

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024년 12월 19일 (19.12.2024)



WIPO PCT



(10) 국제공개번호

WO 2024/258147 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 31/437 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

A23L 33/10 (2016.01)

A23K 20/137 (2016.01)

A61K 36/36 (2006.01)

A61K 31/41 (2006.01)

A61K 31/706 (2006.01)

A61K 31/366 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2024/007964

(22) 국제출원일:

2024년 6월 11일 (11.06.2024)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2023-0075248 2023년 6월 13일 (13.06.2023) KR

10-2023-0089732 2023년 7월 11일 (11.07.2023) KR

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

(72) 발명자: 김철영 (KIM, Chul Young); 14070 경기도 안양시 동안구 귀인로 237, 210동 1102호, Gyeonggi-do (KR). 김재용 (KIM, Jae Yong); 06800 서울특별시 서초구 현릉로8길 58, 111동 802호, Seoul (KR). 이주희 (LEE, Ju hee); 21402 인천광역시 부평구 부일로 113번길 11, 105동 204호, Incheon (KR).

(74) 대리인: 특허법인 다해 (DAHAI INTERNATIONAL PATENT & LAW FIRM); 06732 서울특별시 서초구 서운로13, 502호, Seoul (KR).

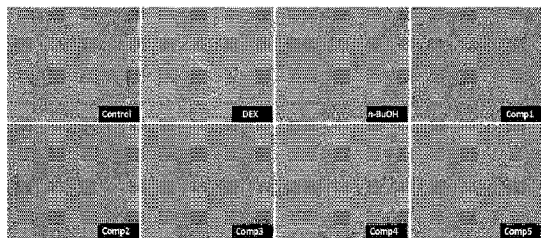
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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).

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING AND ALLEVIATING OR TREATING SKELETAL MUSCLE ATROPHY OR SARCOPENIA, COMPRISING EXTRACT OF STELLARIA DICHOTOMA L. VAR. LANCEOLATA BUNGE OR COMPOUND ISOLATED THEREFROM AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 은시호 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 함유하는 골격근 위축 또는 근감소증의 예방용 및 개선용 또는 치료용 조성물

[도8]



(57) Abstract: Provided is a pharmaceutical composition for preventing and treating or alleviating skeletal muscle atrophy or sarcopenia, comprising an extract of *Stellaria dichotoma* L. var. *lanceolata* Bunge as an active ingredient. A composition for preventing, alleviating, or treating muscle atrophy or sarcopenia of the present invention comprising, as an active ingredient, an extract of *Stellaria dichotoma* L. var. *lanceolata* Bunge, a fraction thereof, or dichotomine B, glucodichotomine B, shaftoside, or isoshaftoside isolated therefrom increases the thickness of muscle fibers, has few side effects due to being derived from natural products, and has high safety, thereby being able to be useful for preventing, alleviating, or treating muscle atrophy or sarcopenia.

(57) 요약서: 은시호 추출물을 유효성분으로 포함하는 골격근 위축 또는 근감소증의 예방 및 치료용 또는 개선용 약학적 조성물이 제공되며, 본 발명의 은시호 추출물, 분획물 또는 이로부터 분리된 디코토민 B (Dichotomine B), 글루코디코토민 B (Glucodichotomine B), 샤프토사이드 (Shaftoside), 또는 이소샤프토사이드 (Isoshaftoside)를 유효성분으로 함유하는 근위축증 또는 근감소증 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 근섬유의 굵기를 증가시키고, 천연물 유래로 부작용이 거의 없고 안전성이 높으므로, 근위축증 또는 근감소증의 예방, 개선 또는 치료에 있어 유용하게 활용될 수 있다.

[다음 쪽 계속]

WO 2024/258147 A1

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

발명의 설명

발명의 명칭: 은시호 추출물 또는 이로부터 분리된
화합물을 유효성분으로 함유하는 골격근 위축 또는
근감소증의 예방용 및 개선용 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 골격근 위축 또는 근감소증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 은시호(*Stellaria dichotoma* L. var. *lanceolata* Bunge) 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 하는 골격근 위축 또는 근감소증 예방, 개선 또는 치료용 약학 조성물, 식품 조성물 또는 사료용 조성물에 관한 것이다

배경기술

- [2] 골격근은 인체 내에서 가장 큰 질량을 가지는 조직으로, 약 600여개가 존재하며 체중의 40-50%를 차지한다. 이들은 인체 내에서 운동, 호흡, 자세 유지, 체온 유지, 에너지 대사 등 신체 기능에 있어 중요한 역할을 수행하고 있다. 이러한 골격근의 질량은 근육 내 단백질 합성과 분해의 균형에 의해 조절이 되는데, 분해가 합성보다 증가하게 되면 골격근의 소실로 이어지며 40대부터 매 10년간 약 8%씩 감소하다가 70대가 되면 10년간 감소율은 15%로 증가하게 된다.
- [3] 근위축증(Muscle atrophy)은 신체의 노화, 오랜 기간 근육의 미사용, 운동 부족, 호르몬 부족, 다양한 질환(악액질, 패혈증, 기아, 암, 당뇨, 만성 염증, 퇴행성 질환 등) 등 여러 요인에 의해 발생한다. 이러한 근위축이 발생하게 되면 기본적으로 신체활동을 위한 근력이 약화되고 나아가서는 근골격계 퇴화로 이어져 운동능력 저하, 신체기능 감소, 낙상과 골절 위험 증가, 일상생활 수행능력 저하, 사망 위험 증가 등으로 삶의 질이 급격히 떨어지게 된다. 뿐만 아니라 골격근의 감소 및 근골격계 퇴화는 골절, 관절 손상, 대사증후군, 비만, 이상지질혈증 및 심혈관 질환 등 다양한 질병의 발생 위험을 증가시킨다. 따라서, 건강하고 행복한 삶을 살아가기 위해서는 여러 요인에 의한 근위축의 발생 및 골격근의 손실을 줄이고 재생을 증가시키는 것이 매우 중요하다.
- [4] 근위축은 PI3K/Akt/mTOR 기전의 저해 및 이들의 하위 인자인 4E-BP1, p70S6K 등의 활성 억제를 통한 근섬유의 합성 저해와 유비퀴틴-프로테아좀 경로의 활성화에 의한 단백질 분해 증가가 중요한 원인이다. MAFbx (Muscle atrophy F-box)/atrogen-1 및 MuRF1 (Muscle RING finger-1)는 대표적인 단백질 분해 인자인데, 이러한 인자들의 발현 증가는 근육 단백질 분해에 직접적인 영향을 미친다.
- [5] 손상된 골격근의 재생(Muscle regeneration)을 위해서는 근원세포(Myoblast)의 증식(Proliferation)과 분화, 그리고 근관세포(Myotube)의 성장(Hypertrophic growth)이 필수적이다. 근원세포는 증식을 위해 다양한 성장인자들을 분비하며, MyoD, Myogenin, MHC (Myosin Heavy Chain)와 같은 근원성 단백질들의 발현을

통해 근관세포로의 분화를 유도한다. 골격근의 동화작용은 mTOR (Mammalian target of rapamycin) 신호전달에 의해 조절된다. mTOR가 인산화 (활성화)가 되면 p70S6K (Ribosomal p70 S6 kinase)의 인산화를 유도하고, 이는 최종적으로 근원성 단백질들의 합성을 증가시킨다.

- [6] 다양한 천연물 (황련, 인삼, 검정콩, 흑삼)과 그들의 성분 물질들을 이용한 근위축 억제 및 골격근세포의 분화 및 비대 유도에 관한 효능에 관한 연구 결과가 보고된 바 있다. 이러한 결과들은 천연물 유래 물질들이 근위축을 억제하고 골격근세포의 분화 및 비대 유도에 효과적으로 작용할 수 있고, 건강기능식품으로서의 개발 가능성이 높다는 것을 보여준다.
- [7] 은시호(*Stellaria dichotoma* L. var. *lanceolata* Bunge)는 중국, 유럽, 러시아, 몽골 지역에서 재배되는 식죽과의 은시호(*Stellaria dichotoma* L. var. *lanceolata* Bunge)의 뿌리를 말린 것으로 원기둥모양에 가깝고 가지가 있으며, 길이 15-40 cm, 지름 10-25 mm이다. 바깥면은 연한 노란색 또는 황백색이고 꼬여있는 세로주름 및 겹뿌리 자국이 있으며 구멍모양으로 오목하게 패여 있으며 이 부근을 세로로 자르면 가루 모양의 물질이 나오고 또한 갈색의 틈을 볼 수 있다. 위쪽 끝에는 촘촘하게 사마귀 모양으로 돌기된 줄기가 붙었던 자국을 볼 수 있다. 질은 단단하지만 부서지기 쉬우며 자르기 쉽다. 자른 면에는 틈새가 있고 피부는 매우 얇으며 목부에서는 노란색과 흰색이 엇갈리는 방사상 무늬를 볼 수 있다. 다른 이름으로는 백근자, 사삼아, 우두근, 은하시호, 은호 및 토삼 등이 있다. 이들은 봄이나 가을에 뿌리를 캐어 물에 씻은 후 뿌리와 줄기를 다듬어 햇볕에 말린 후 약용한다.
- [8] 은시호의 주요 화합물은 베타-카르볼린 알칼로이드(β -Carboline alkaloid), 환원상 펩타이드 계열의 알칼로이드(Cyclic peptide alkaloid)이며 플라보이드(Flavonoid), 네오리그난(Neolignan), 스테롤(Sterol), 테르페노이드(Terpenoid) 등의 여러 화합물이 보고 되었다. 은시호는 제감열, 청허열의 효능이 있어 한방에서 주로 해열제로 사용되며 소모성 질환, 영아 영양실조 증후군을 치료하는 한약으로도 사용된다. 또한, 최근 연구에 따르면 항알레르기, 혈관이완, 항염증, 아토피 피부염 개선 등의 효능을 가진다고 보고 되어 있다.
- [9] 하지만 아직까지 은시호 추출물의 골격근(Skeletal muscle)에 대한 근위축(Atrophy) 예방 및 개선 효과에 대해 알려진 바 없다. 이에, 본 발명자들은 근위축을 막아줄 수 있는 천연물 유래 성분에 관하여 예의 연구한 결과, 은시호 추출물을 포함하는 조성물의 근위축 예방 효과가 우수한 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

기술적 과제

- [10] 따라서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 은시호 추출물, 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 이용하여 골격근 위축 또는 근감소증의 예방 및 개선용 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [11] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 은시호 추출물을 유효성분으로 포함하는 골격근 위축 또는 근감소증의 예방 및 치료용 또는 개선용 약학적 조성물을 제공한다.
- [12] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 은시호 추출물은 물(H₂O), C1내지 C4의 저급알코올, n-헥산, 에틸아세테이트, 아세톤, 부틸아세테이트, 1,3-부틸렌 글리콜, 메틸렌클로라이드, 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 용매로 추출된 것이다.
- [13] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 약학적 조성물은, 상기 은시호 추출물로부터 분획된 분획물이다.
- [14] 본 발명은 또한 디코토민 B (Dichotomine B), 글루코디코토민 B(Glucodichotomine B), 샤프토사이드(Shaftoside), 이소사프토사이드(Isoshaftoside) 및 이의 약학적으로 허용되는 염으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 골격근 위축 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [15] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 디코토민 B (Dichotomine B), 글루코디코토민 B(Glucodichotomine B), 샤프토사이드(Shaftoside), 이소사프토사이드(Isoshaftoside)는 은시호로부터 추출된 것이다.
- [16] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 근위축은 근감소증(Sarcopenia), 불용성 근위축(Disuse atrophy), 기계적 자극 부재에 의한 근위축, 신경 지배 상실성 근위축(Denervational atrophy), 악액질(Cachexia), 약물유인성 근 위축(Drug induced atrophy), 영양결핍성 근위축(Malnutritional atrophy), 및 근이영양증(Muscular dystrophy)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 근위축이다.
- [17] 본 발명은 또한 은시호 추출물을 유효성분으로 포함하는 골격근 위축 또는 근감소증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [18] 본 발명은 또한 은시호 추출물을 유효성분으로 포함하는 골격근 위축 또는 근감소증의 예방 또는 개선용 사료용 조성물을 제공한다.
- [19] 본 발명은 또한 디코토민 B (Dichotomine B), 글루코디코토민 B(Glucodichotomine B), 샤프토사이드(Shaftoside) 및 이소사프토사이드(Isoshaftoside)로부터 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 골격근 위축 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하며, 상기 디코토민 B (Dichotomine B), 글루코디코토민 B(Glucodichotomine B), 샤프토사이드(Shaftoside), 이소사프토사이드(Isoshaftoside)는 은시호로부터 추출된 것이다.

- [20] 본 발명은 또한 디코토민 B (Dichotomine B), 글루코디코토민 B (Glucodichotomine B), 샤프토사이드 (Shaftoside) 및 이소샤프토사이드 (Isoshaftoside)로부터 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 골격근 위축 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공하며, 상기 디코토민 B (Dichotomine B), 글루코디코토민 B (Glucodichotomine B), 샤프토사이드 (Shaftoside), 이소샤프토사이드 (Isoshaftoside)는 은시호로부터 추출된 것이다.

