, 한국 CFC (경기도, 한국)에 의뢰하여 Hematoxylin and eosin(H&E) 염색을 한 뒤 광학현미경(IX71, Olympus, JPN)을 이용하여 관찰하고, 디지털 카메라(DP71, Olympus, JPN)를 이용하여 사진을 촬영하였다.

[191]

[192] 5) 통계분석

[193] 모든 자료의 통계분석은 statistical package for the social sciences(SPSS version 21.0, IBM, Armonk, NY, USA) PC package를 사용하여 실시하였고, 분석수치는 mean±SEM으로 나타내었으며, 군간 유의적인 차이는 ANOVA를 실시하여 검증하였다.

[194]

[195] 3-2. 실험결과[196] 1) 에틸바닐린 섭취에 의한 마우스의 근력 증가 확인

[197] 에틸바닐린을 섭취한 마우스의 체중은 고지방식이를 섭취한 마우스의 체중과 유의적인 차이가 없었다(도 3A). 에틸바닐린은 고지방식이를 섭취하는 마우스의 악력(Grip strength)(도 3B) 및 매달리는 시간(Holding impulse)(도 3C)를 각 27% 및 147% 유의적으로 증가시켰다. 따라서 고지방식으로 유도된 근손실 동물모델에서 매우 탁월한 근력증강효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[198]

[199] 2) 에틸바닐린 섭취에 의한 마우스 근육 조직의 섬유직경 변화

[200] 에틸바닐린은 고지방식이를 섭취하는 마우스의 전경골근(Tibialis anterior)(57%, 도 4)의 섬유직경을 유의적으로 증가시켰다. 따라서 에틸바닐린은 고지방식으로 유도된 근손실 동물모델에서 매우 탁월한 골격근육 증가효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[201]

발명의 실시를 위한 형태

[202] 이하, 본 발명에 따른 상기 에틸바닐린을 유효성분으로 함유하는 의약품, 식품 또는 화장품의 제조예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다. 상기 근육 질환 예방 및 치료 또는 근기능 개선 효과가 우수한 추출물을 가지고 하기와 같은 조성성분 및 조성비에 따라 제조예 1 내지 4의 의약품, 식품 또는 화장품 조성물을 통상적인 방법에 따라서 제조하였다.

[203]

[제조예 1] 약학적 조성물의 제조

<1-1> 산제의 제조

[206] 에틸바닐린 20 mg

[207] 유당수화물 100 mg

[208] 탈크 10 mg

[209] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[210]

<1-2> 정제의 제조

[212] 에틸바닐린 10 mg

[213] 옥수수전분 100 mg

[214] 유당수화물 100 mg

[215] 스테아르산마그네슘 2 mg

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

[217]

<1-3> 캡셀제의 제조

[219] 에틸바닐린 10 mg

[220] 미결정 셀룰로오스 3 mg

[221] 유당수화물 14.8 mg

[222] 스테아르산마그네슘 0.2 mg

[223] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡셀제의 제조방법에 따라서 젤라틴캡슐에 충전하여 캡셀제를 제조하였다.

[224]

<1-4> 주사제의 제조

[226] 에틸바닐린 10 mg

[227] 만니톨 180 mg

[228] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[229] 인산일수소나트륨 26 mg

[230] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1앰플당(2mL)

상기의 성분 함량으로 제조하였다.

[231]

[232] <1-5> 액제의 제조

[233] 에틸바닐린 10 mg

[234] 이성화당 10 mg

[235] 만니톨 5 mg

[236] 정제수 적량

[237] 레몬향 적량

[238] 상기의 성분을 통상의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 정제수를 가하여 전체 100mL로 조절한 후 멸균시켜 갈색병에 충전하여 액제를 제조한다.

