

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2023년 9월 21일 (21.09.2023)



(10) 국제공개번호

WO 2023/177128 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 31/385 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61K 31/713 (2006.01) A23L 33/13 (2016.01)
A61P 21/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2023/002932
- (22) 국제출원일: 2023년 3월 3일 (03.03.2023)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2022-0032653 2022년 3월 16일 (16.03.2022) KR
- (71) 출원인: 주식회사 플루토 (PLUTO INC.) [KR/KR];
13453 경기도 성남시 수정구 금토로 40번길 22, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 다런 윌리엄스 (DARREN, Williams); 61005 광주광역시 북구 첨단과기로 123, Devon (KR). 정다운 (JUNG, Da Woon); 61005 광주광역시 북구 첨단과기로 123, Gwangju (KR). 김현준 (KIM, Hyun Jun); 61005 광주광역시 북구 첨단과기로 123, Gwangju (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 지담 (JIDAM IP LAW FIRM); 13494 경기도 성남시 분당구 대왕판교로 670, 유스페이스2 A-201, Gyeonggi-do (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, 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.

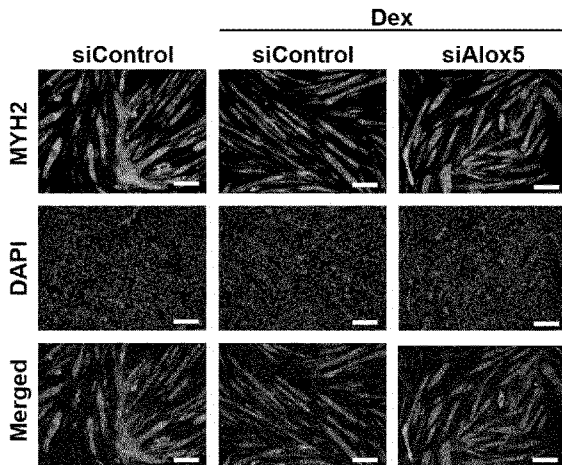
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, 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).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING ALOX5 INHIBITOR FOR PREVENTING OR TREATING SARCOPENIA

(54) 발명의 명칭: ALOX5 억제제를 포함하는 근감소증 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition comprising an Alox5 inhibitor for preventing or treating sarcopenia, and comprises a material that targets Alox5 so as to inhibit the expression or activation thereof, and thus improves muscular performance, increases muscle mass and cross-sectional areas of muscle fibers, and reduces the expression of myoatrophy regulators, thereby effectively preventing, alleviating and treating sarcopenia.

(57) 요약서: 본 발명은 Alox5 억제제를 포함하는 근감소증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, Alox5를 타겟하여 이의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함함으로써, 근육 성능을 향상시키고, 근육 질량 및 근섬유 단면적을 증가시키며, 근위축조절인자의 발현을 감소시켜 근감소증을 효과적으로 예방, 개선 및 치료할 수 있다.



WO 2023/177128 A1

명세서

발명의 명칭: ALOX5 억제제를 포함하는 근감소증 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 Alox5 억제제를 포함하는 근감소증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 근감소증의 개념은 1989년 Irwin Rosenberg가 'sarcopenia'라는 용어를 도입하면서 시작된 것으로, 그리스어에서 기원을 보면 근육을 의미하는 “sarco”와 감소되어 있다는 뜻의 “penia”가 합성된 단어이다. 근감소증은 노화와 연관되어 근육량의 감소에 따른 근력의 저하를 의미한다. 여기에서 “근육(muscle)”이란 골격근(skeletal muscle)을 의미하고 평활근(smooth muscle)과는 관계가 없다. 즉, 근감소증은 주로 사지에 분포한 골격근의 감소(loss of skeletal muscle mass)를 의미하며, 악성종양의 말기 등에서 나타나는 현저한 근육 소실 상태인 악액질(cachexia), 독감 등 급성질환으로 인한 근육소모(muscle wasting), 혹은 근육자체의 질병(primary muscle disease)과는 구별된다.

[4] 최근 65세 이상의 고령의 연령층이 가파르게 증가하면서 골다공증과 근감소증의 유병률도 빠르게 증가되고 있다. 근육량의 점진적인 감소는 40대 이후부터 발생하여 70대까지 매 10년마다 8% 썩의 감소가 일어난다고 추정되며, 그 이후로는 더욱 급격한 감소가 발생하여 10년마다 15%까지 발생할 수 있다는 것이 알려져 있다. 많은 추적 연구를 통해서 노인에서 발생하는 생리적 변화는 다양하며, 일반적으로 연령이 증가함에 따라 근육량과 골밀도가 동시에 감소한다는 것이 밝혀졌다.

[5] 한편, 근감소증을 효율적으로 제어하는 방법에 대해 다양한 연구가 수행되고 있다. 예를 들어 근육 질량을 증가시키는 성장 호르몬(GH)이 개발되었으나, 매우 고가이며, 평균 연령의 단축 등과 같은 바람직하지 않는 몇몇 부작용을 발생시키는 문제가 있었다. 미토콘드리아 안정화 약물 역시 근감소증에 대해서는 효과를 나타내지 못하였다. 또한 환자 또는 병상에 누워있는 환자 등에 있어서는 매우 부적절한 방법으로서, 근육의 재생 및 분화를 유도할 수 있는 근육 감소증 치료 약물 및 기술개발이 주요한 과제의 대상이 되고 있고, 이에 대한 연구가 이루어지고 있으나 아직 미비한 실정이다.