발명의 효과

- [21] 본 발명의 은시호 추출물, 분획물 또는 이로부터 분리된 디코토민 B (Dichotomine B), 글루코디코토민 B (Glucodichotomine B), 샤프토사이드 (Shaftoside), 또는 이소샤프토사이드 (Isoshaftoside)를 유효성분으로 함유하는 근위축증 또는 근감소증 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 근섬유의 굵기를 증가시키고, 천연물 유래로 부작용이 거의 없고 안전성이 높으므로, 근위축증 또는 근감소증의 예방, 개선 또는 치료에 있어 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [22] 도 1은 은시호의 (추출물 및 분획물의 제조방법과 도 2는 추출물 및 분획의 HPLC 크로마토그래피 결과와 도 3은 추출물 및 분획물의 C2C12 근관세포에 처리한 사진과 도 4는 추출물 및 분획물의 C2C12 근관세포처리 후 두께를 나타낸 것이다.
- [23] 도 5는 은시호 n-부탄올 분획물에서 화합물 1 - 5를 분리정제하는 과정을 도식화 한 것이다.
- [24] 도 6은 은시호 추출물 중의 (A)부탄올 분획물과 분리 정제한 화합물(1 - 5)의 HPLC 크로마토그램, 도 7은) 분리 정제한 화합물 1 - 5의 구조, 도 8은 n-BuOH 분획물과 화합물 1-5의 근관세포에 처리한 사진, 도 9는 n-BuOH 분획물 30 μ g/mL과 화합물 1 - 5를 30 μ M을 C2C12 근관세포처리 후 세포 사멸 정도와 세포의 두께를 나타낸 것이다.
- [25] 도 10은 Dichotomine B (2)의 30 μ M 처리에서의 세포 생존율, 도 11은 텍사메타손 처리 후 dichotomine B 를 10 μ M과 30 μ M 처리한 후 MHC 염색 사진, 도 12는 세포의 두께, 도 13은 nuclei infusion index를 나타낸 것이다.
- [26] 도 14는 텍사메타손 처리 후 dichotomine B 를 10 μ M과 30 μ M 처리한 후 MHC (Myosin heavy chain), Atrogin-1, MuRF-1의 western blot 사진, 도 15는 이의 발현 정도이다.
- [27] 도 16은 C2C12 근관세포의 Starvation model에서의 dichotomine B 를 1 μ M과 10 μ M의 처리에 의한 효능을 평가한 것으로, dichotomine B 1 nM - 10 μ M 처리에 의한 세포 생존율, 도 17은 Starvation model에서 dichotomine B의 세포 생존률에 미치는 영향, 도 18은 MHC 염색 사진, 도 19는 근관세포의 두께 및 도 20은 상대적 MHC 염색 정도이다.

- [28] 도 21은 C2C12 근관세포의 Starvation model에서의 dichotomine B를 1 μ M과 10 μ M의 처리에 의한 MHC, FoxO3a, Atrogin-1 과 MuRF-1의 western blot한 결과로, Dichotomine B 1 μ M과 10 μ M 처리에 의한 Western blot, 도 22는 MHC 발현 정도, 도 23은 FoxO3a 발현 정도, 도 24는 Atrogin-1 발현 정도, 도 25는 MuRF-1의 발현 정도이다.
- [29] 도 26은 48시간 starvation 한 마우스에서 dichotomine B를 10 mg/kg 투여에 의한 몸무게의 변화, 도 27은 악력 (Grip Strength)의 변화이다.
- [30] 도 28은 48시간 starvation 한 마우스의 dichotomine B를 10 mg/kg 투여에 의한 골격근의 무게 변화를 나타낸 것으로, TA, EDL, GA, SOL의 사진, 도 29는 무게이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] 이하, 첨부한 도면을 참고로 하여 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세히 설명하면 다음과 같다.
- [32] 본 발명을 상세하게 설명하기 전에, 본 명세서에서 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 무조건 한정하여 해석되어서는 아니 되며, 본 발명의 발명자가 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해서 각종 용어의 개념을 적절하게 정의하여 사용할 수 있다.
- [33] 더 나아가 이들 용어나 단어는 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야 함을 알아야 한다.
- [34] 즉, 본 명세서에서 사용된 용어는 본 발명의 바람직한 실시예를 설명하기 위해서 사용되는 것일 뿐이고, 본 발명의 내용을 구체적으로 한정하려는 의도로 사용된 것이 아니다.
- [35] 이들 용어는 본 발명의 여러 가지 가능성을 고려하여 정의된 용어임을 알아야 한다.
- [36] 또한, 본 명세서에 있어서, 단수의 표현은 문맥상 명확하게 다른 의미로 지시하지 않는 이상, 복수의 표현을 포함할 수 있다.
- [37] 본 명세서의 전체에 걸쳐서 어떤 구성 요소가 다른 구성 요소를 "포함"한다고 기재하는 경우에는, 특별히 반대되는 의미의 기재가 없는 한 임의의 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 임의의 다른 구성 요소를 더 포함할 수도 있다는 것을 의미할 수 있다.
- [38] 본 발명은 상술한 과제를 해결하기 위한 것으로, 골격근 감소를 완화할 수 있는 천연물 유래 성분을 탐색하기 위해 예의 연구한 결과, 은시호 추출물 처리에 의해 덱사메타손(Dexamethasone)에 의한 C2C12 세포의 지름 (diameter) 감소를 효과적으로 예방할 수 있음을 확인하였다.
- [39] 또한 은시호 추출물에서 용매-용매 분획으로 분획물을 제조하였으며, 이 또한 골격근 감소를 개선하는 효능을 확인하였다.

- [40] 본 발명의 일 실시예에서는 활성분획물인 n-부탄올 분획에서 각종 크로마토그래피와 HPLC 분취를 통하여 5개의 화합물을 분리 정제하여 NMR, MASS를 이용하여 5개의 화합물을 각각 글루코디코토민 B(Glucodichotomine B), 디코토민 B(Dichotomine B), 샤프토사이드(Shaftoside), 디코토민 A(Dichotomine A) 및 이소샤프토사이드(Isoshaftoside)로 구조를 동정하였다. 이중에서 글루코디코토민 B(Glucodichotomine B) 디코토민 B(Dichotomine B), 샤프토사이드(Shaftoside), 및 이소샤프토사이드(Isoshaftoside)는 덱사메타손(Dexamethasone)에 의한 C2C12 근관세포의 지름 감소를 효과적으로 예방하였다.
- [41] 본 발명의 일 실시예에서 상기 글루코디코토민 B(Glucodichotomine B, 1) 디코토민 B(Dichotomine B), 샤프토사이드(Shaftoside), 및 이소샤프토사이드(Isoshaftosid)은 도 7에 도시된 바와 같다.
- [42] 특히 본 발명은 은시호 추출물의 활성 성분으로 분리 정제하여 구조를 동정한, 디코토민 B(Dichotomine B)가 C2C12 근관세포에서 금식(Starvation) 모델을 사용하여 세포의 지름 감소를 효과적으로 예방하였으며, MHC 염색 부위의 면적 또한 개선 되는 것을 확인하였다. 또한 디코토민 B (Dichotomine B) 10 mg/kg 복강 투여가 7주령 C57BL/6 마우스에서 48시간 금식(Starvation)에 의한 장딴지의 근육 무게와 악력 감소를 개선함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [43] 이에, 본 발명은 은시호(*Stellaria dichotoma* Linne var. *lanceolata* Bunge) 추출물, 분획물, 또는 이로부터 분리된 디코토민 B (Dichotomine B), 글루코디코토민 B(Glucodichotomine B), 샤프토사이드(Shaftoside), 또는 이소샤프토사이드(Isoshaftoside)를 유효성분으로 함유하는 근 위축(Muscle atrophy)을 예방, 개선, 및/또는 치료 용도에 제공하고자 한다.
- [44] 본 발명의 은시호 추출물은 천연물로부터 추출물을 추출하는 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라, 즉, 통상적인 온도, 압력의 조건 하에서 통상적인 용매를 사용하여 추출할 수 있다. 예컨대, 본 발명에서 은시호 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 있고, 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 75% 주정 또는 100% 주정(에탄올)을 사용하여 추출할 수 있다. 배합비에 따라 은시호의 근위축 개선효과가 있는 유효물질 추출효율이 달라질 수 있다.
- [45] 또한, 은시호로부터 추출물을 추출하는 방법은 열수 추출, 냉침 추출, 환류 추출, 초음파 추출 등의 다양한 방법을 통하여 추출할 수 있지만, 이것으로 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 환류 추출방법을 이용할 수 있다.
- [46] 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 수회 수행될 수 있다. 예컨대, 여과는 여과지를 이용하거나

감압여과기를 이용할 수 있으며, 농축은 감압 농축기, 건조는 분무 건조법, 동결건조법 등을 수행할 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다.

[47] 또한, 상기 용매로 추출한 추출물은 이후 부탄올, *n*-헥산, 메틸렌클로라이드, 아세톤, 에틸아세테이트, 에틸에테르, 클로로포름, 물, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매로 분획과정을 추가로 실시할 수도 있으나, 이에 제한되지 아니한다.

[48] 또한, 본 발명에 있어서, 은시호 추출물의 추출 시 식음이 가능한 용도의 산(acid)를 용매에 첨가하여 추출할 수 있으며, 바람직하게는 초산(Acetic acid), 구연산(Citric acid), 사과산(Malic acid), 호박산(Succinic acid), 푸마르산(Fumaric acid), 주석산(Tartaric acid), 아미노산(Amino acid), 및 젖산(Lactic acid) 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 산을 용매에 첨가할 수 있으나, 바람직하게는 초산이 첨가될 수 있고, 이 경우 용매에 첨가되는 초산은 0.1 내지 1 중량%, 바람직하게는 0.5 중량% 첨가될 수 있다.

[49] 이에, 본 발명은 (a) 건조된 은시호를 분쇄하여 분말을 제조하는 단계; 및 상기 분쇄된 은시호 분말을 물(H₂O), C1내지 C4의 저급알코올, 및 이들의 혼합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 용매와 혼합하여 추출물을 제조하는 단계를 포함하는 근위축 예방, 개선 또는 치료를 위한 은시호 추출물의 제조방법을 제공한다.

[50] 상기 제조방법에서 추출물 제조를 위한 추출방법은 환류추출법일 수 있고, 상기 추출된 추출물을 감압농축한 후 동결건조하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[51] 본 발명에서, 용어 '근위축'은 근육 합성보다 근육 분해에 치우쳐 근육세포, 섬유의 수가 감소하고 근육의 단면적이 감소하여 점진적으로 근육량이 저하된 상태를 말하며, 근육의 약화 및 퇴행을 일컫는다. 근위축은 비활동, 질병, 산화적스트레스, 만성 염증에 의해 촉진되며 근육의 기능과 운동 능력을 감소시키는 것을 말한다. 일반적으로 근위축은 근육 단백질의 감소에 의한 생리학적, 조직화학적 및 생화학적 변화를 동반하며 골격근의 고유 기능 장애를 초래할 수 있는데, 본 발명의 은시호 추출물이 근섬유의 활성 상승 및 보호 기능을 통해 상기 근위축으로부터 야기되는 골격근 고유 기능을 유지, 보존하는 목적으로 사용될 수 있다.

[52] 본 발명에 있어서, 상기 근감소증 또는 근위축증은 근감소증(Sarcopenia), 근육퇴행위축증, 긴장감퇴증, 불용성 근위축증(Disuse atrophy), 기계적 자극 부재에 의한 근위축증, 신경지배 상실성 근위축증(Denervational atrophy), 악액질(Cachexia), 약물유인성 근 위축증(Drug induced atrophy), 영양결핍성 근위축증(Malnutritional atrophy), 및 근이영양증(Muscular dystrophy)으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나인 것을 특징으로 할 수 있으나, 반드시 이에 제한되지 않는다.

- [53] 상기 불용성 근위축은 노화·질병 등에 의한 활동 제약, 오랜 침상생활, 부목(cast) 또는 석고고정(Gips) 시행 등에 의해 근육의 두께가 감소하는 것을 포함한다. 또한, 말초신경 손상, 암, 패혈증 등의 다양한 임상 질환뿐만 아니라 장기간의 침상안정, 및 노화과정 등이 동반된다. 상기 조성물은 이러한 원인이 야기할 수 있는 골격근 위축의 예방 및 증상개선을 돕는 용도로 사용할 수 있다. 상기 기계적 자극 부재에 의한 근위축과 신경 지배 상실성 근위축은 미토콘드리아의 양적 감소, 기능 이상, 미토콘드리아의 활성산소(Reactive oxygen species: ROS) 생성 증가, 산화적 손상에 의한 근육세포의 세포자살(apoptosis)을 증가시켜 근위축을 유발한다. 상기 조성물은 이러한 원인이 야기할 수 있는 골격근 위축의 예방 및 증상 개선을 돕는 용도로 사용할 수 있다.
- [54] 암, 결핵, 혈우병 등의 말기에서 볼 수 있는 고도의 전신쇠약 증세인 악액질(Cachexia)의 증상 중 하나로 급격한 수척이 있는데, 상기 조성물은 이러한 원인이 야기할 수 있는 골격근 위축의 예방 및 증상개선을 돕는 용도로 사용할 수 있다. 상기 근이영양증은 유전자 돌연변이에 의해 횡문근 형질막 구성성분인 디스트로핀-당단백질 복합체 형성부재로 발생하는 근육 위축과 근력 약화를 주 증상으로 야기되는 질환으로, 상기 조성물은 이러한 원인이 야기할 수 있는 골격근 위축의 예방 및 증상개선을 돕는 용도로 사용할 수 있다.
- [55] 코티솔(Cortisol)은 급성 스트레스에 의해 체내의 부신피질에서 분비되는 호르몬으로 스트레스에 대항하는 에너지를 공급해주는 역할을 하지만, 이의 기전에 따라 신체의 근육 위축을 야기하기도 한다. 상기 조성물은 이러한 원인이 야기할 수 있는 골격근 위축의 예방 및 증상개선을 돕는 용도로 사용할 수 있다. 합성 부신피질호르몬제는 그 이상반응으로써 스테로이드성 근병증, 근육실질의 손상 등이 야기할 수 있다. 상기 조성물은 이러한 원인이 야기할 수 있는 골격근 위축의 예방 및 증상개선을 돕는 용도로 사용할 수 있다.
- [56] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 근위축 또는 근손실을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [57] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 근위축에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [58] 본 발명에서 사용되는 용어, "완화" 또는 "개선"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 근위축 또는 근손실과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [59] 본 발명에서 용어, "약학 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.