[239]

[240] [제조예 2] 건강식품의 제조

[241] <2-1> 건강보조식품의 제조

[242] 에틸바닐린 10 mg

[243] 비타민 혼합물 적량

[244] 비타민 A 아세테이드 70 μ g

[245] 비타민 E 1.0 mg

[246] 비타민 B₁ 0.13 mg

[247] 비타민 B₂ 0.15 mg

[248] 비타민 B₆ 0.5 mg

[249] 비타민 B₁₂ 0.2 μ g

[250] 비타민 C 10 mg

[251] 비오틴 10 μ g

[252] 니코틴산아미드 1.7 mg

[253] 엽산 50 μ g

[254] 판토텐산 칼슘 0.5 mg

[255] 무기질 혼합물 적량

[256] 황산제1철 1.75 mg

[257] 산화아연 0.82 mg

[258] 탄산마그네슘 25.3 mg

[259] 제1인산칼륨 15 mg

[260] 제2인산칼슘 55 mg

[261] 구연산칼륨 30 mg

[262] 탄산칼슘 100 mg

[263] 염화마그네슘 24.8 mg

[264] 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.

[265]

[266] <2-2> 건강음료의 제조

[267] 에틸바닐린 10 mg

[268] 비타민 C 15 g

[269] 비타민 E(분말) 100 g

[270] 젖산철 19.75 g

[271] 산화아연 3.5 g

[272] 니코틴산아미드 3.5 g

[273] 비타민 A 0.2 g

[274] 비타민 B₁ 0.25 g[275] 비타민 B₂ 0.3 g

[276] 정제수 정량

[277]

[278] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1 시간 동안 85에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

[279]

[280] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

[281]

[282] **[제조예 3] 화장료 조성물의 제조**

[283] 하기에 본 발명의 추출물을 함유하는 화장료 조성물의 제조예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[284]

[285] <3-1> 영양화장수(밀크로션)

[286] 에틸바닐린 2.0 중량%

[287] 스쿠알란 5.0 중량%

[288] 밀납 4.0 중량%

[289] 폴리솔베이트60 1.5 중량%

[290] 솔비탄세스퀴올레이트 1.5 중량%

[291] 유동파라핀 0.5 중량%

[292] 카프릴릭/카프릭트리글리세라이드 5.0 중량%

[293] 글리세린 3.0 중량%

[294] 부틸렌글리콜 3.0 중량%

[295] 프로필렌글리콜 3.0 중량%

- [296] 카르복시비닐폴리머 0.1 중량%
- [297] 트리에탄올아민 0.2 중량%
- [298] 방부제, 색소, 향료 적량
- [299] 정제수 to 100 중량%
- [300] 상기의 배합비는 비교적 영양화장수에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상적인 화장품 분야에서의 제조방법에 따라 제조할 수 있다.

[301]

[302] <3-2> 유연화장수(스킨로션)

- [303] 에틸바닐린 2.0 중량 %
- [304] 글리세린 3.0 중량 %
- [305] 부틸렌글리콜 2.0 중량 %
- [306] 프로필렌글리콜 2.0 중량 %
- [307] 카르복시비닐폴리머 0.1 중량 %
- [308] PEG 12 노닐페닐에테르 0.2 중량 %
- [309] 폴리솔베이트80 0.4 중량 %
- [310] 에탄올 10.0 중량 %
- [311] 트리에탄올아민 0.1 중량 %
- [312] 방부제, 색소, 향료 적량
- [313] 정제수 to 100 중량 %
- [314] 상기의 배합비는 비교적 유연화장수에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상적인 화장품 분야에서의 제조방법에 따라 제조할 수 있다.

[315]

[316] <3-3> 영양크림

- [317] 에틸바닐린 2.0 중량 %
- [318] 폴리솔베이트60 1.5 중량 %
- [319] 솔비탄세스퀴올레이트 0.5 중량 %
- [320] PEG60 경화피마자유 2.0 중량 %
- [321] 유동과라핀 10 중량 %
- [322] 스쿠알란 5.0 중량 %
- [323] 카프릴릭/카프릭트리글리세라이드 5.0 중량 %
- [324] 글리세린 5.0 중량 %
- [325] 부틸렌글리콜 3.0 중량 %
- [326] 프로필렌글리콜 3.0 중량 %
- [327] 트리에탄올아민 0.2 중량 %
- [328] 방부제 적량
- [329] 색소 적량