[6] 이에, 노령화가 계속되는 사회에서 근감소증에 효과를 나타내는 약학 조성물, 건강기능식품의 수요가 지속적으로 증가할 것으로 판단되며, 근감소증에 효과를 나타낼 수 있는 새로운 약물에 대한 연구가 필요하다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 근감소증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [9] 또한, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 근감소증 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[11]

과제 해결 수단

- [12] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 일 실시예는 Alox5(Arachidonate 5-Lipoxygenase) 억제제를 포함하는 근감소증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [13] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 Alox5 억제제는 핵산, 향체, 앵타머, 펩타이드, 단백질, 화합물 또는 천연물일 수 있다.
- [14] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 Alox5 억제제는 말로틸레이트(Malotilate), 웨델로락톤(Wedelolactone), 질류톤(Zileuton), 노르디하이드로구아이어트산(Nordihydroguaiaretic acid), 프소랄리딘(Psoralidin), 도세베논(Docebenone), 리코펠론(Licofelone), 로나팔레인(Lonapalene), 에나자드렘(Enazadrem), 시르실리올(Cirsiliol), 피크리닌(Picrinine), 아트레류톤(Atreleuton) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종일 수 있다.
- [15] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 근감소증 예방 또는 치료는 류코트리엔 B4(LTB4)의 생산 감소에 의한 것일 수 있다.
- [16] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 근감소증 예방 또는 치료는 Atrogin-1 또는 MuRF-1의 발현 감소; 또는 Efna5(Ephrin A5), Fut4(Fucosyltransferase 4), Igf1(Insulin-like growth factor 1), Sod3(Superoxide dismutase 3) 및 Plk 1(Polo like kinase1) 중에서 선택되는 1종 이상 유전자의 발현 증가에 의한 것일 수 있다.
- [17] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 근감소증은 노화에 의한 것일 수 있다.
- [18] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 다른 실시예는 Alox5(Arachidonate 5-Lipoxygenase) 억제제를 포함하는 근감소증 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [19] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 Alox5 억제제는 핵산, 향체, 앵타머, 펩타이드, 단백질, 화합물 또는 천연물일 수 있다.
- [20] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 Alox5 억제제는 말로틸레이트(Malotilate), 웨델로락톤(Wedelolactone), 질류톤(Zileuton), 노르디하이드로구아이어트산

(Nordihydroguaiaretic acid), 프소랄리딘(Psoralidin), 도세베논(Docebenone), 리코펠론(Licofelone), 로나팔레인(Lonapalene), 에나자드렘(Enazadrem), 시르실리올(Cirsiliol), 피크리닌(Picrinine), 아트레류톤(Atreleuton) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종일 수 있다.

[21] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 근감소증 예방 또는 개선은 류코트리엔 B4(LTB4)의 생산 감소에 의한 것일 수 있다.

[22] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 근감소증 예방 또는 개선은 Atrogin-1 또는 MuRF-1의 발현 감소; 또는 Efna5(Ephrin A5), Fut4(Fucosyltransferase 4), Igf1(Insulin-like growth factor 1), Sod3(Superoxide dismutase 3) 및 Plk 1(Polo like kinase1) 중에서 선택되는 1종 이상 유전자의 발현 증가에 의한 것일 수 있다.

[23] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 근감소증은 노화에 의한 것일 수 있다.

[24]

발명의 효과

[25] 본 발명은 Alox5 억제제를 포함하는 근감소증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, Alox5를 타겟하여 이의 발현 또는 활성을 억제하는 물질을 포함함으로써, 근육 성능을 향상시키고, 근육 질량 및 근섬유 단면적을 증가시키며, 근위축 조절인자의 발현을 감소시켜 근감소증을 효과적으로 예방, 개선 및 치료할 수 있다.

[26] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[27]

도면의 간단한 설명

[28] 도 1a 내지 도 1g는 Dex 처리 마우스 근관에서 말로틸레이트 처리에 따른 위축 억제 효과를 확인한 것이다. 도 1a는 미오신 중쇄 면역화학염색법으로 염색된 C2C12 근섬유를 나타냄. 도 1b는 평균 근섬유의 직경을 나타냄. 도 1c는 근섬유의 직경을 전체 근섬유 수 대비 분포로 나타냄. 도 1d는 qPCR 분석을 통해 Atrogin-1과 Murf-1의 발현량을 mRNA 수준에서 분석함. 도 1e는 SUnSET 어세이를 통해 단백질의 합성속도를 비교 분석함. 도 1f는 웨스턴 블롯을 통해 FoxO3a의 인산화 정도와 FoxO3a와 Atrogin-1의 발현을 확인하였으며, α -Tubulin의 발현량을 통해 해당 유전자들의 발현수준이 정량됨. 도 1g는 웨스턴 블롯을 통해 LC3b I, LC3b II와 p62의 발현량을 확인하였으며, α -Tubulin의 발현량을 통해 해당 유전자들의 발현수준이 정량됨(*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$ 는 Untreated group을 대비로 나타낸 통계적 유의성이며, #= $p < 0.05$, ##= $p < 0.01$, ###= $p < 0.001$ Dex group을 대비로 나타낸 통계적 유의성임).