- [60] 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.
- [61] 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.
- [62] 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.
- [63] 본 발명에서 용어, "개체"는 쥐, 가축, 생쥐, 인간 등 포유류일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다. 본 발명의 약학 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 당업계에 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, 협측 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 실리케이트, 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.

[64] 또한, 본 발명의 약학 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.

[65] 본 발명에 따른 약학 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.

[66] 본 발명에 따른 약학 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. 아울러, 본 발명은 은시호 추출물을 유효성분으로 포함하는 근감소증 또는 근위축증 예방 또는 개선용 건강기능식품으로 이용될 수 있다.

[67] 본 발명에서 용어, "건강기능식품 조성물"은 상기 은시호 추출물을 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. 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

[68] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 통하여 더욱 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.

[69] 실시예 1. 은시호 추출물의 제조

- [70] 건조된 은시호를 구매하여 분쇄기를 통해 평균 입경 기준으로 0.30 내지 0.50 mm로 분쇄하고, 분쇄한 은시호 3 kg을 5 L의 EtOH로 75°C에서 3 시간 동안 3 회 추출하였다. 추출물을 Rotary vaccum evaporator를 통해 농축한 후 Heto Power Dry LL3000을 이용하여 동결 건조하여 366.3 g의 추출물을 수득하였다.
- [71] 은시호 추출물의 HPLC 분석은 Capcell pak C18 UG120 (5 μ m, 4.6 x 250 mm, Shiseido, Japan) 컬럼을 사용하였다. 이동상으로 A: acetonitrile, B: water를 사용하였으며, 각 용매는 0.1% 포름산을 포함하였다. Chromatogram은 유속 1 mL/min의 기울기 용리 조건 0-5 min, 5-5% A; 5-45 min, 5-30% A; 45-85 min, 30-95% A; 85-90 min, 95-100% A로 분석하여 265 nm의 검출과장에서 얻었으며, 그 결과를 도 1 내지 4에 나타내었다.
- [72]
- [73] 실시예 2. 은시호 분획물의 제조
- [74] 은시호 추출물의 극성에 따른 분리를 위해 유기용매 *n*-hexane (*n*-HX), ethyl acetate (EA), *n*-butanol (*n*-BuOH)과 물을 이용한 순차적 극성 용매 분획을 수행하였다. 은시호 에탄올 추출물 366.3 g을 물 1 L에 현탁액으로 만들어 *n*-HX-EA-*n*-BuOH의 순으로 각 3회 반복 분획 후 농축하여 분획물을 얻었다. 은시호 에탄올 추출물 366.3 g의 용매 분획 결과 2.6181 g (*n*-HX), 3.9553 g (EA), 6.4428 g (*n*-BuOH), 103.52 g (water)의 분획물을 얻었으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [75]
- [76] 실시예 3. *In vitro* 에서 은시호 추출물 또는 분획물의 골격근 위축 예방, 개선, 또는 치료 효과 확인
- [77] 3-1. C2C12 세포의 배양 및 분화 유도
- [78] 본 실험에서 사용한 C2C12 마우스 근원세포는 ATCC (*American Type Culture Collection*)에서 구매하여 사용하였고, 10% 우태아혈청 (FBS), 100 U/mL 페니실린, 100 μ g/mL 스트렙토마이신 이 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)을 성장 배지로 사용하여 5% CO₂, 37°C 조건 하에서 배양하였다. C2C12 근원세포를 12-웰 플레이트에 분주하고 배양하여 세포밀도가 85~90%에 도달할 때까지 분열시킨다. 이후, 분화 유도를 위해 분화배지(2% 말 혈청, 100 U/mL 페니실린, 100 μ g/mL 스트렙토마이신이 포함된 DMEM)를 사용하여 이틀마다 새 배지로 교체하였고, 총 6일동안 분화시켰다.
- [79]
- [80] 3-2. 덱사메타손으로 근위축 유도 및 은시호 추출물 및 분획물 처리
- [81] 덱사메타손(dexamethasone)은 근육의 합성 저해 및 단백질 분해를 야기하여 근육의 위축을 유도한다. 상기 실시예 3-1에서 분화를 유도한 C2C12 세포에 덱사메타손을 처리하여 근위축을 유도하였으며, 근위축이 유도된 C2C12 세포에 은시호 추출물 및/또는 분획물을 처리하였다. 구체적인 실험 조건은 다음과 같다.

- [82] (1) 대조군(control)은 분화가 완료된 C2C12 근관세포에 분화배지를 24시간동안 처리하였다.
- [83] (2) 음성 대조군(negative control)은 분화가 완료된 C2C12 근관세포에 분화배지에 텍사메타손이 최종적으로 10 μ M의 조성을 갖도록 제조 후, 24시간동안 처리하였다.
- [84] (3) 텍사메타손 및 은시호 추출물 처리군은 상기 (2)의 음성 대조군과 같은 조건에서 추가적으로 은시호 추출물 30 μ g/mL의 조성을 갖도록 제조 후, 24시간동안 처리하였다.
- [85] (4) 텍사메타손 및 은시호 추출물의 헥산 (*n*-Hexane) 분획물 처리군은 상기 (2)의 음성 대조군과 같은 조건에서 추가적으로 은시호 추출물의 헥산 분획물 30 μ g/mL의 조성을 갖도록 제조 후, 24시간동안 처리하였다.
- [86] (5) 텍사메타손 및 은시호 추출물의 에틸아세테이트 (Ethyl acetate) 분획물 처리군은 상기 (2)의 음성 대조군과 같은 조건에서 추가적으로 은시호 추출물의 에틸아세테이트 분획물 30 μ g/mL의 조성을 갖도록 제조 후, 24시간동안 처리하였다.
- [87] (6) 텍사메타손 및 은시호 추출물의 부탄올 (*n*-BuOH) 분획물 처리군은 상기 (2)의 음성 대조군과 같은 조건에서 추가적으로 은시호 추출물의 부탄올 분획물 30 μ g/mL의 조성을 갖도록 제조 후, 24시간동안 처리하였다.
- [88] (7) 텍사메타손 및 은시호 추출물의 물 (Water) 분획물 처리군은 상기 (2)의 음성 대조군과 같은 조건에서 추가적으로 은시호 추출물의 물 분획물 30 μ g/mL의 조성을 갖도록 제조 후, 24시간동안 처리하였다.

[89]

[90] **3-3. C2C12 myotube diameter의 측정**

- [91] 상기 실시예 3-2에서 24시간 동안 시료를 처리한 각 대조군과 실험군들을 Automated cell imaging system인 JuLi제 Stage를 사용하여 촬영하고, Cell processing program인 Image J를 이용하여 촬영을 진행한 각 세포들의 굵기를 세포군당 50개씩 측정하여 평균과 표준오차를 구해 데이터 정리하였다(하기 표 1 참조). 각 실험은 3회 반복하여 수행하였다.

[92] [표1]

	대조군	Dex 처리군	DEX + 은시호 추출물
C2C12 myotube diameter(% of control)	100	79.9 ^a	96.8 ^b

- [93] (Dex: 텍사메타손 (10 μ M), 은시호 추출물 (30 μ g/mL), ^a,대조군 대비 유의미 ($p < 0.01$); ^b,Dex 처리군(음성 대조군) 대비 유의미 ($p < 0.01$))

- [94] 상기 실험결과로부터, 텍사메타손 처리에 의해 C2C12 근관세포의 굵기가 감소하며, 은시호 추출물 처리에 의한 개선 효과가 나타난다는 것을 확인하였다

(표 1 및 도 4 참조). 보다 구체적으로, (1) 기본 분화배지 투여군인 대조군에 비하여 텍사메타손 10 μM 투여군에서 C2C12 근관세포의 굵기가 21.1% 감소하였다($p<0.01$). (2) 기본 분화배지에 텍사메타손을 투여한 음성 대조군에 비하여 추가적으로 은시호 추출물 30 $\mu\text{g/mL}$ 투여군에서 C2C12 근관세포의 굵기가 21.2% 증가하였다($p<0.01$). 따라서, 본 발명의 은시호 추출물은 텍사메타손으로 유도된 근위축 모델에서 유의미하게 C2C12 근관세포의 굵기 손상을 회복 시키는 것을 확인하였다.

[95]

[96] [표2]

	대조군	Dex (10 μM) 처리군				
			n-HX 분획물	EA 분획물	n-BuOH 분획물	water 분획물
C2C12 myotube diameter (% of control)	100	79.9 ^a	73.7	66.7	94.1 ^c	104.6 ^c

[97] (Dex : 텍사메타손 (10 μM), n-HX 분획물: 은시호 추출물의 헥산 분획물 (30 $\mu\text{g/mL}$), EA 분획물: 은시호 추출물의 에틸아세테이트 분획물 (30 $\mu\text{g/mL}$), n-BuOH 분획물: 은시호 추출물의 부탄올 분획물 (30 $\mu\text{g/mL}$), water 분획물: 은시호 추출물의 물 분획물 (30 $\mu\text{g/mL}$)) ^a, 대조군 대비 유의미 ($p<0.01$); ^c, Dex 처리군 (음성 대조군) 대비 유의미 ($p<0.001$)) 상기 실험 결과, 텍사메타손 처리에 의해 C2C12 근관세포의 굵기가 감소하는 나, 본 발명에 따른 은시호 추출물뿐만 아니라 그 분획물로 처리한 경우 유의미한 개선 효과가 나타난다는 것을 확인하였다(표 2 및 도 4 참조).

[98] 보다 구체적으로, (1) 기본 분화배지 투여군인 대조군에 비하여 텍사메타손 10 μM 투여군에서 C2C12 근관세포의 굵기가 21.1% 감소하였다($p<0.01$). (2) 기본 분화배지에 텍사메타손을 투여한 음성 대조군에 비하여 추가적으로 은시호 추출물의 부탄올 분획물 30 $\mu\text{g/mL}$ 투여군에서 C2C12 근관세포의 굵기가 17.8% 증가하였다($p<0.001$). (3) 기본 분화배지에 텍사메타손을 투여한 음성 대조군에 비하여 추가적으로 은시호 추출물의 물 분획물 30 $\mu\text{g/mL}$ 투여군에서 C2C12 근관세포의 굵기가 30.9% 증가하였다($p<0.001$). 따라서, 본 발명의 은시호 추출물의 부탄올 및 물 분획물은 텍사메타손으로 유도된 근위축 모델에서 유의미하게 C2C12 근관세포의 굵기 손상을 회복 시키는 것을 확인하였다.

[99]

[100] 실시예 4. 은시호 *n*-부탄올 분획물에서의 화합물 1-5의 분리 정제 및 구조 동정

- [101] 은시호 분획물 중 강한 생리활성을 보인 *n*-BuOH 층을 Diaion HP-20 macroporus resin을 사용하여 open column chromatography를 수행하였다. 이동상으로 MeOH을 사용하였으며 MeOH의 비율을 0%부터 100%까지 5%씩 증가시키며 1 L씩 3 회에 걸쳐 흘려주었다. 이후 1 L의 Acetone을 3 차례 흘려주어 column을 washing하였다. 용매는 감압회전농축기와 동결건조기를 사용하여 제거하였다. Open column chromatography를 통해 1차적으로 분리한 14개의 분획물 중 8번과 13번 fraction을 preparative HPLC 사용하여 단일성분으로 분리하였다. β-카볼린 (β-Carboline) 알칼로이드(Alkaloid)가 검출되는 파장인 265 nm에서 분리를 진행하였으며 이동상으로 0.1%의 TFA가 함유된 ACN과 Water를 사용하였다. Fraction 8번은 Cosmosil C18 칼럼(20x150 mm)을 사용하여 기울기 용리 조건으로 ACN을 5-20%까지 50분 동안 흘려주어 화합물 (1 - 5)을 용출시켰으며, fraction 14번은 INNO C18 칼럼(20x250 mm)을 사용하여 등용매 용리 조건으로 18%의 ACN을 흘려주어 화합물(2와 4)를 분리하였다(도 5 참조).
- [102]
- [103] 실시예 5. *In vitro* 에서 은시호에서 분리 정제한 화합물의 구조 분석
- [104] 분리 제한 화합물은 NMR, MASS 등 분광학적 방법에 의해서 글루코디코토민 B(Glucodichotomine B, 화합물 1), 디코토민 B (Dichotomine B, 화합물 2), 샤프토사이드(Shaftoside, 화합물 3), 디코토민 A(Dichotomine A, 화합물 4) 및 이소샤프토사이드(Isoshaftoside, 화합물 5)로 구조를 동정하였다 (도 6 및 7 참조).
- [105]
- [106] 글루코디코토민 B(Glucodichotomine B)
- [107] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ ppm 4.05 (2H, d, J= 7.9 Hz, H-15), 4.52 (1H, d, J=7.6 Hz, G-1'), 5.42 (1H, m, H-14), 7.42 (1H, t, H-6), 7.62 (1H, t, H-7), 7.71 (1H, d, J=7.4 Hz, H-8), 8.40 (1H, d, J=7.4 Hz, H-5), 8.87 (1H, s, H-4), 11.79 (1H, s, NH-9).
- [108] ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ ppm 61.71 (G-6'), 64.95 (C-15), 70.63 (G-4'), 74.32 (G-2'), 76.88 (G-5'), 77.24 (C-14), 77.59 (G-3'), 102.00 (G-1'), 112.95 (C-8), 116.96 (C-4), 120.59 (C-6), 121.10 (C-12), 122.43 (C-5), 129.06 (C-11), 129.36 (C-7), 135.74 (C-10), 136.74 (C-3), 141.45 (C-13), 143.21 (C-1), 167.79 (C-16)
- [109] MS (ESI, positive) m/z = 435.2 [M+H]⁺, (ESI, negative) m/z = 433.2 [M-H]⁻
- [110] UV (MeOH) emax = 236 nm, 269 nm
- [111]
- [112] 디코토민 B(Dichotomine B)
- [113] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ ppm 3.85 (2H, d, J=7.9 Hz, H-15), 5.19 (1H, m, H-14), 7.31 (1H, t, H-6), 7.60 (1H, t, H-7), 7.75 (1H, d, J=7.5 Hz, H-8), 8.39 (1H, d, J=7.5 Hz, H-5), 8.85 (1H, s, H-4), 11.83 (1H, s, NH-9).