- [330] 향료 적량
- [331] 정제수 to 100 중량 %
- [332] 상기의 배합비는 비교적 영양크림에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상적인 화장품 분야에서의 제조방법에 따라 제조할 수 있다.
- [333]
- [334] <3-4> 마사지크림
- [335] 에틸바닐린 1.0 중량 %
- [336] 밀납 10.0 중량 %
- [337] 폴리솔베이트60 1.5 중량 %
- [338] PEG 60 경화피마자유 2.0 중량 %
- [339] 솔비탄세스퀴올레이트 0.8 중량 %
- [340] 유동파라핀 40.0 중량 %
- [341] 스쿠알란 5.0 중량 %
- [342] 카프릴릭/카프릭트리글리세라이드 4.0 중량 %
- [343] 글리세린 5.0 중량 %
- [344] 부틸렌글리콜 3.0 중량 %
- [345] 프로필렌글리콜 3.0 중량 %
- [346] 트리에탄올아민 0.2 중량 %
- [347] 방부제, 색소, 향료 적량
- [348] 정제수 to 100 중량 %
- [349] 상기의 배합비는 비교적 마사지크림에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상적인 화장품 분야에서의 제조방법에 따라 제조할 수 있다.
- [350]
- [351] <3-5> 팩
- [352] 에틸바닐린 1.0 중량 %
- [353] 폴리비닐알콜 13.0 중량 %
- [354] 소듐카르복시메틸셀룰로오스 0.2 중량 %
- [355] 글리세린 5.0 중량 %
- [356] 알란토인 0.1 중량 %
- [357] 에탄올 6.0 중량 %
- [358] PEG 12 노닐페닐에테르 0.3 중량 %
- [359] 폴리솔베이트60 0.3 중량 %
- [360] 방부제, 색소, 향료 적량
- [361] 정제수 to 100 중량 %
- [362] 상기의 배합비는 비교적 팩에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상적인 화장품

분야에서의 제조방법에 따라 제조할 수 있다.

[363]

[364] <3-6> 젤

[365] 에틸바닐린 0.5 중량 %

[366] 에틸렌디아민초산나트륨 0.05 중량 %

[367] 글리세린 5.0 중량 %

[368] 카르복시비닐폴리머 0.3 중량 %

[369] 에탄올 5.0 중량 %

[370] PEG 60 경화피마자유 0.5 중량 %

[371] 트리에탄올아민 0.3 중량 %

[372] 방부제, 색소, 향료 적량

[373] 정제수 to 100 중량 %

[374] 상기의 배합비는 비교적 젤에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상적인 화장품 분야에서의 제조방법에 따라 제조할 수 있다.

[375]

[376] 상기 배합비는 비교적 화장료 조성물에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그외의 색채 화장품을 포함하는 다양한 용도의 화장품에 적용될 수 있는 것이고, 그 효능에 따라 인체에 얹게 도포하여 바를 수 있는 약제 즉, 연고로 제조에 이용될 수 있으며 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

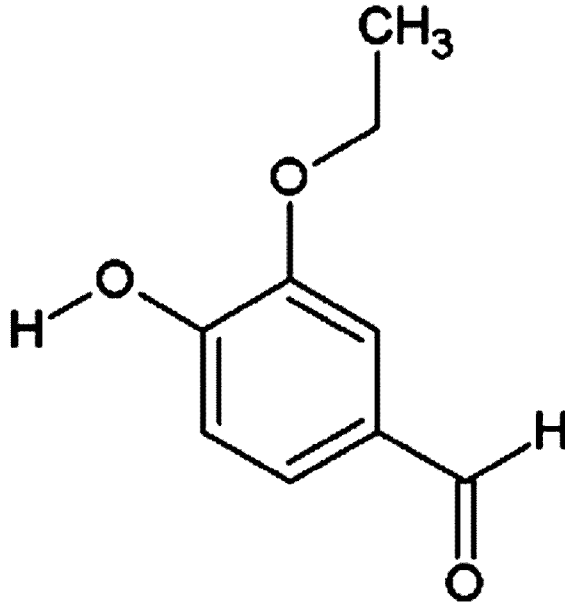
[377]

[378] 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.