[29] 도 2a 내지 2c는 질류톤과 말로틸레이트 처리에 따른 글루코코르티코이드로 처리된 마우스의 근관에서 위축을 억제효과를 확인한 것이다. 도 2a는 미오

신 중쇄 면역화학염색법으로 염색된 C2C12 근섬유의 대표 이미지를 나타낸다 (Representative images about myosin heavy chain2 staining). 해당 세포는 다음과 같이 배양되었다: (1) 분화배지에 120 h 동안 배양됨 (Untreated): (2) 분화배지에 96h 동안 배양 후 DM과 10 μ M의 Dex를 24 h 동안 추가적으로 처리함(Dex): (3) 분화배지에 96 h 동안 배양 후 DM과 10 μ M Dex와 10 μ M의 Zileuton을 24 h 동안 추가적으로 처리함 (Mal) (크기 막대= 150 μ m). 도 2b는 평균 근섬유의 직경을 나타낸 것이다(average myotube diameter measurement). 도 2c는 qPCR 분석을 통해 Atrogin-1과 Murf-1의 발현량을 mRNA 수준에서 분석한 것이다(*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001는 Untreated group을 대비로 나타낸 통계적 유의성이며, #=p<0.05, ##=p<0.01, ###=p<0.001 Dex-treated control group을 대비로 나타낸 통계적 유의성임).

- [30] 도 3a 내지 3c는 웨델로락톤과 말로틸레이트 처리에 따른 글루코코르티코이드로 처리된 마우스의 근관에서 위축을 억제효과를 확인한 것이다. 도 3a는 미오신 중쇄 면역화학염색법으로 염색된 C2C12 근섬유의 대표 이미지를 나타낸다. 해당 세포는 다음과 같이 배양되었다: (1) 분화배지에 120 h 동안 배양됨 (Untreated): (2) 분화배지에 96h 동안 배양 후 DM과 10 μ M의 Dex를 24 h 동안 추가적으로 처리함(Dex): (3) 분화배지에 96 h 동안 배양 후 DM과 10 μ M Dex와 20 μ M의 Wedelolactone을 24 h 동안 추가적으로 처리함 (Mal) (크기 막대= 150 μ m). 도 3b는 평균 근섬유의 직경을 나타낸 것이다. 도 3c는 qPCR 분석을 통해 Atrogin-1과 Murf-1의 발현량을 mRNA 수준에서 분석한 것이다(*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001는 Untreated group을 대비로 나타낸 통계적 유의성이며, #=p<0.05, ##=p<0.01, ###=p<0.001 Dex-treated control group을 대비로 나타낸 통계적 유의성임).
- [31] 도 4a 내지 4d는 siAlox5에 의한 근관 위축 억제효과를 확인한 것이다. 도 4a는 미오신 중쇄 면역화학염색법으로 염색된 C2C12 근섬유를 나타냄. 도 4b는 평균 근섬유의 직경을 나타냄. 도 4c는 근섬유의 직경을 전체 근섬유 수 대비 분포로 나타냄. 도 4d는 qPCR 분석을 통해 Atrogin-1의 발현량을 mRNA 수준에서 분석함.
- [32] 도 4e 및 4f는 각각 qPCR 분석 및 웨스턴 블롯을 통해 siAlox5에 의한 Alox5의 발현량 감소를 확인한 것이다.
- [33] 도 4g 및 4h는 Dex 처리 근관에서 말로틸레이트 처리에 따른 Alox5 발현의 영향을 확인한 것이다. 도 4g는 웨스턴 블롯을 통해 Alox5의 발현을 확인하였으며, α -Tubulin의 발현량을 통해 해당 유전자의 발현수준이 정량됨. 도 4h는 ELISA 분석을 통해 C2C12 근섬유 내 축적된 LTB4의 농도를 확인함.
- [34] 도 4i 내지 4k는 Dex 처리 근관에서 외인성 LTB4 처리에 따른 영향을 확인한 것이다. 도 4i는 미오신 중쇄 면역화학염색법으로 염색된 C2C12 근섬유를 나타냄. 도 4j는 평균 근섬유의 직경을 나타냄 도 4k는 qPCR 분석을 통해 Atrogin-1의 발현량을 mRNA 수준에서 분석함.