- [114] ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 66.85 (C-15), 73.90 (C-14), 113.19 (C-8), 116.63 (C-4), 120.62 (C-6), 121.15 (C-12), 122.46 (C-5), 129.13 (C-11), 129.13 (C-7), 135.31 (C-10), 135.51 (C-3), 141.66 (C-13), 145.69 (C-1), 166.82 (C-16).
- [115] MS (ESI, positive) $m/z = 273.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, MS (ESI, negative) $m/z = 271.2$ $[\text{M}-\text{H}]^-$
- [116] UV (MeOH) $\epsilon_{\text{max}} = 236$ nm, 269 nm
- [117]
- [118] 샤프토사이드(**Schaftoside**)
- [119] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 4.53 (1H, d, $J=8.7$ Hz, G-1'), 4.96 (1H, d, $J=9.3$ Hz, A-1'), 6.81 (1H, s, H-3), 6.95 (2H, d, $J=8.0$ Hz, H-3', 5'), 7.98 (2H, d, $J=8.0$ Hz, H-2', 6'), 13.80 (1H, s, OH-5)
- [120] ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 61.32 (G-2), 66.92 (G-6), 70.31 (A-2), 70.49 (A-4), 70.79 (A-5, G-4), 74.22 (A-3), 74.77 (G-1), 75.42 (A-1), 79.88 (G-3, G-5), 108.08 (C-3), 108.54 (C-10), 104.20 (C-8), 109.83 (C-6), 116.47 (C-3', 5'), 121.80 (C-1'), 129.24 (C-2', 6'), 153.89 (C-9), 161.70 (C-4'), 164.11 (C-5, C-7), 182.88 (C-4).
- [121] MS (ESI, positive) $m/z = 565.3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, MS (ESI, negative) $m/z = 563.3$ $[\text{M}-\text{H}]^-$
- [122] UV (MeOH) $\epsilon_{\text{max}} = 270$ nm, 330 nm
- [123]
- [124] 디코토민 A(**Dichotomine A**)
- [125] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 1.58 (3H, d, $J=7.2$ Hz, H-15), 5.23 (1H, m, H-14), 7.26 (1H, t, H-6), 7.60 (1H, t, H-7), 7.74 (1H, d, $J=7.0$ Hz, H-8), 8.37 (1H, d, $J=7.0$ Hz, H-5), 8.81 (1H, s, H-4), 11.83 (1H, s, NH-9)
- [126] ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 25.04 (C-15), 64.80 (C-14), 113.14 (C-8), 116.27 (C-4), 120.52 (C-6), 121.29 (C-12), 122.34 (C-5), 128.63 (C-7), 128.70 (C-11), 129.37 (C-10), 129.61 (C-3), 137.91 (C-13), 141.56 (C-1), 169.20 (C-16).
- [127] MS (ESI, positive) $m/z = 257.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, MS (ESI, negative) $m/z = 255.2$ $[\text{M}-\text{H}]^-$
- [128] UV (MeOH) $\epsilon_{\text{max}} = 237$ nm, 269 nm
- [129]
- [130] 이소샤프토사이드(**Isoschaftoside**)
- [131] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 4.72 (1H, d, $J=8.5$ Hz, G-1'), 4.78 (1H, d, $J=9.1$ Hz, A-1'), 6.83 (1H, s, H-3), 6.95 (2H, d, $J=7.9$ Hz, H-3', 5'), 7.95 (2H, d, $J=7.9$ Hz, H-2', 6'), 13.69 (1H, s, OH-5)
- [132] ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 61.25 (G-6), 68.88 (G-2), 70.96 (A-2), 71.07 (A-4), 74.77 (A-3, G-1), 74.99 (A-1), 79.17 (G-3), 79.48 (G-5), 108.23 (C-3), 104.13 (C-10), 104.95 (C-8), 109.67 (C-6), 116.40 (C-3', 5'), 121.93 (C-1'), 129.11 (C-2', 6'), 156.28 (C-9), 160.84 (C-4), 161.71 (C-5, C-7), 163.51 (C-2), 182.76 (C-4).
- [133] MS (ESI, positive) $m/z = 565.3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, MS (ESI, negative) $m/z = 563.3$ $[\text{M}-\text{H}]^-$
- [134] UV (MeOH) $\epsilon_{\text{max}} = 270$ nm, 330 nm

[135]

[136] 실시예 6. 은시호에서 분리정제한 화합물 1 - 5의 골격근 위축 예방, 개선, 또는 치료 효과 확인

[137] **6-1. C2C12 세포의 배양 및 분화 유도**

[138] 상기의 실시예 3-1과 동일한 실험 방법을 사용하였다.

[139]

[140] **6-2. 덱사메타손으로 근위축 유도 및 은시호에서 분리 정제한 화합물 1 - 5의 처리**

[141] 상기의 실시예 3-2와 유사하게 실험을 진행하였다. 다만 추출물과 분획물 처리군과 유사하게 화합물 1 - 5를 각각 30 μ M을 처리하였다.

[142]

[143] **6-3. C2C12 myotube diameter의 측정**

[144] 상기 실시예 3-3과 동일한 방법으로 세포의 굵기를 측정하여 평균과 표준오차를 구해 데이터 정리하였다(표 3, 도 8 및 9 참조). 각 실험은 3회 반복하여 수행하였다.

[145]

[146] [표3]

	대조군	Dex (10 μ M)처리군						
		-	n-BuOH 분획물 (30 μ g/mL)	Glucodichotomine B (1) 30 μ M	Dichotomine B (2) 30 μ M	Shaftoside (3) 30 μ M	Dichotomine A (4) 30 μ M	Isoshaftsoside (5) 30 μ M
C2C12 myotube diameter (% of control)	100.0	81.3 ^a	100.7 ^b	102.0 ^b	98.2 ^b	92.7 ^c	87.9	95.7 ^c

[147] (Dex : 덱사메타손 (10 μ M), ^a,대조군 대비 유의미 ($p < 0.01$); ^b,Dex 처리군 (음성 대조군) 대비 유의미 ($p < 0.01$), ^c,Dex 처리군(음성 대조군) 대비 유의미 ($p < 0.05$))상기 실험 결과, 덱사메타손 처리에 의해 C2C12 근관세포의 굵기가 감소하며, 은시호에서 분리 정제하여 구조를 동정한 화합물 1 - 5에 의하여 개선 효과가 나타난다는 것을 확인하였다(표 3 및 도 8 및 9).

[148] 실시예 7. 은시호에서 분리 정제한 화합물 2 (디코토민 B, dichotomine B)의 골격근 감소 개선, 또는 치료 효과 확인

[149]

[150] **7-1. C2C12 세포의 배양 및 분화 유도**

[151] 상기의 실시예 3-1과 동일한 실험 방법을 사용하였다.

[152]

[153] **7-2. 텍사메타손으로 근위축 유도 및 은시호에서 분리 정제한 디코토민 B 의 처리**[154] 상기의 실시예 3-2와 유사하게 실험을 진행하였다. 다만 디코토민 B를 10 μ M과 30 μ M을처리하였다.

[155]

[156] **7 -3. C2C12 myotube의 MHC 면역 형광 염색**[157] 반응이 끝난 각각의 실험군의 세포 배지를 제거하고, 인산완충 생리식염수 (PBS) 로 2회 세척하고 4% paraformaldehyde로 15 분간 고정한 후, PBS로 3회 세척하였다. 0.1% TritonX-100에 10 분간 처리 후, PBS로 2회 세척한 후 3% horse serum 용액으로 2시간동안 블로킹 하였다. 마우스 항-MHC를 3% BSA에 1:100으로 희석하여 4°C에서 overnight 시키고 0.1% PBST로 3번 세척하였다. 이후 goat-anti-mouse IgG-FITC 2차 항체(Thermo Fisher Scientific)를 3% BSA에 1:500으로 희석하여 37°C에서 1시간 동안 반응시키고 0.1% PBST로 3번 세척하였다. 1 μ g/ml Hoechst33342 용액을 처리하여 10분 동안 상온에서 반응시킨 후 JuLiTM 을 이용하여 세포 촬영 및 이미지를 획득하였다. MyHC 면역 형광 결과는 녹색으로 시각화 하고 Hoechst33342로 표지된 세포 핵은 청색으로 시각화 하였다. 수치 분석은 Image J 프로그램을 이용하여 수행하고 그 결과를 도 11에 도시하였다.

[158]

[159] **7 -4. 다핵성 근관세포 형성 지수 (Fusion index) 분석**

[160] 상기의 7-3의 결과에서 다핵성 근관세포를 무작위로 선택하여 다핵성 근관세포의 형성지수를 산출하였다. 다핵성(multinucleated)인 근관세포수를 분석한 후, 총 세포수 (total cells)를 적용하여 각 세포에서의 상대적 multinucleated-MHC양성 근관세포수(MHC-positive myotubes)를 산출 하였다(표 4 및 도 13 참조).

[161] [표4]

	대조군	Dex (10 μ M)처리군		
		-	Dichotomine B (2) 10 μ M	Dichotomine B (2) 30 μ M
C2C12 myotube diameter (% of control)	100.0	80.0 ^a	90.3 ^b	92.3 ^b

[162] (Dex : 텍사메타손 (10 μ M), ^a,대조군 대비 유의미 ($p < 0.01$); ^b,Dex 처리군 (음성 대조군) 대비 유의미 ($p < 0.01$))상기 실험 결과, 텍사메타손 처리에 의해 C2C12 근관세포의 다핵성 근관세포 형성지수가 감소하며, 은시호에서 분리

정제하여 구조를 동정한 Dichotomine B (화합물 2)에 의하여 개선 효과가 나타난다는 것을 확인하였다(표 4 및 도 12 및 13 참조).

[163] **7-4. C2C12 myotube diameter의 측정**

[164] 상기 실시예 3-3과 동일한 방법으로 세포의 굵기를 측정하여 평균과 표준오차를 구해 데이터를 표 4에 정리하였다. 각 실험은 3회 반복하여 수행하였다.

[165]

[166] [표5]

	대조군	Dex (10 μ M)처리군		
		-	Dichotomine B (2) 10 μ M	Dichotomine B (2) 30 μ M
C2C12 myotube diameter (% of control)	100.0	80.0 ^a	97.9 ^b	100.6 ^b

[167] (Dex : 덱사메타손 (10 μ M), ^a,대조군 대비 유의미 ($p < 0.01$); ^b,Dex 처리군 (음성 대조군) 대비 유의미 ($p < 0.01$)) 상기 실험 결과, 덱사메타손 처리에 의해 C2C12 근관세포의 두께가 감소하며, 은시호에서 분리 정제하여 구조를 동정한 Dichotomine B (화합물 2)에 의하여 개선 효과가 나타난다는 것을 확인하였다 (표 5 참조).

[168]

[169] **7-5. Western Blotting**

[170] C2C12 세포를 6 well plate에 1×10^5 /well이 되도록 분주하고, 분화가 끝난 C2C12 근관세포에 각 실험군에 따라 덱사메타손과 시료를 처리하였다. 준비된 세포를 LIPA lysis buffer, protease inhibitors, phosphatase inhibitor를 함유하는 세포 용해액을 제조하여 lysis 한 후 각 well당 세포 용해액 200 μ l를 처리하고 cell scraper를 이용하여 세포를 용해 한 뒤, 13,000 rpm에서 20분동안 원심분리하여 상층액을 획득하였다. BCA 단백질 정량법을 이용하여 농도를 측정한 후 이후, 동량의 단백질을 8% SDS-PAGE를 이용하여 분리하였다. SDS-PAGE로 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane으로 전이 시키고, 3% BSA buffer로 blocking을 진행 한 후에 여러 종류의 1차 항체 (MyHC, FoxO3a, MuRF1 GAPDH 등)를 처리하고, 세척, 2차 항체 처리, 세척 과정을 순차적으로 진행 하였다. 마지막으로 ECL (enhanced chemiluminescence)을 처리하여 발현 시킨 뒤, ChemiDoc을 이용하여 이미지를 획득하였으며, Image J 프로그램을 이용하여 각 단백질들의 발현 양을 수치화 하였다.

[171] 상기 실험 결과, 덱사메타손 처리에 의해 C2C12 근관세포에서 Atrogin-1과 MuRF-1은 유의미하게 증가하였으며, MHC는 감소하는 것을 확인하였으며, Dichotomine B (화합물 2) 처리에 의하여 감소된 MHC가 농도 의존적으로

증가하였으며, 증가된 Atrogin-1과 MuRF-1은 감소하는 것을 확인하였다(도 14 내지 15 참조).

[172]

[173] 실시예 8. 은시호에서 분리 정제한 디코토민 B(Dichotomine B)의 starvation model에서의 골격근 위축 예방, 개선, 또는 치료 효과 확인

[174] **8-1. C2C12 세포의 배양 및 분화 유도**

[175] 상기의 실시예 3-1과 동일한 실험 방법을 사용하였다.

[176]

[177] * **8-2. In vitro starvation Model에서의 디코토민 B(Dichotomine B) 처리**

[178] Serum free/Low glucose 배지에서 분화된 C2C12 근관세포를 배양하면 근육의 합성 저해 및 단백질 분해를 야기하여 근육의 위축을 유도한다. 상기 실시예 8-1에서 분화를 유도한 C2C12 세포를 Serum free/Low glucose 배지에서 배양하여 근위축을 유도하였으며, 근위축이 유도된 C2C12 세포에 디코토민 B (Dichotomine B)를 처리하였다. 구체적인 실험 조건은 다음과 같다.