청구범위

[청구항 1] 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 에틸바닐린은 하기 [화학식 1]의 구조를 가지는 화합물인 것을 특징으로 하는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물:
[화학식 1]



[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 p-4E-BP1 및 p-p70S6K1 단백질의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 MuRF1(Muscle Ring-Finger Protein), MaFbx(Muscle atrophy F-box) 또는 미오스타틴의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

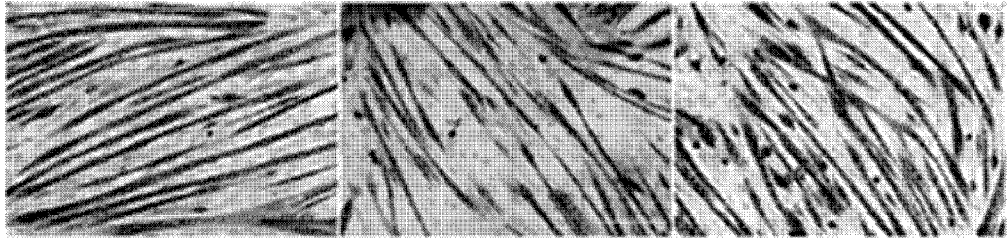
[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증, 악액질(cachexia), 경직성 척추 증후군(rigid spinesyndrome), 근위축성 측삭경화증(루게릭병, amyotrophic lateral sclerosis), 샤르코-마리-투스병(Charcot-Marie-Tooth disease) 및 근육 감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 6] 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 개선용 건강기능성 식품 조성물.

- [청구항 7] 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 분화 촉진, 근육 재생, 근 기능 개선 또는 근육 강화용 건강기능성 식품 조성물.
- [청구항 8] 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 개선용 가축 사료용 조성물.
- [청구항 9] 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근육 분화 촉진, 근육 재생, 근 기능 개선 또는 근육 강화용 가축 사료용 조성물.
- [청구항 10] 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 근 기능 개선용 화장품 조성물.
- [청구항 11] 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여 또는 복용시키는 단계를 포함하는 근육 질환 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증, 악액질(cachexia), 경직성 척추 증후군(rigid spinesyndrome), 근위축성 측삭경화증(루게릭병, amyotrophic lateral sclerosis), 샤르코-마리-투스병(Charcot-Marie-Tooth disease) 및 근육 감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 근육 질환 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 13] 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여 또는 복용시키는 단계를 포함하는 근육 분화 촉진, 근육 재생 또는 근육 강화 방법.
- [청구항 14] 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 조성물의 근육 질환 예방 또는 치료 용도.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증, 악액질(cachexia), 경직성 척추 증후군(rigid spinesyndrome), 근위축성 측삭경화증(루게릭병, amyotrophic lateral sclerosis), 샤르코-마리-투스병(Charcot-Marie-Tooth disease) 및 근육 감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 근육 질환 예방 또는 치료 용도.
- [청구항 16] 에틸바닐린(ethyl vanilline) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 조성물의 근육 분화 촉진, 근육 재생 또는 근육 강화 용도.

[도 1]

a

Dexamethasone
(50 μ M)

-

+

+

Ethyl vanillin
(100 μ M)

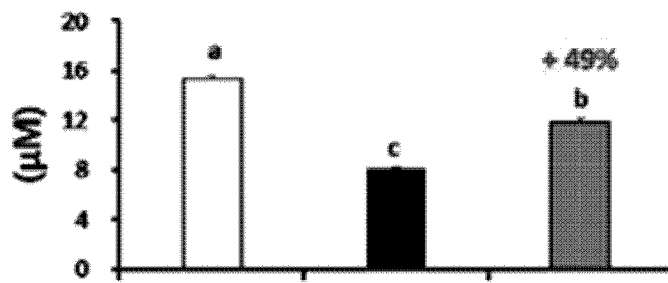
-

-

+

Myotube Diameter

b

Dexamethasone
(50 μ M)

-

+

+

Ethyl vanillin
(100 μ M)

-

-

+

[도2]