- [35] 도 5a 내지 5d는 말로틸레이트의 처리가 근 형성(myogenesis)에 미치는 영향을 확인한 것이다. 도 5a 및 5b는 웨스턴 블롯을 통해 Myh2의 발현을 확인함. 도 5c는 웨스턴 블롯을 통해 Myh2와 인산화된 Akt의 정도를 확인함. 도 5d는 qPCR 분석을 통해 Pax7, Myf5, Myog, Myh2의 발현량을 mRNA 수준에서 분석함 (*= $p<0.05$, **= $p<0.01$, ***= $p<0.001$ 는 Untreated group을 대비로 나타낸 통계적 유의성이며, #= $p<0.05$, ##= $p<0.01$, ###= $p<0.001$ Dex group을 대비로 나타낸 통계적 유의성임).
- [36] 도 6a 내지 6l은 Dex 처리 근감소증 마우스 모델에서 말로틸레이트 처리에 따른 골격근 위축 억제효과를 확인한 것이다. 도 6a는 마우스의 몸무게를 측정한 결과임. 도 6b는 약물 처리 종료일에 해당하는 마우스의 몸무게를 측정한 결과임. 도 6c는 약물 처리 종료일에 해당하는 마우스의 그립 강도를 측정한 결과임. 도 6d는 약물 처리 종료일에 해당하는 마우스의 최대 운동 지속시간을 측정한 결과임. 도 6e는 약물 처리 종료일에 해당하는 마우스의 최대 운동 지속 가능한 속도를 측정한 결과임. 도 6f는 마우스의 대퇴사두근 무게를 측정한 값임. 도 6g는 마우스의 가자미근의 무게를 측정한 값임. 도 6h는 마우스의 대퇴사두근을 헤마톡실린&에오신 염색 후 나타낸 대표사진임. 도 6i는 근섬유의 평균 대구경을 측정한 결과임. 도 6j는 근섬유의 대구경의 크기를 전체 근섬유 수 대비 분포를 나타낸 결과임. 도 6k는 마우스의 대퇴사두근 내 축적 되어있는 LTB4의 농도를 ELISA 분석을 통해 확인한 결과임. 도 6l은 마우스의 대퇴사두근 내 Atrogin-1의 발현량과 Murf-1의 발현량을 mRNA 수준에서 확인한 것임. (*= $p<0.05$, **= $p<0.01$, ***= $p<0.001$ 는 Untreated group을 대비로 나타낸 통계적 유의성이며, #= $p<0.05$, ##= $p<0.01$, ###= $p<0.001$ Dex group을 대비로 나타낸 통계적 유의성임).
- [37] 도 7a 내지 7l은 노화에 의한 근감소증 마우스 모델에서 말로틸레이트 처리에 따른 골격근 위축 억제 효과를 확인한 것이다. 도 7a는 4주간의 실험 기간 동안 마우스의 몸무게를 측정한 결과임. 도 7b는 약물 처리 종료일에 해당하는 마우스의 몸무게를 측정한 결과임. 도 7c는 약물 처리 종료일에 해당하는 마우스의 그립 강도를 측정한 결과임. 도 7d는 약물 처리 종료일에 해당하는 마우스의 최대 운동 지속시간을 측정한 결과임. 도 7e는 마우스의 대퇴사두근 무게를 측정한 값임. 도 7f는 마우스의 가자미근의 무게를 측정한 값임. 도 7g는 마우스의 대퇴사두근을 헤마톡실린&에오신 염색 후 나타낸 대표사진임. 도 7h는 근섬유의 평균 대구경을 측정한 결과임. 도 7i는 근섬유의 대구경의 크기를 전체 근섬유 수 대비 분포를 나타낸 결과임. 도 7j는 미오신 중쇄 타입 2A, 2B, Laminin 항체를 통해 면역조직화학 염색 후 나타낸 대표사진임. 도 7k는 미오신 중쇄 2A와 2B로 염색된 근섬유의 평균 대구경을 측정한 결과임. 도 7l은 미오신 중쇄 2A와 2B로 염색된 근섬유의 대구경을 전체 근섬유 수 대비 분포를 나타낸 결과임(*= $p<0.05$, **= $p<0.01$, ***= $p<0.001$ 는 Untreated group을 대비로 나타낸 통계적 유의성이며, #= $p<0.05$, ##= $p<0.01$, ###= $p<0.001$ Dex group을 대비로 나타낸 통계적 유의성임).

- [38] 도 8a 내지 8g는 Dex 처리로 인한 위축을 겪는 근관을 말로틸레이트로 처리하고 세포 전사체를 분석한 것이다. 도 8a는 C2C12 근섬유의 세포 내 전사체 분석을 통해 상향 또는 하향조정된 유전자를 나타냄. 도 8b는 Dex 와 Dex_Mal 그룹 사이의 유전자 발현 변화를 화산 플롯으로 나타냄. 도 8c는 Dex 와 Dex_Mal 그룹 사이의 유전자 발현 변화를 단일 계층구조의 히트맵을 통해 나타냄. 도 8d는 Dex 와 Dex_Mal 그룹 사이의 유전자 발현 변화를 유전자와 기능적 역할 사이의 상관 관계를 통해 나타냄. 도 8e는 Dex 와 Dex_Mal 그룹 사이의 유전자 발현 변화를 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway 분석을 통해 나타냄. 도 8f는 Dex/Un 와 Dex_Mal/Dex 사이의 유전자들의 발현량 변화를 정량적으로 보여주는 히트맵임. 도 8g는 Dex/Un과 Dex_Mal/Dex 사이의 히트맵에서 근감소증 관련 유전자들을 정리한 것임.
- [39] 도 9a 내지 9c는 인간 골격근 배양에서 말로틸레이트 처리에 따른 위축 예방 효과를 확인한 것이다. 도 9a는 헤마톡실린&에오신으로 염색된 인간 유래 근육모세포의 근섬유를 나타냄. 도 9b는 평균 근섬유의 직경과 근섬유의 분포를 나타낸 것임. 도 9c는 qPCR 분석을 통해 Atrogin-1과 Murf-1의 발현량을 mRNA 수준에서 분석함(*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001는 Untreated group을 대비로 나타낸 통계적 유의성이며, #=p<0.05, ##=p<0.01, ###=p<0.001 Dex group을 대비로 나타낸 통계적 유의성임).
- [40] 도 10은 Alox5의 활성도와 근감소증 사이의 연관성과 Malotilate 통한 근감소증 완화 기전을 나타낸 것이다.