[179] (1) 대조군(control)은 분화가 완료된 C2C12 근관세포에 분화배지를 48시간동안 처리하였다.

[180] (2) 음성 대조군(negative control)은 분화가 완료된 C2C12 근관세포를 Serum free/Low glucose 배지에서 48시간동안 배양하였다.

[181] (3) 디코토민 B 처리군은 상기 (2)의 음성 대조군과 같은 조건에서 추가적으로 디코토민 B (Dichotomine B)를 1 μ M 또는 10 μ M의 농도로, 48시간동안 처리하였다.

[182]

[183] 8-3. C2C12 myotube의 MyHC 면역 형광 염색

[184] 상기 실시예 7-3과 동일한 방법으로 수행하였다.

[185]

[186] **8-4. C2C12 myotube diameter의 측정 및 MHC 염색 면적 비교**

[187] 상기 실시예 3-3과 동일한 방법으로 세포의 굵기와 염색 면적을 측정하여 평균과 표준오차를 구해데이터를 표 6에 정리하였다. 각 실험은 3회 반복하여 수행하였다.

[188]

[189] [표6]

	대조군	Starvation (Serum free/Low glucose 배지)		
		-	Dichotomine B (2) 1 μ M	Dichotomine B (2) 10 μ M
C2C12 myotube diameter (% of control)	100.0 $\pm$ 9.2	80.9 $\pm$ 8.2 ^a	98.6 $\pm$ 9.3 ^b	100.4 $\pm$ 10.8 ^b

MHC positive are a (% of control)	100 ± 8.1	87.1 ± 5.4 ^a	93.6 ± 7.8 ^b	97.1 ± 8.4 ^b
---	-----------	-------------------------	-------------------------	-------------------------

[190] (Dex : 텍사메타손 (10 μ M), ^a,대조군 대비 유의미 ($p < 0.01$); ^b,Dex 처리군 (음성 대조군) 대비 유의미 ($p < 0.01$))상기의 실험에서 dichotomine B는 유의미하게 myotube의 두께와 MHC로 면역형광을 통한 면적을 증가 시킴을 확인 하였다(표 6 및 도 16 내지 20 참조).**8-5. 근위축 관련 단백질의 발현량 확인**

[191] 상기 실시예 7-5와 동일한 방법으로 western blotting을 실시하여 단백질 발현량을 확인 하였다.

[192] 상기의 실험 결과 C2C12 근관세포의 starvation model에서 MHC는 감소하고, FOXO3a와 Atrogin-1, MuRF-1은 유의미하게 증가 하였으며, 이는 Dichotome B 처리에 의하여 효과적으로 개선하는 것을 확인 하였다(도 21 내지 25 참조).

[193]

[194] **실시예 9. In vivo 에서 Dichotomine B의 근위축 예방 및 개선 효과 확인**

[195] 9-1. 실험 동물

[196] 실험동물은 코아텍 (경기도 평택, 한국)으로부터 C57BL/6 mouse 6주령 모델 (수컷)을 분양 받아 한양대학교 에리카 실험동물센터 (동물시설등록증: 제 445호)에서 일주일간 검역과 순화·사육을 거친 후 실험하였다. 사육시 조명시간은 12시간 (07:00~19:00) 으로 설정하였고, 식이와 급수는 자유섭취 시켰다. 이하 실험은 한양대학교 동물실험위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee)의 방침 및 법규에 따라 진행하였다.

[197] **9-2. 근 손실 모델 유도 및 시료 투여**

[198] 실험동물 입수 및 7일간 순화 기간을 거치고 실험을 수행하였다. 사료는 실험동물용 고형사료 (우정바이오, 경기도 화성, 한국) 를 제공하고, 실험동물은 일정 시간 (오전 10:00-12:00) 내에 처치하였다. 체중 변화는 총 3회 측정하였다. 절식 그룹의 개체는 절식 기간 동안 개별 케이지에 사육하였다. 시료 투여는 절식 시작과 동시에 1회, 24시간 이후 1회 투여하여 총 2회 시료 투여하였다. 이하 실험 결과는 평균치와 표준편차로 나타내었으며, 각 군의 유의성 검정은 Statview program의 Anova t-test를 이용하여 확인하였다.

[199]

[200] **9-3. 체중 변화 확인**

[201] 절식하지 않은 군에서는 정상적인 체중 변화를 보였으나, 48시간 절식으로 인해 F군에서는 유의 수준으로 체중이 감소하였다 (표 7).

[202] [표7]

Group	Body weight (g)	
	시료 투여 시작	시료 투여 종료
Feed	21.167 ± 0.339	21.950 ± 0.404

Feed+ Dichotomine B	21.080 ± 0.370	21.400 ± 0.339
Starvation	21.800 ± 0.666	18.028 ± 1.254 ^{***}
Starvation+Dichotomine B	22.214 ± 0.701	17.743 ± 0.885 ^{***}

[203] (**p<0.001 vs. Feed)상기의 실험 결과 48 시간 동안의 절식에 의하여 실험에 사용된 마우스의 체중이 감소함을 확인하였으며 디코토민 B의 투여는 체중에 영향을 미치지 않았다 (표 7 및 도 26 참조).

[204] 9-4. Grip strength 변화 확인

[205] 절식 종료 후 Grip strength meter를 이용하여 악력(Grip strength)을 평가하였다.

[206] [표8]

Group	Grip Strength (kgf)
Feed	192.100 ± 6.973
Feed+ Dichotomine B	190.400 ± 11.747
Starvation	154.393 ± 12.630 ^{***}
Starvation+Dichotomine B	187.114 ± 10.724 ^{###}

[207] (**p<0.001 vs. Feed, ###p<0.001 vs. Starvation)상기의 실험 결과 48 시간 동안의 절식에 의하여 악력이 유의미하게 감소하였으며, 디코토민 B의 투여에 의하여 절식 그룹에 비하여 유의미하게 증가함을 확인 하였다(표 8 및 도 27 참조).

[208] 9-5. 근육조직의 무게 확인

[209] 근 손실을 확인하기 위해, 부검 후 전경골근(Tibialis anterior, TA), 장지신근(Extensor digitorum longus, EDL), 장딴지근(Gastrocnemius: GA), 가자미근(Soleus, SOL)의 무게를 측정하고, 이를 표 9에 정리하였다.

[210] 수 있었다.

[211] [표9]

Group	전경골근 (g)	장지신근 (g)	장딴지근 (g)	가자미근(g)
Feed	0.061 ± 0.005	0.015 ± 0.003	0.180 ± 0.015	0.013 ± 0.003
Feed+ Dichotomine B	0.058 ± 0.006	0.012 ± 0.002	0.169 ± 0.014	0.010 ± 0.001
Starvation	0.054 ± 0.002 ^{**}	0.012 ± 0.003 [*]	0.162 ± 0.017 ^{**}	0.009 ± 0.003 [*]
Starvation+Dichotomine B	0.058 ± 0.005 [#]	0.014 ± 0.004	0.165 ± 0.015	0.013 ± 0.005 [#]

[212] (*p<0.05 vs. Feed, **p<0.01 vs. Feed, #p<0.05 vs. Starvation) 상기 결과를 참조하면, 절식으로 인해 줄어든 전경골근의 무게는 디코토민B 10mg/kg 투여로 증가하였으며 (p<0.05), 가자미근에서도 동일한 결과 (p<0.05) 를 확인하였다.

상기 결과는, 디코토민B가 절식으로 인한 근육의 손실을 개선시키는 것을 확인할 수 있었다(표 9, 도 28 및 29 참조)

[213]

[214] 본 발명은 상술한 화합물 중 골격근 감소를 완화할 수 있는 새로운 성분으로 하기 화학식을 갖는 디코토민 B를 합성하여 본 발명에 이르렀다.

[215]

[216] 실시예 10. 디코토민 B 제조

[217] 디코토민 B를 공지된 홈페이지를 통하여 구매하였다(<https://www.medchemexpress.com>)

[218]

[219] 실시예 2 화합물의 구조 동정

[220] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 3.85 (2H, d, $J=7.9$ Hz, H-15), 5.19 (1H, m, H-14), 7.31 (1H, t, H-6), 7.60 (1H, t, H-7), 7.75 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-8), 8.39 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-5), 8.85 (1H, s, H-4), 11.83 (1H, s, NH-9).

[221] ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ ppm 66.85 (C-15), 73.90 (C-14), 113.19 (C-8), 116.63 (C-4), 120.62 (C-6), 121.15 (C-12), 122.46 (C-5), 129.13 (C-11), 129.13 (C-7), 135.31 (C-10), 135.51 (C-3), 141.66 (C-13), 145.69 (C-1), 166.82 (C-16).

[222] MS (ESI, positive) $m/z = 273.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, MS (ESI, negative) $m/z = 271.2$ $[\text{M}-\text{H}]^-$

[223] UV (MeOH) $\epsilon_{\text{max}} = 236$ nm, 269 nm

[224]

[225] 디코토민 B의 골격근 위축 또는 근감소증의 치료 및 예방는 상술한 바와 같다.

산업상 이용가능성

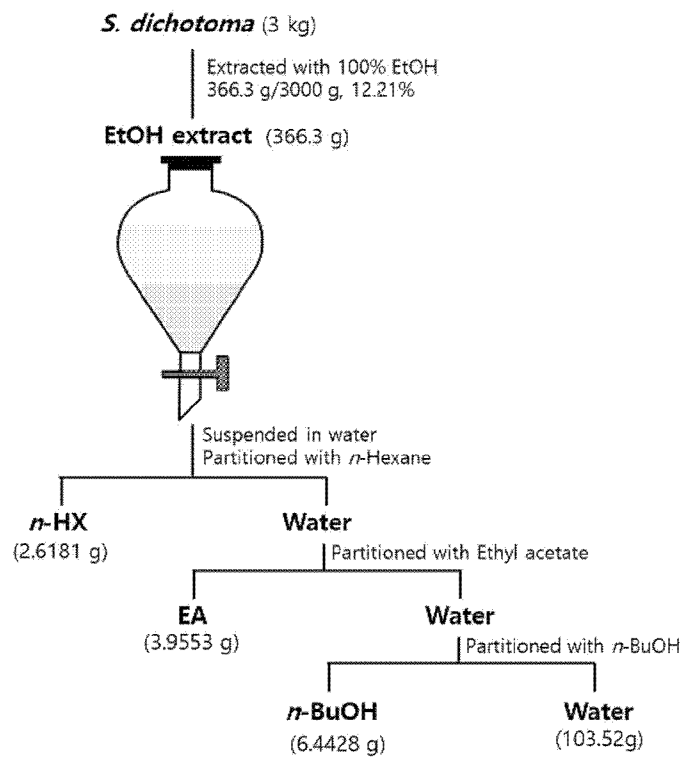
[226] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 골격근 위축 또는 근감소증의 치료 및 예방에 사용될 수 있으므로, 산업상 이용가능성이 있다.

청구범위

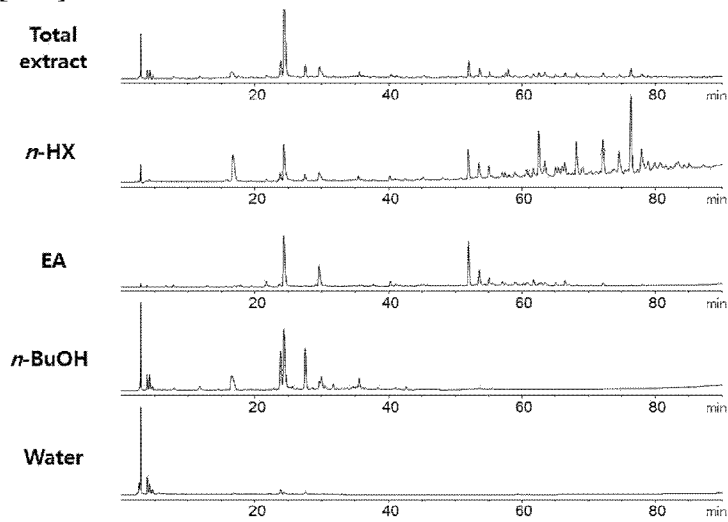
- [청구항 1] 은시호 추출물을 유효성분으로 포함하는 골격근 위축 또는 근감소증의 예방 및 치료용 또는 개선용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 은시호 추출물은 물(H₂O), C1내지 C4의 저급알코올, n-헥산, 에틸아세테이트, 아세톤, 부틸아세테이트, 1,3-부틸렌 글리콜, 메틸렌클로라이드, 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 용매로 추출된 것을 특징으로 하는 골격근 위축 또는 근감소증의 예방 및 치료용 또는 개선용 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서,
상기 약학적 조성물은, 상기 은시호 추출물로부터 분획된 분획물인 것을 특징으로 하는 골격근 위축 또는 근감소증의 예방 및 치료용 또는 개선용 약학적 조성물.
- [청구항 4] 디코토민 B (Dichotomine B), 글루코디코토민 B(Glucodichotomine B), 샤프토사이드(Shaftoside), 이소샤프토사이드(Isoshaftoside) 및 이의 약학적으로 허용되는 염으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 골격근 위축 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서,
상기 디코토민 B (Dichotomine B), 글루코디코토민 B(Glucodichotomine B), 샤프토사이드(Shaftoside), 이소샤프토사이드(Isoshaftoside)는 은시호로부터 추출된 것을 특징으로 하는, 골격근 위축 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서,
상기 근위축은 근감소증(Sarcopenia), 불용성 근위축(Disuse atrophy), 기계적 자극 부재에 의한 근위축, 신경 지배 상실성 근위축(Denervational atrophy), 악액질(Cachexia), 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 7] 은시호 추출물을 유효성분으로 포함하는 골격근 위축 또는 근감소증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 8] 은시호 추출물을 유효성분으로 포함하는 골격근 위축 또는 근감소증의 예방 또는 개선용 사료용 조성물.
- [청구항 9] 디코토민 B (Dichotomine B), 글루코디코토민 B(Glucodichotomine B), 샤프토사이드(Shaftoside) 및 이소샤프토사이드(Isoshaftoside)로부터 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 골격근 위축 예방 또는 개선용 식품 조성물.