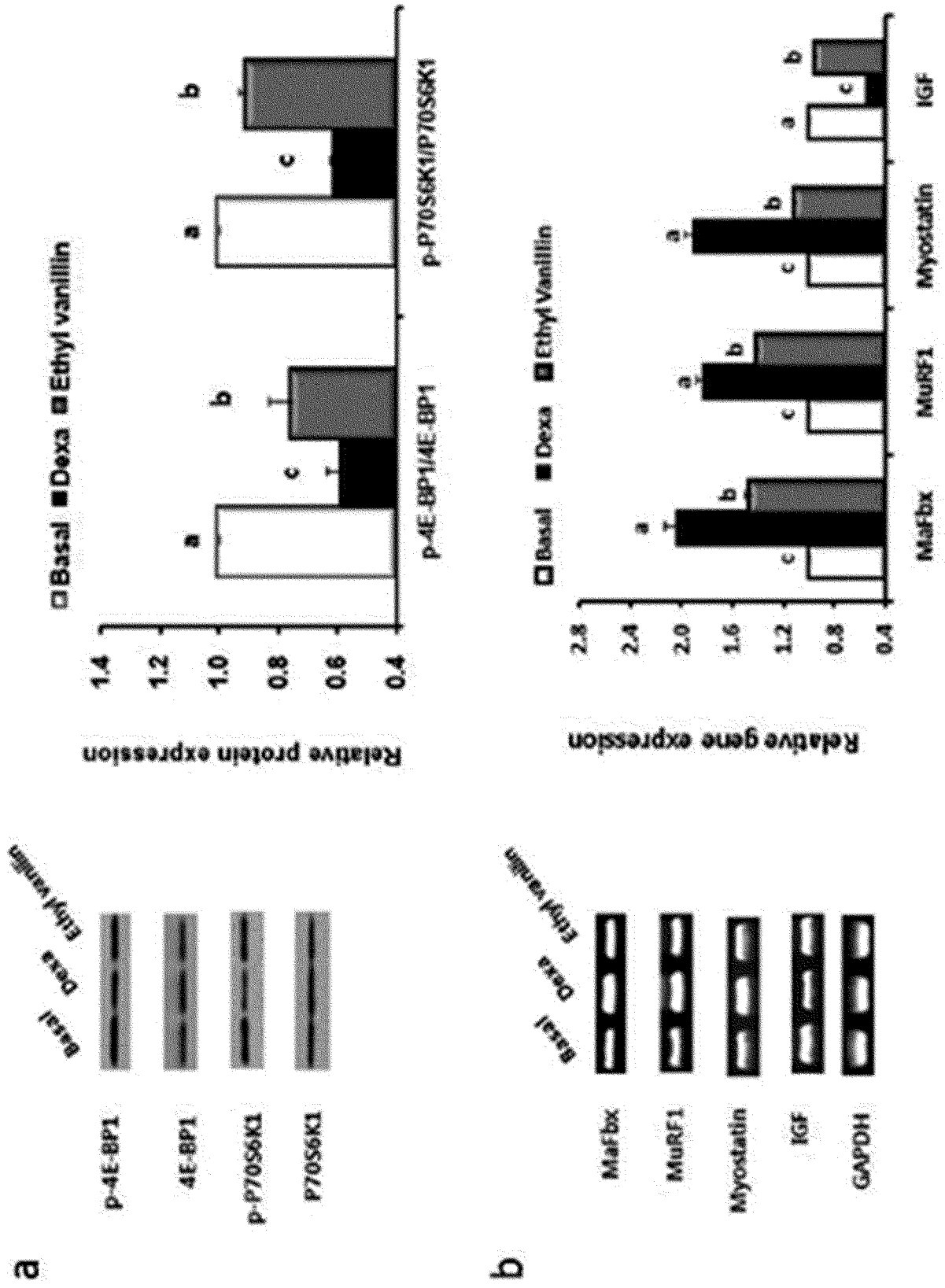
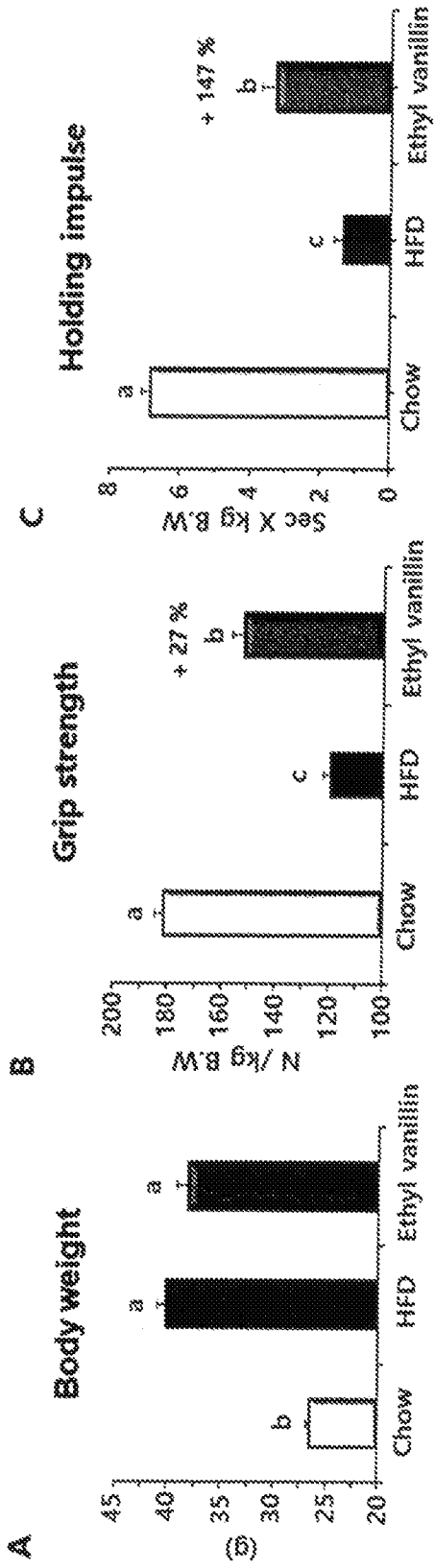