[41]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[42] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[43]

[44] 본 발명은 Alox5(Arachidonate 5-Lipoxygenase) 억제제를 포함하는 근감소증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[45] 상기 Alox5 억제제는 Alox5 유전자 또는 단백질의 발현을 억제하거나 활성을 억제하는 물질일 수 있다.

[46] 상기 억제제는 핵산, 항체, 앵타머, 펩타이드, 단백질, 화합물 또는 천연물일 수 있으며, Alox5 유전자 또는 단백질의 발현, 또는 활성을 억제하는 것이라면 특별히 제한되지 않는다.

[47] 예를 들어, Alox5 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA), micro RNA 또는 recombinant RNA 등의 핵산일 수 있고, Alox5에 특이적으로 결합하는 항체, 앵타머, 펩타이드, 단백질, 화합물 또는 천연물일 수 있다.

[48] 상기 Alox5 억제제는 말로틸레이트(Malotilate), 웨델로락톤(Wedelolactone), 질류톤(Zileuton), 노르디하이드로구아리아레트산(Nordihydroguaiaretic acid), 프

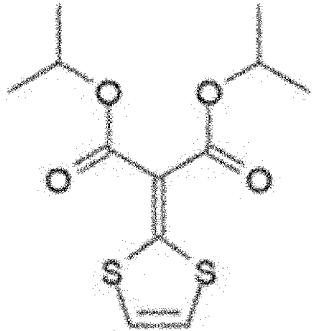
소랄리딘(Psoralidin), 도세베논(Docebenone), 리코펠론(Licofelone), 로나팔레인(Lonapalene), 에나자드렘(Enazadrem), 시르실리올(Cirsiliol), 피크리닌(Picrinine), 아트레류톤(Atreleuton) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종일 수 있다.

[49] 바람직하게는 상기 Alox5 억제제는 말로틸레이트(malotilate)일 수 있다.

[50] 상기 말로틸레이트는 하기 구조식 (1)로 표시될 수 있다.

[51] 구조식 (1)

[52]



[53] 상기 근감소증 예방 또는 치료는 류코트리엔 B4(LTB4)의 생산 감소에 의한 것일 수 있다.

[54] LTB4는 Alox5의 활성 산물로서, 위축 상태의 골격근에서는 LTB4가 증가하게 된다. 본 발명의 실시예에 있어서, 덱사메타존(Dex) 처리에 의해 위축된 근관에 본 발명의 조성물을 처리하는 경우, LTB4의 생산이 감소되어 Dex에 의한 근관 위축이 억제되는 효과가 있음을 확인하였다(도 4h). 보다 구체적으로 LTB4는 이화 신호 경로에 의해 골격근 위축의 유비퀴틴-프로테아좀 경로의 주요 조절자인 FoxO3의 탈인산화에 관여하는데, LTB4의 생산이 감소되면 FoxO3의 탈인산화가 억제됨으로써, 근감소증을 예방 또는 치료할 수 있다.

[55] 또한, LTB4의 생산 감소에 의해 조절되지 않은 자가포식을 감소시켜 골격근 위축을 억제할 수 있다. 본 발명의 실시예에 있어서, Dex 처리 근관에 Alox5 억제제(예를 들어, 말로틸레이트)를 처리하는 경우, LC3bI에 대한 LC3bII의 비율이 감소하고 p62의 발현이 증가하는 것을 통해 조절되지 않은 자가포식이 감소됨을 확인하였다(도 1g).

[56] 본 발명은 근위축조절인자(atrogenes)의 발현 감소 또는 항위축인자의 발현 증가에 의해 근감소증을 예방 또는 치료할 수 있다.

[57] 상기 근위축조절인자는 이에 제한되지 않으나, 예를 들어, Atrogin-1 또는 MuRF-1일 수 있다.

[58] 상기 항위축인자는 이에 제한되지 않으나, 예를 들어, Efna5(Ephrin A5), Fut4(Fucosyltransferase 4), Igf1(Insulin-like growth factor 1), Sod3(Superoxide dismutase 3) 또는 Plk 1(Polo like kinase1)일 수 있다.

- [59] 상기 근감소증은 예를 들어, 노화, 패혈증, 기아, 만성폐쇄성폐질환, 당뇨병, 암 등 모든 원인에 의한 근감소증을 포함할 수 있으나, 바람직하게는 상기 근감소증은 노화에 의한 것일 수 있다.
- [60] 본 발명의 실시예에 있어서, Dex 처리 또는 노화에 의한 근감소증 동물 모델에서 Alox5 억제제(예를 들어, 말로틸레이트)의 처리에 의한 근육양의 증가, 근섬유 단면적의 증가를 통해 골격근 위축이 억제됨을 확인하였으므로(도 6f 내지 6j 및 도 7e 내지 7i), 본 발명의 조성물은 근감소증 예방 또는 치료에 탁월한 효능이 있다.
- [61] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 더 포함하며, 이는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다. 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 한편, 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 이에 한정되는 것이 아니며 1일 당 0.01-2000 mg/kg(체중)일 수 있다.
- [62] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 정맥내 주입, 피하주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 적용되는 질환의 종류에 따라, 투여경로가 결정되는 것이 바람직하다.
- [63] 본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [64]
- [65] 본 발명은 Alox5(Arachidonate 5-Lipoxygenase) 억제제를 포함하는 근감소증 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.
- [66] 본 발명의 근감소증 예방 또는 개선용 건강기능식품에 포함되는 Alox5 억제제, 이의 작용 기전 및 근감소증의 원인에 관하여는 전술한 바와 같다.