- [청구항 10] 제 9항에 있어서,
상기 디코토민 B (Dichotomine B), 글루코디코토민 B(Glucodichotomine B), 샤프토사이드(Shaftoside), 이소샤프토사이드(Isoshaftoside)는
은시호로부터 추출된 것을 특징으로 하는, 골격근 위축 예방 또는 개선용
식품 조성물.
- [청구항 11] 디코토민 B (Dichotomine B), 글루코디코토민 B(Glucodichotomine B),
샤프토사이드(Shaftoside) 및 이소샤프토사이드(Isoshaftoside)로부터
구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 함유하는
골격근 위축 예방 또는 개선용 사료 조성물.
- [청구항 12] 제 10항에 있어서,
상기 디코토민 B (Dichotomine B), 글루코디코토민 B(Glucodichotomine B), 샤프토사이드(Shaftoside), 이소샤프토사이드(Isoshaftoside)는
은시호로부터 추출된 것을 특징으로 하는, 골격근 위축 예방 또는 개선용
식품 조성물.
- [청구항 13] 제 11항에 있어서,
상기 디코토민 B (Dichotomine B)는 화학적으로 합성된 것을 트징으로
하는, 골격근 위축 예방 또는 개선용 식품 조성물.

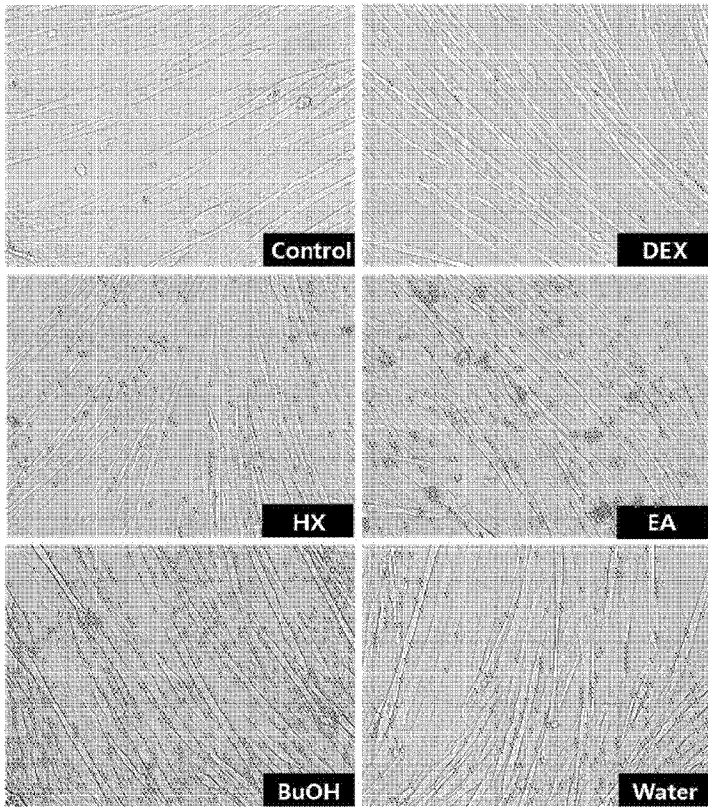
[도1]



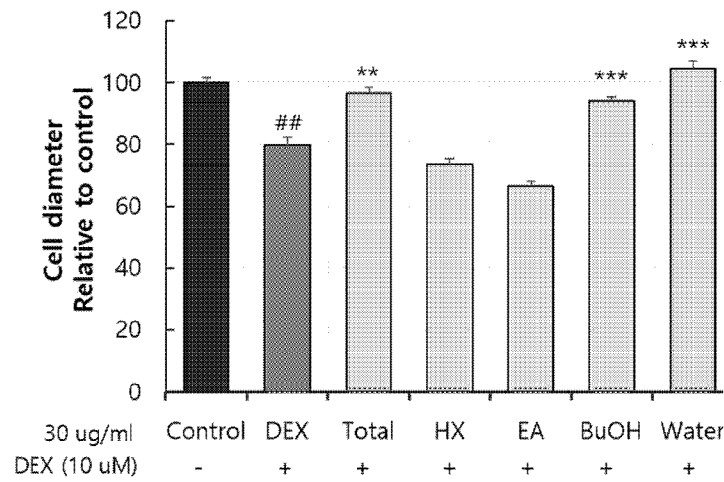
[도2]



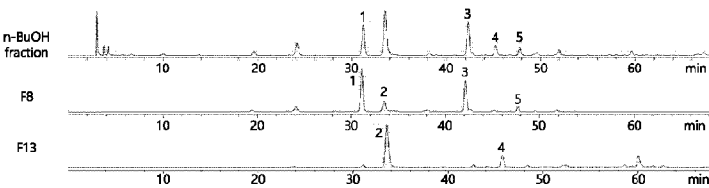
[도3]



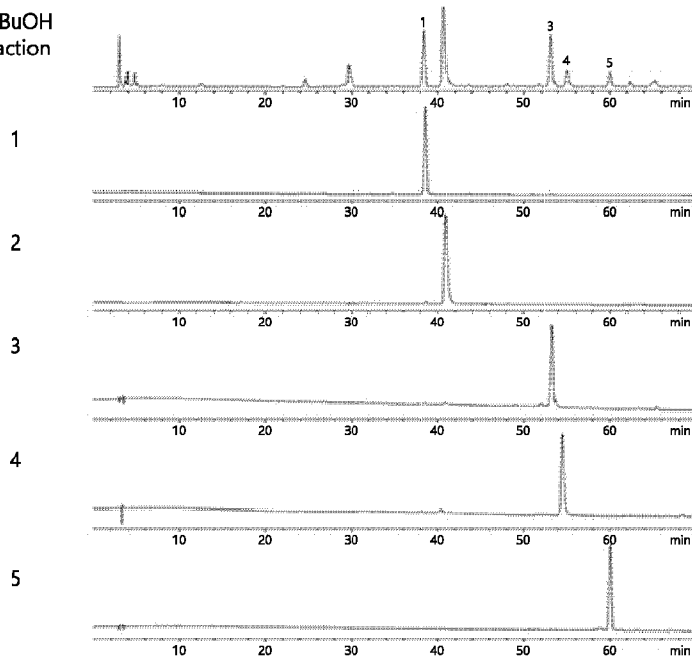
[도4]



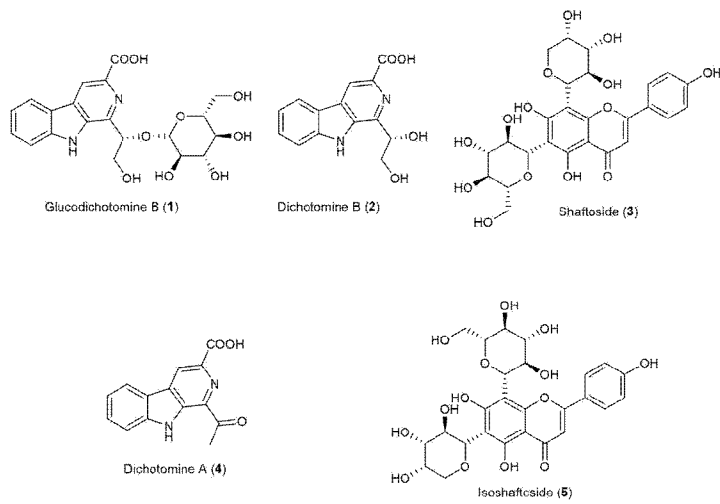
[도5]



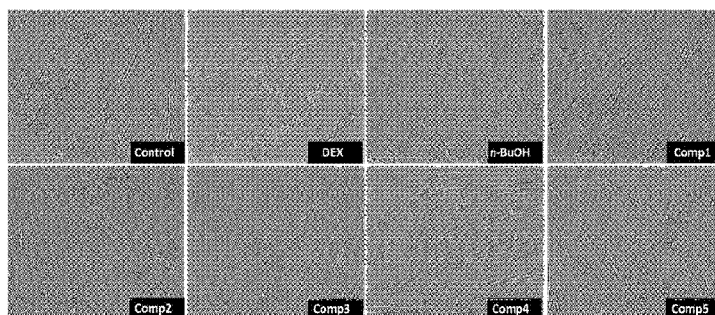
[도6]

n-BuOH
fraction

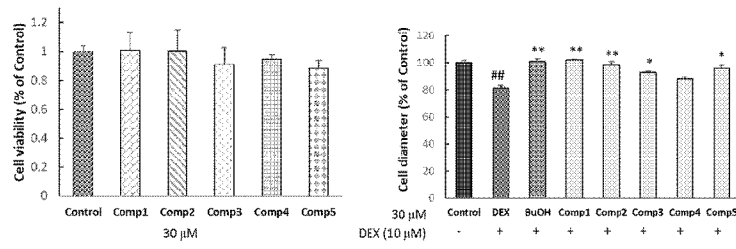
[도7]



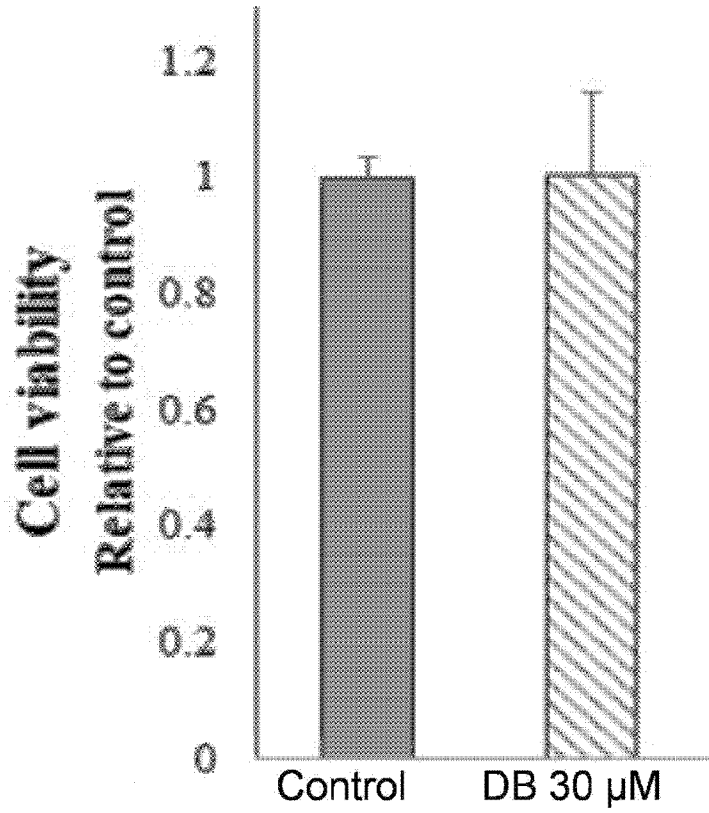
[도8]



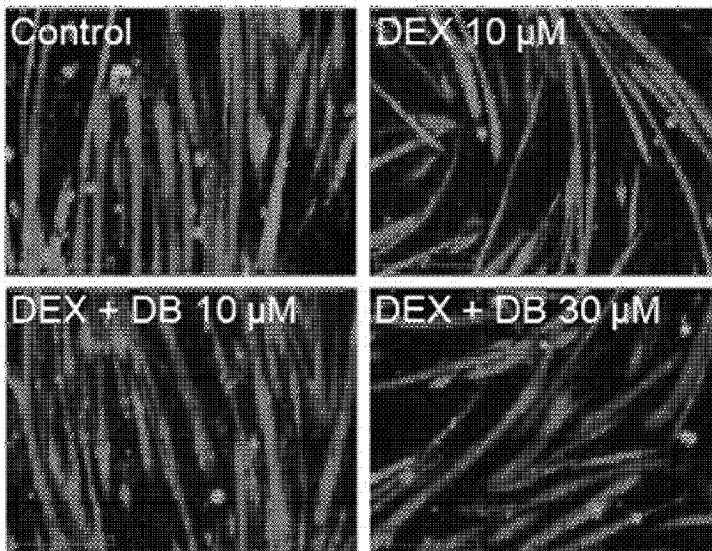
[도9]



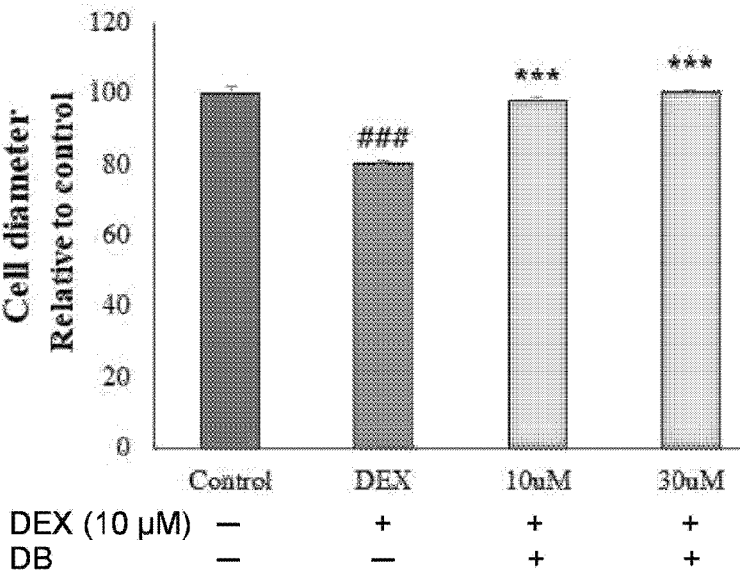
[도10]