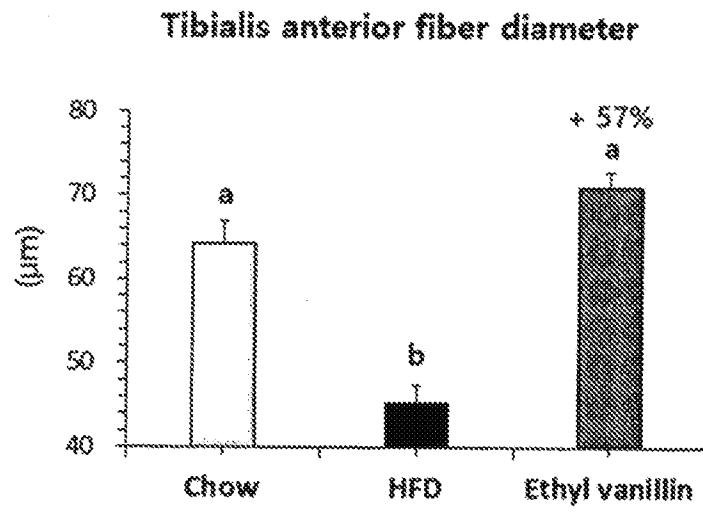
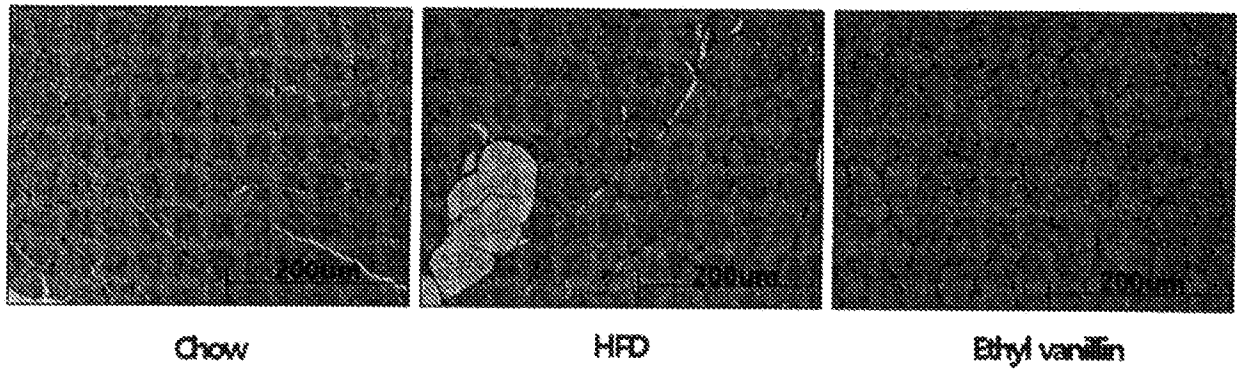