- [67] 본 발명의 건강기능식품은 근감소증 예방 또는 개선을 목적으로, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [68] 본 발명의 건강기능식품이라 함은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [69] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [70] 상기 식품 첨가물 공전에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산 칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [71] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 상기 추출물을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.
- [72] 캡슐 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 상기 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 상기 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [73] 환 형태의 건강기능식품은 상기 추출물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.
- [74] 과립 형태의 건강기능식품은 상기 추출물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.
- [75] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.
- [76] 상기 건강기능식품은 영양제의 용도로 경구 적용될 수 있으며, 적용 형태는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들면 경구 투여되는 경우, 하루 섭취량은 5000mg 이하인 것이 바람직하고, 하루 섭취량이 2000mg 이하인 것이 보다 바람직하며, 하

루 섭취량이 500 내지 1500mg, 또는 650mg인 것이 가장 바람직하다. 캡슐제 또는 정제로 제제화하는 경우, 1일 1회 1정을 물과 함께 투여할 수 있다.

[77]

[78] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[79]

[80] 실시예. Alox5 억제제를 사용한 골격근 위축 예방 또는 치료 효과 확인

[81] 재료 및 방법

[82] 1. 시약 및 항체

[83] 텍사메타존(Dex)는 Santa Cruz Biotechnology(TX, USA)로부터 구입하였다. 말로틸레이트는 Selleckchem(TX, USA)로부터 구입하였다. 류코트리엔 B4(LTB4)는 Tocris(Bristol, UK)로부터 구입하였다.

[84]

[85] 2. 세포배양

[86] C2C12 마우스의 근육모세포는 Koram Biothec(Republic of Korea)에서 획득하였다. 상기 세포는 10% FBS, 1% 페니실린 및 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM 증식 배지에서 유지하였다. 근육모세포는 대략 90%로 증식하였을 때 2% HS, 1% 페니실린 및 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM 분화배지를 처리하여 근섬유로 96시간 동안 분화시켰다. 분화된 근섬유는 10 μ M Dex를 24시간 동안 처리하여 근감소증을 유도하였다. 근육세포의 분화정도를 평가하기 위하여 분화 중인 근육모세포에 해당 화합물을 분화배지에 24시간 또는 48시간 동안 처리하였다.

[87]

[88] 3. 면역화학염색법

[89] 근섬유는 미오신 중쇄항체를 이용한 면역화학염색법을 통해 염색하였다. 구체적으로, 근섬유는 PBS로 세번 헹군 뒤, 3.7%의 포름알데히드 용액으로 고정시켰다. 이후 PBS로 헹군 뒤, 0.2% TritonX-100 용액으로 투명화 과정을 거친 후 PBS로 추가적인 헹굼작업을 진행하였다. 1% 소 혈청 알부민 용액(1% BSA in PBS-T)으로 막고, 1차 항체로 4°C에서 밤새 배양하였다. PBS로 세척 후, 2차 항체를 1시간 동안 처리하였다. 그 후, 근관을 PBS 내 1 μ M의 DAPI를 통해 카운터스테인 하였다. DMI 3000 B 현미경(Leica, Germany)을 사용하여 5개의 다른 영역에서 염색된 근관의 형광 이미지를 얻었고 ImageJ 1.52 소프트웨어(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 분석하였다. 근관은 4개 이상의 핵을 포함하는 미오신 중쇄 양성 세포로 분류되었고, 핵을 4개 이상 포함하고 있는 근섬유의 직경을 측정하였다.

[90]

[91] 4. 웨스턴 블롯

[92] 세포 내 단백질의 농도는 Bradford 분석(Bio-Rad, USA, CA)을 사용하여 측정하였으며, 10%, 12% 폴리 아크릴 아미드 겔에 로딩하여 전기 영동하였다. 이후 분

리된 단백질은 PVDF 멤브레인으로 옮겨졌으며, 사용된 1차 항체는 5% 탈지유가 함유된 TBS-T에서 1:1000 희석하여 4°C에서 밤새 배양하였다. 2차 항체는 1:2000으로 희석하여 실온(RT)에서 35분 동안 배양하였다. 밴드 Intensity는 ImageJ 1.52 소프트웨어(National Institutes of Health, USA)로 측정하였고, 세포 내 단백질에 대해서는 α - tubulin으로 표준화하였다. 사용된 1차 항체와 2차 항체는 표 1 및 2에 각각 정리되어 있다.