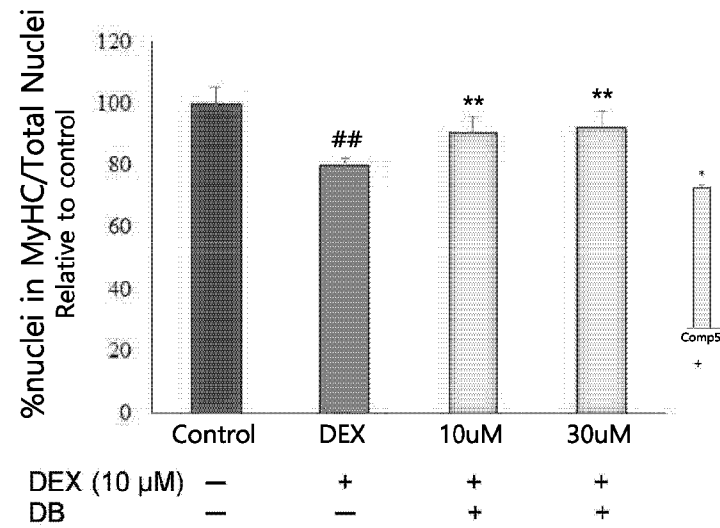
[도11]



[도12]

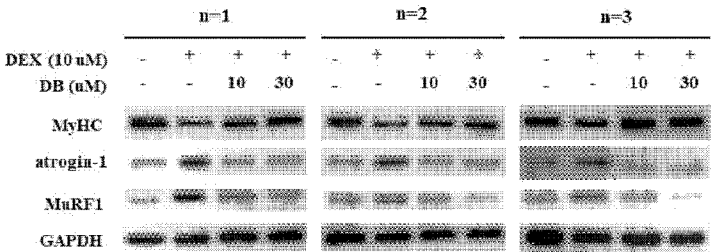


[도13]

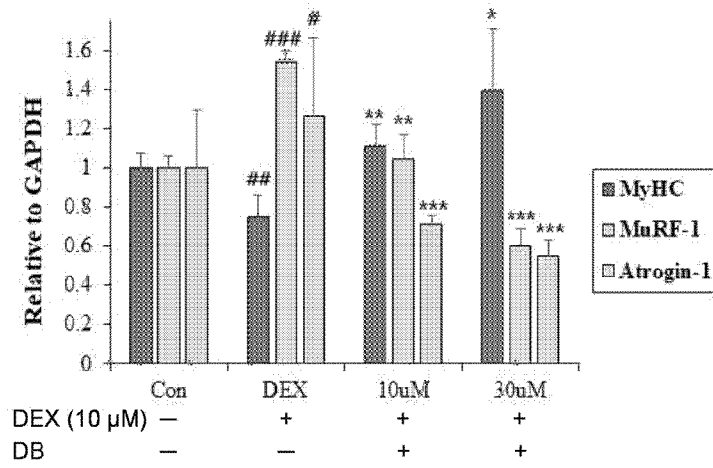


규칙 91,
02.08.2024

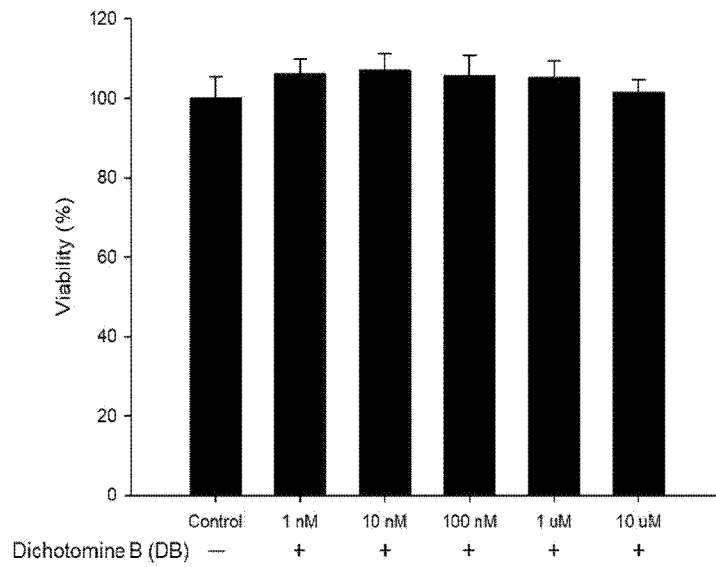
[도14]



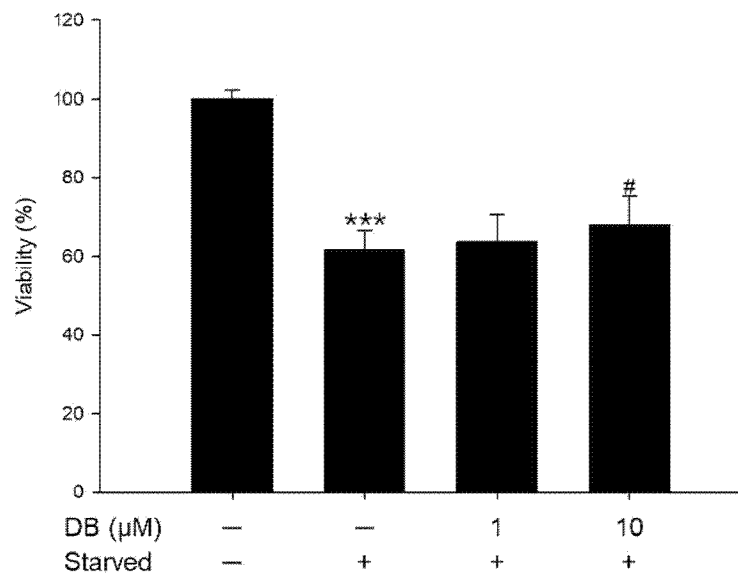
[도15]



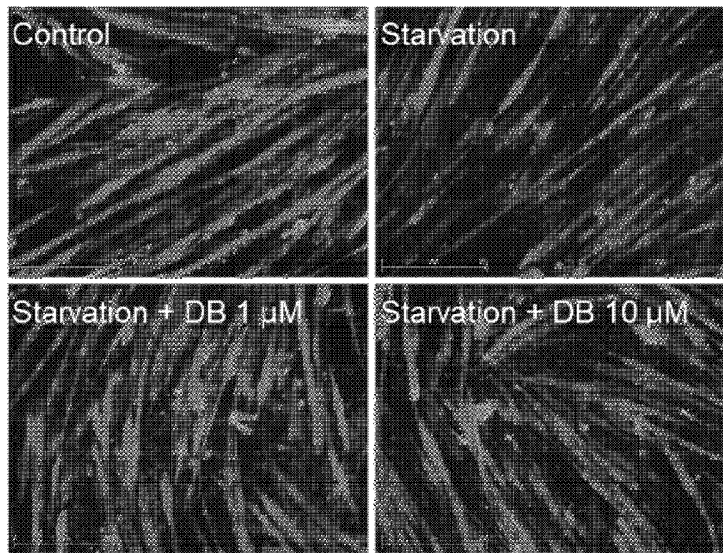
[도16]



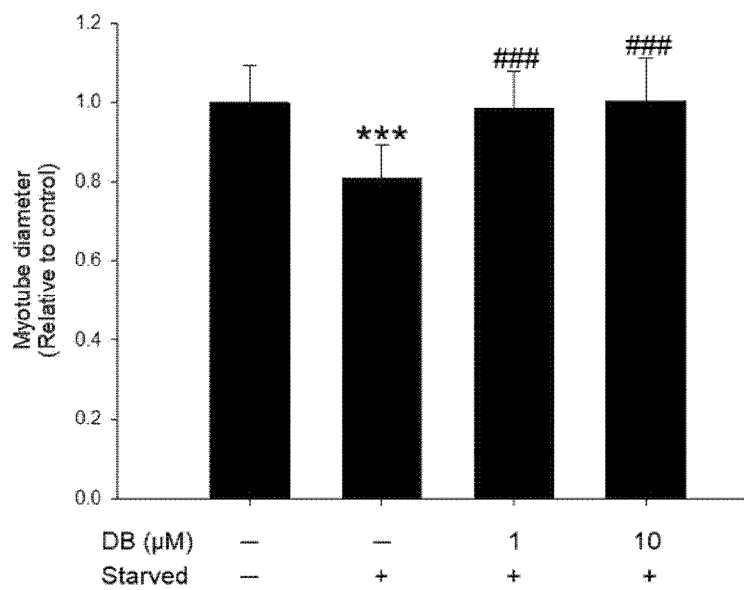
[도17]



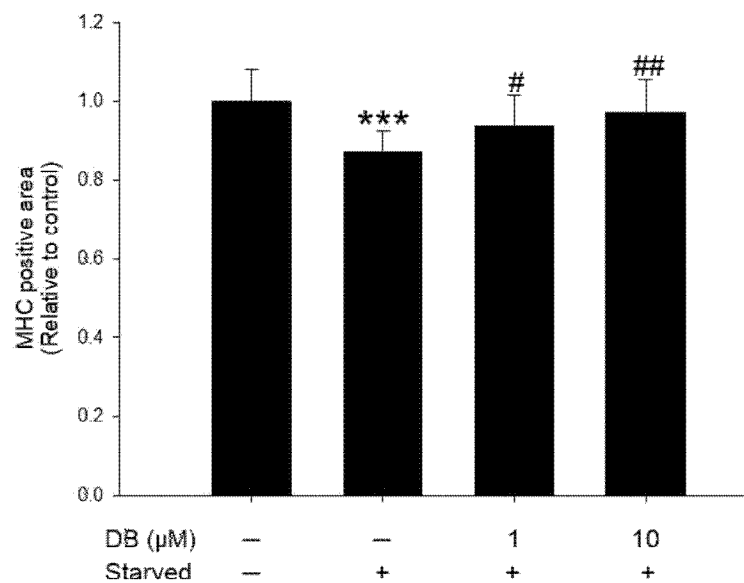
[도18]



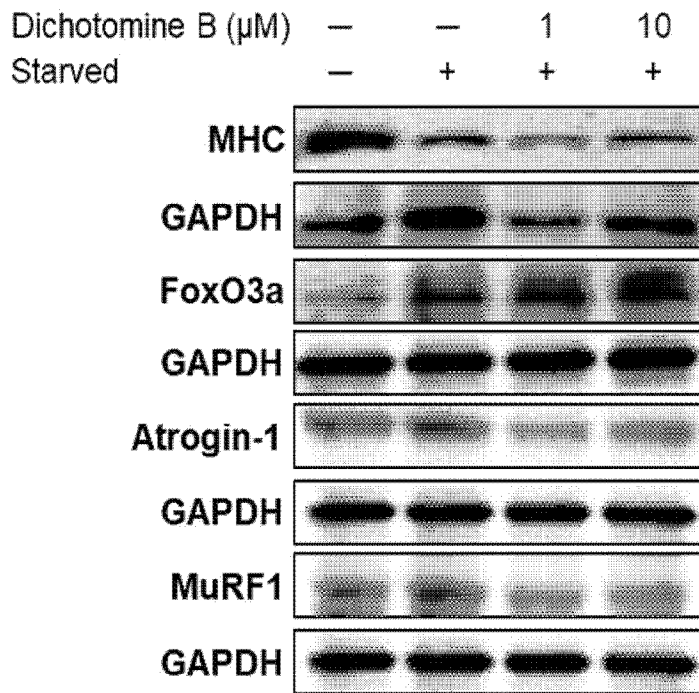
[도19]



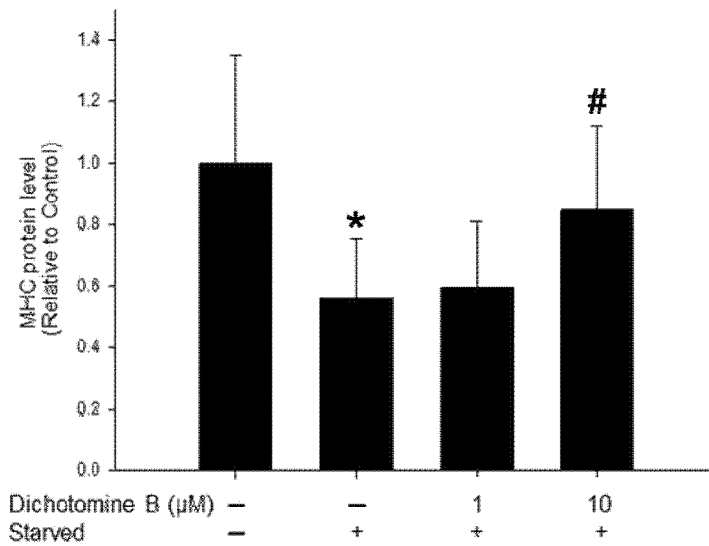
[도20]



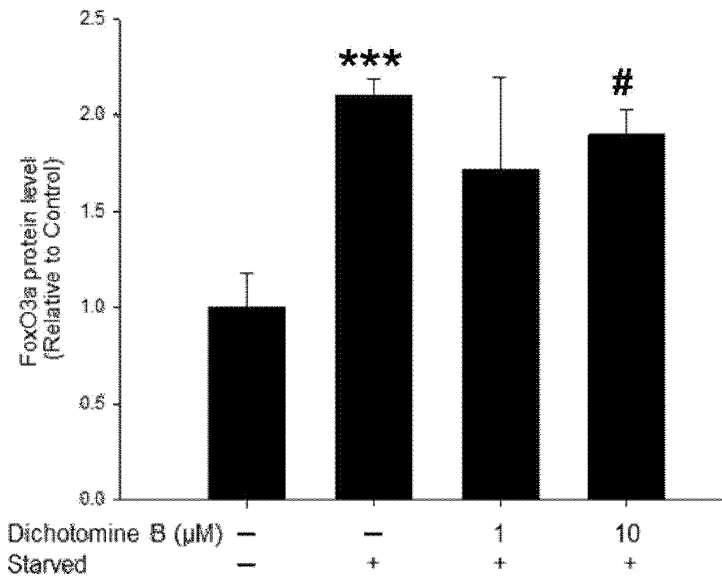
[도21]