Figure 3



[E4]

Tibialis anterior

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/008071

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/11(2006.01)i, A23L 33/105(2016.01)i, A61K 8/33(2006.01)i, A61Q 19/00(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)

A61K 31/11; A01N 65/20; A01N 65/22; A61K 31/366; A61K 36/752; A61P 43/00; A23L 33/105; A61K 8/33; A61Q 19/00

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: ethyl vanillin, 3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde, muscle, myosin, myogenesis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2006-0240131 A1 (WARRENBURG, W. S. et al.) 26 October 2006 See abstract; claims 1-5.	1-10,14-16
A	JUNG, H. J. et al., "Assessment of the Anti-angiogenic, Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Properties of Ethyl Vanillin", Archives of Pharmacal Research, 2010, Vol. 33, pages 309-316 See the entire document.	1-10,14-16
A	YEMIS, G. P. et al., "Effect of Vanillin, Ethyl Vanillin, and Vanillic Acid on the Growth and Heat Resistance of Cronobacter Species", Journal of Food Protection, 2011, Vol. 74, pages 2062-2069 See the entire document.	1-10,14-16
A	KR 10-1006556 B1 (BINEX CO., LTD.) 07 January 2011 See the entire document.	1-10,14-16
A	JP 2013-245164 A (KAO CORP.) 09 December 2013 See the entire document.	1-10,14-16



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

28 DECEMBER 2018 (28.12.2018)

Date of mailing of the international search report

02 JANUARY 2019 (02.01.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/008071

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.: **11-13**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 11-13 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of 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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest


- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/008071

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2006-0240131 A1	26/10/2006	EP 1430901 A1 US 2004-0033279 A1 US 2008-0021262 A1 US 7097863 B2 US 7264830 B2	23/06/2004 19/02/2004 24/01/2008 29/08/2006 04/09/2007
KR 10-1006556 B1	07/01/2011	KR 10-2009-0066949 A	24/06/2009
JP 2013-245164 A	09/12/2013	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/11(2006.01)i, A23L 33/105(2016.01)i, A61K 8/33(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 31/11; A01N 65/20; A01N 65/22; A61K 31/366; A61K 36/752; A61P 43/00; A23L 33/105; A61K 8/33; A61Q 19/00 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: 에틸바닐린, 3-ethoxy-4-hydroxy benzoaldehyde, 근육, myosin, myogenesis		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2006-0240131 A1 (WARRENBURG, W. S. 등) 2006.10.26 요약; 청구항 1-5 참조.	1-10,14-16
A	JUNG, H. J. et al., "Assessment of the anti-angiogenic, anti-inflammatory and anti nociceptive properties of ethyl vanillin", Archives of Pharmacal Research, 2010, Vol. 33, pages 309-316 문서 전체 참조.	1-10,14-16
A	YEMIS, G. P. et al., "Effect of vanillin, ethyl vanillin, and vanillic acid on the growth and heat resistance of Cronobacter Species", Journal of Food Protection, 2011, Vol. 74, pages 2062-2069 문서 전체 참조.	1-10,14-16
A	KR 10-1006556 B1 (주식회사 바이넥스) 2011.01.07 문서 전체 참조.	1-10,14-16
A	JP 2013-245164 A (KAO CORP.) 2013.12.09 문서 전체 참조.	1-10,14-16
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 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 2018년 12월 28일 (28.12.2018)	국제조사보고서 발송일 2019년 01월 02일 (02.01.2019)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 이기철 전화번호 +82-42-481-3353	

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: 11-13
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 11-13은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a) (i) 및 PCT 규칙 39.1(vi)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
- 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.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

- 1. 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
- 2. 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
- 3. 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
- 4. 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2006-0240131 A1	2006/10/26	EP 1430901 A1 US 2004-0033279 A1 US 2008-0021262 A1 US 7097863 B2 US 7264830 B2	2004/06/23 2004/02/19 2008/01/24 2006/08/29 2007/09/04
KR 10-1006556 B1	2011/01/07	KR 10-2009-0066949 A	2009/06/24
JP 2013-245164 A	2013/12/09	없음	