[93] [표1]

Primary antibody	Clone	Company	Catalog No.	Dilution
α -Tubulin	Polyclonal	Invitrogen	PA5-29444	1:5000
Puromycin (12D10)	Monoclonal	Millipore	MABE-343	1:25000
Atrogin-1/MAFbx (F-9)	Monoclonal	SANTA CRUZ	Sc-166806	1:100
FoxO3a (D19A7)	Monoclonal	CST	#12829	1:1000
Phospho-FoxO3a (Ser253)	Polyclonal	CST	#9466	1:1000
Myosin heavy chain 2 (A4.7)	Monoclonal	SANTA CRUZ	Sc-53095	1:1000
P62/SQSTM1	Polyclonal	Merck	P0067	1:1000
LC3B	Polyclonal	Merck	L7543	1:1000
5-Lipoxygenase	Monoclonal	Abcam	AB169755	1:1000
Phospho-Akt (Ser473)	Polyclonal	CST	#9271	1:1000
Akt	Polyclonal	CST	#9272	1:1000
Laminin	Polyclonal	Abcam	AB11575	1:30
Myosin heavy chain Type IIa	Monoclonal	DSHB	SC-71	2-5 ug/ml
Myosin heavy chain Type IIb	Monoclonal	DSHB	BF-F3	2-5 ug/ml

[94] [표2]

Secondary antibody	Conjugated use	Company	Catalog No.	Dilution
Horse anti-Mouse IgG HRP	HRP	CST	#7074	1:2000
Goat anti-Rabbit IgG HRP	HRP	CST	#7074	1:2000

Alexa Fluor [®] 488 Goat anti-mouse IgG(H+L)	Alexa Fluor 488	INVITROGEN	A11001	1:1000
Goat anti-Rabbit IgG h+l Dylight [®] 594 Conjugated	Dylight [®] 594	Bethyl	A90-116D4	1:1000

[95] 5. RT-PCR 및 정량 실시간 PCR

[96] 정량 실시간 PCR의 경우, 관심 유전자의 전사체 수준을 StepOnePlus 실시간 PCR 시스템(Applied Biosystems, UK)을 사용하여 분석하였다. 전체 RNA를 역전사하여 AccuPower[®]RT PreMix(Bioneer Corporation)를 사용하여 cDNA를 준비하였다. 얻은 cDNA는 다음의 변경을 통해 제조업자의 지시에 따라 실시간 PCR에 적용하였다. 특정 프라이머 각각의 200 nM(최종 농도)과 1 μ g의 전체 RNA로부터 합성된 cDNA의 1 μ L를 함유하는 20 μ L 2X Power SYBR Green PCR Master Mix (Enzynomics, Republic of Korea)의 총 부피에서 PCR을 3회 수행하였다. PCR 증폭은 혼합물을 95°C에서 10분 간 인큐베이션한 후 증폭 단계를 40 사이클의 변성, 어닐링 및 연장으로 구성하였다. 변성은 95°C에서 15초 동안 수행하였고, 어닐링은 60°C에서 1분 동안 수행하였으며, 연장은 각 사이클 후에 72°C에서 형광 검출을 사용하여 72°C에서 20초 동안 수행하였다. 최종 사이클 후, 모든 샘플의 융점 분석은 연속 형광 검출을 사용하여 60 내지 95°C의 범위 내에서 수행하였다. 특정 cDNA 샘플은 각 실행에 포함되어 실행간 비교를 위한 참조 자료로 사용하였다. GAPDH의 발현 수준은 다른 모든 유전자의 발현 수준을 계산하여 표준화하는데 사용하였다. 결과는 각 유전자에 대한 상대적 발현 수준으로 표현하였다. 합성된 cDNA는 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR) 또는 표준 PCR에 의해 증폭되었다. 이 실험에서 사용된 PCR 프라이머를 하기 표 3에 나타내었다.

[97]

[98] [표3]

Primer name	Primer sequence	Size (bp)	Accession Number
Gapdh	F : CTCCACTCACGGCAAATTCA	120	NM_001289726
	R : GCCTCACCCCATTTGATGTT		
Atrogin-1	F : CAGAGAGCTGCTCCGTCTCA	178	NM_026346
	R : ACGTATCCCCCGCAGTTTC		
Murf-1	F : CCGAGTGCAGACGATCATCTC	198	NM_001039048
	R : TGGAGGATCAGAGCCTCGAT		
FoxO3a	F : TGGAGTCCATCATCCGTAGTGA	147	NM_019740

	R : CTGGTACCCAGCTTTGAGATGAG		
Pax7	F : CACAGAGGCAGAGCTGATTGC	157	NM_011039
	R : CCAATTGAGGAGAGTGACAGGTT		
Myf5	F : AGCTGGGCAGAATACGTGCTT	112	NM_008656
	R : AGAACAGGCAGAGGAGAATCCA		
Myod1	F : TGTCCTTTTCGAAGCCGTTCT	169	NM_010866
	R : TGCAGCCAGAGTGCAAGTG		
Myogenin	F : AGCGCAGGCTCAAGAAAGTG	181	NM_031189
	R : CCGCCTCTGTAGCGGAGAT		
Myh2	F : GATCACCACGAACCCATATGATT	183	NM_00103954 5
	R : TTCATGTTCCATAATGCATCAC		
Alox5	F : TTCCCATGTTACCGCTGGAT	100	NM_009662.2
	R : GCTGCTTGAGGATGTGAATTTG		
Gapdh	F : CTGCACCACCAACTGCTTAGC	107	NM_002046
	R : TCTTCTGGGTGGCAGTGATG		
Atrogin-1	F : GGAACTACTCCAGACCCTCTACAC A	103	NM_148177
	R : CTCCATCCGATAACCCACAT		
Murf-1	F : TTGACTTTGGGACAGATGAGGAA	102	NM_032588
	R : CCAGCTCCTTACTGGTGTCCTT		