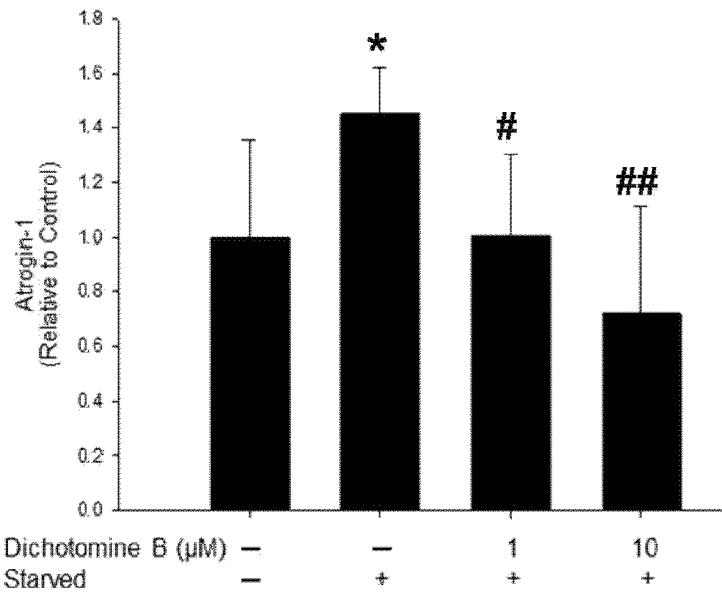
[도22]



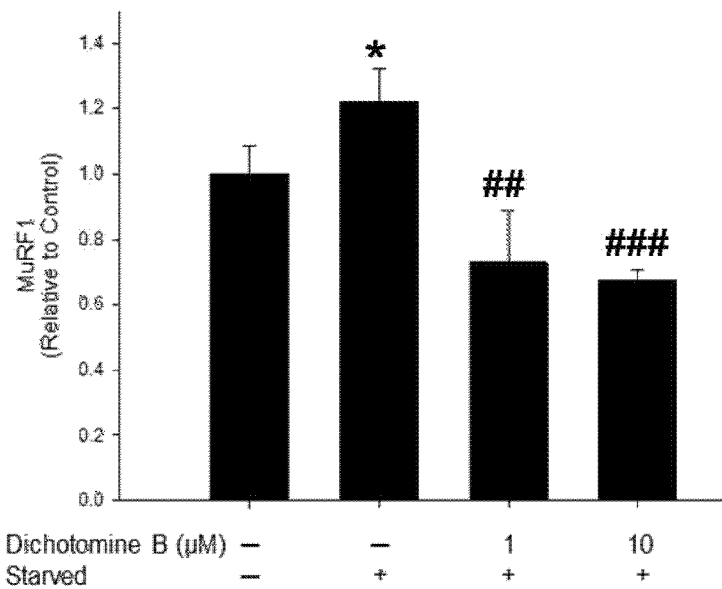
[도23]



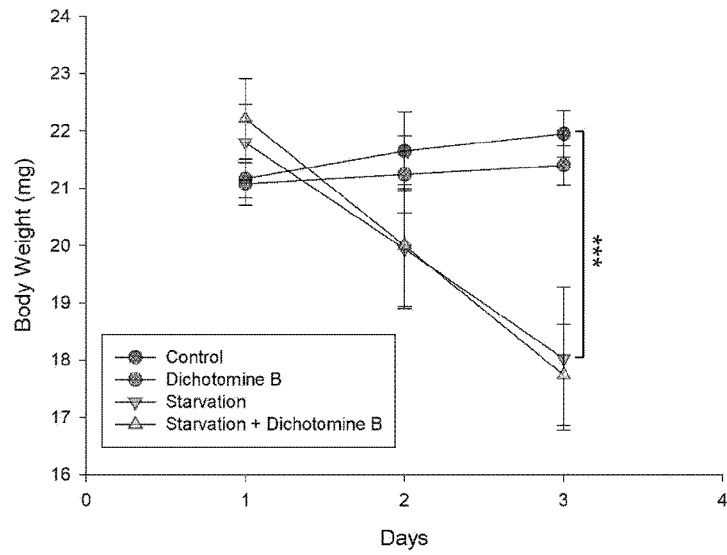
[도24]



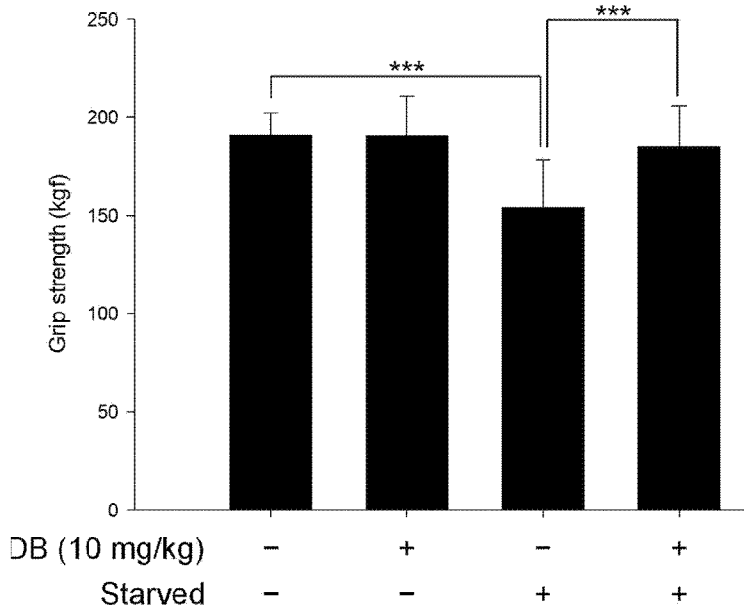
[도25]



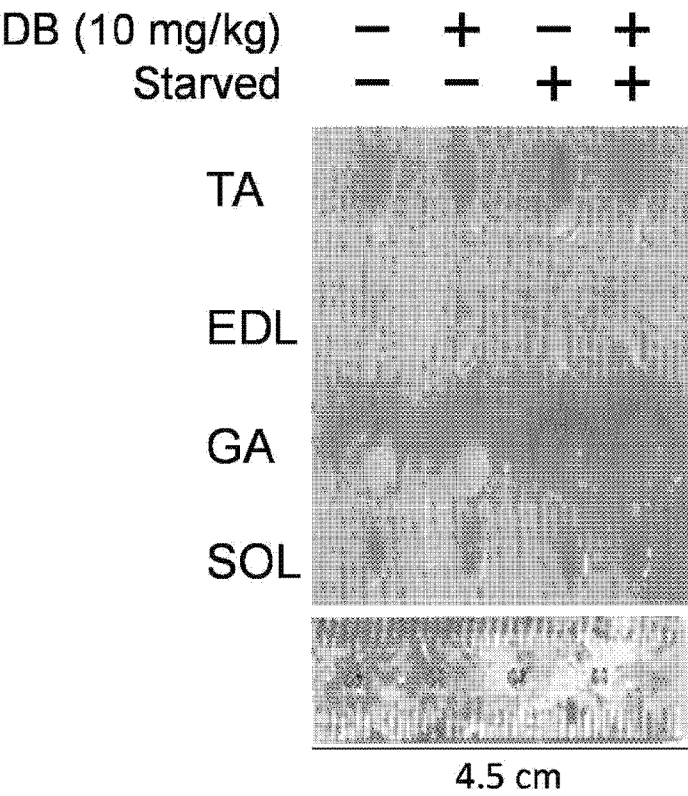
[도26]



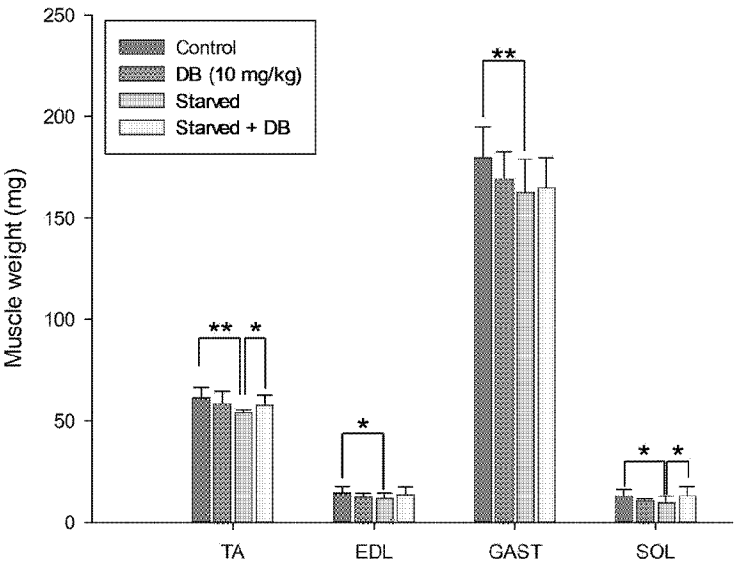
[도27]



[도28]



[도29]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/007964

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/437(2006.01)i; A61P 21/00(2006.01)i; A23L 33/10(2016.01)i; A23K 20/137(2016.01)i; A61K 36/36(2006.01)i;
A61K 31/41(2006.01)i; A61K 31/706(2006.01)i; A61K 31/366(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 31/437(2006.01); A23L 33/10(2016.01); A61K 31/216(2006.01); A61K 31/235(2006.01); A61K 36/36(2006.01);
A61K 38/43(2006.01); A61K 8/66(2006.01); A61P 19/00(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) & keywords: 은시호(stellaria dichotoma L. var. lanceolata Bunge), 골격근(skeletal muscle), 근위축(muscle atrophy), 근감소증(sarcopenia), 디코토민(dichotomine B), 샤프토사이드(schaftoside)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2022-052017 A1 (LIU, Hsuan-Miao) 17 March 2022 (2022-03-17) See paragraphs [0099]-[0100]; and claim 1.	4,9,11 1-3,5-8,10,12,13
A	KR 10-2015-0115505 A (NATURAL ENDOTECH CO., LTD.) 14 October 2015 (2015-10-14) See paragraphs [0014]-[0015]; and claims 1 and 6.	1-13
A	KR 10-2008-0079528 A (KONKUK UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION CORP.) 01 September 2008 (2008-09-01) See paragraph [0022]; and claim 1.	1-13
A	KR 10-2020-0133629 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 30 November 2020 (2020-11-30) See paragraph [0024]; and claim 1.	1-13



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

07 October 2024

Date of mailing of the international search report

07 October 2024

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/KR2024/007964

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BAE, Su-Jin et al. Protective effects of a traditional herbal extract from <i>Stellaria dichotoma</i> var. <i>lanceolata</i> against <i>Mycobacterium abscessus</i> infections. Plos One. 2018, vol. 13, no. 11, thesis no. e0207696, inner pp. 1-19 (publication: 19 November 2018). See abstract.	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2024/007964

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2022-052017	A1	17 March 2022	CN	115461050	A	09 December 2022
				CN	115461050	B	28 November 2023
				US	2023-190846	A1	22 June 2023
KR	10-2015-0115505	A	14 October 2015	None			
KR	10-2008-0079528	A	01 September 2008	KR	10-0871811	B1	03 December 2008
KR	10-2020-0133629	A	30 November 2020	KR	10-2206536	B1	22 January 2021

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/437(2006.01)i; A61P 21/00(2006.01)i; A23L 33/10(2016.01)i; A23K 20/137(2016.01)i; A61K 36/36(2006.01)i; A61K 31/41(2006.01)i; A61K 31/706(2006.01)i; A61K 31/366(2006.01)i		
B. 조사된 분야		
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 31/437(2006.01); A23L 33/10(2016.01); A61K 31/216(2006.01); A61K 31/235(2006.01); A61K 36/36(2006.01); A61K 38/43(2006.01); A61K 8/66(2006.01); A61P 19/00(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) & 키워드: 은시호(stellaria dichotoma L. var. lanceolata Bunge), 골격근(skeletal muscle), 근위축(muscle atrophy), 근감소증(sarcopenia), 디코토민(dichotomine B), 샤프토사이드(schaftoside)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	WO 2022-052017 A1 (LIU, HSUAN-MIAO) 2022.03.17 단락 [0099]-[0100]; 청구항 1	4,9,11 1-3,5-8,10,12,13
A	KR 10-2015-0115505 A ((주)내츄럴엔도텍) 2015.10.14 단락 [0014]-[0015]; 청구항 1, 6	1-13
A	KR 10-2008-0079528 A (건국대학교 산학협력단) 2008.09.01 단락 [0022]; 청구항 1	1-13
A	KR 10-2020-0133629 A (한국과학기술연구원) 2020.11.30 단락 [0024]; 청구항 1	1-13
A	BAE, SU-JIN. 등, Protective effects of a traditional herbal extract from Stellaria dichotoma var. lanceolata against Mycobacterium abscessus infections, Plos one, 2018년, 13권, 11호, 논문번호 e0207696, 내부페이지 1-19 (공개: 2018.11.19) 요약	1-13
☐ 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 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2024년10월07일(07.10.2024)		국제조사보고서 발송일 2024년10월07일(07.10.2024)
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

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2022-052017 A1	2022/03/17	CN 115461050 A	2022/12/09
		CN 115461050 B	2023/11/28
		US 2023-190846 A1	2023/06/22
----- KR 10-2015-0115505 A	2015/10/14	없음	
----- KR 10-2008-0079528 A	2008/09/01	KR 10-0871811 B1	2008/12/03
----- KR 10-2020-0133629 A	2020/11/30	KR 10-2206536 B1	2021/01/22