[99] 6. LTB4 효소연관 면역침강법

[100] LTB4 ELISA 키트는 My Biosource(CA, USA)로부터 구입하였으며, 마우스의 다리 근육과 세포 내 LTB4의 농도는 제조사의 지시에 따라 면역 효소연관 면역침강법을 통해 측정되었다. 샘플들(100 μ L)은 polyclonal LTB4 항체가 붙어있는 96 wells에 1시간 동안 상온(RT)에서 보관하였다. 이후 과정을 멈추는 효소반응을 진행 후, 405 nm의 흡광도로 측정하였다.

[101]

[102] 7. 동물 실험

[103] 실험실 동물의 관리 및 사용에 관한 실험 동물 연구소 지침에 따라 동물 연구를 수행하였다. 또한, 동물 연구는 광주 과학 기술 연구소 동물 관리 및 사용 위원회(승인 번호: GIST-2021-059)의 승인을 받았다. 생후 12주된 수컷 C57BL/6 마우스를 Damool Science(Daejun, Republic of Korea)에서 구입하였다.

[104]

- [105] 8. 텍사메타존 유도 근감소증 마우스 모델
- [106] 12주령의 수컷 C57BL/6J 마우스를 5마리씩 3 그룹으로 나누어 다음과 같이 약물을 처리하였다. 1) 5% DMSO, 5% Tween 80을 포함하는 PBS(Vehicle 그룹), 2) 15 mg/kg의 Dexamethasone(15 mg/kg의 농도, 5% DMSO, 5% Tween 80을 포함하는 PBS)(Dexamethasone 그룹), 3) 10 mg/kg의 말로틸레이트(10 mg/kg의 농도, 15 mg/kg Dexamethasone, 5% DMSO, 5% Tween 80을 포함하는 PBS)(말로틸레이트 그룹)를 2 주 동안 복강 내 주사(용액 용량 = 200 μ L) 하였다. 이 후 마우스의 근육 기능과 조건을 분석하였다.
- [107]
- [108] 9. 노화 마우스를 이용한 근감소증 모델
- [109] 21개월령 이상의 수컷 C57BL/6J 마우스에 5마리씩 2 그룹으로 나누어 다음과 같이 약물을 처리하였다. 1) 6.73% DMSO를 함유한 0.5% 카복실 메틸(Vehicle group) 2) 50 mg/kg 말로틸레이트(50 mg/kg의 농도, 6.73% DMSO를 함유한 0.5% 카복실 메틸)(말로틸레이트 그룹)를 4 주간 매일 경구투여 하였다. 그 후 근육의 기능과 조건을 분석하였다.
- [110]
- [111] 10. 그립 강도 측정
- [112] 그립 강도는 BIO-GS3 grip strength test meter (Bioseb, FL, USA)로 측정하였다. 마우스를 그리드 위에 올려 두고 마우스가 그리드로부터 떨어질 때까지 네 발로 부드럽게 뒤로 당기도록 하여 그립강도를 측정하였다. 해당 시도는 30 초의 시간 간격을 두고 진행되었으며, 3회 시도 중 가장 큰 값을 대표되는 근력으로 선택하였다.
- [113]
- [114] 11. 근육 피로도 측정
- [115] 근육의 피로도는 Rotarod(Ugo Basile, Italy)를 이용한 두 가지 다른 모델로부터 측정되었다. 하나는 일정한 속력으로 돌아가는 원통 위에 얼마나 오랫동안 운동을 지속할 수 있는지 측정하는 일정속도 모델이며, 다른 모델은 일정한 시간마다 원통의 속력이 증가할 때 마우스가 얼마나 빠른 속력에서까지 운동을 지속할 수 있는지 측정하는 가속 모델이다. 마우스는 위 두 모델에서 측정하기 하루 전 5 rpm 에서부터 15 rpm까지 적응할 수 있도록 훈련하였다. 훈련 도중 마우스가 1분 안에 4번이상 운동을 지속하지 못하고 떨어졌을 때, 마우스가 더 이상 운동을 지속할 수 없다 판단하여 훈련을 종료하였다.
- [116]
- [117] 12. 근육 해부 및 조직학적 분석
- [118] 마우스는 희생시키기 전에 IP 주사에 의해 22 mg/kg Ketamine (Yuhan, Republic of Korea) 과 10 mg/kg xylazine (Bayer, Republic of Korea)를 복강 내 투여하여 마취 후 검체하였다. 대퇴 사두근, 비복근, 전경골근, 가자미근을 검체한 뒤, 무게를 측정하였다. 면역조직염색법을 위해 검체된 근육은 4°C에서 4% 파라포름알데히

드로 밤새 배양하여 고정하고, 파라핀 용액으로 포매를 진행하여 -80°C에서 보관하였다. 절단 및 헤마톡실린 & 에오신 염색은 광주과학기술원의 실험동물 자원 센터에서 진행되었다. 헤마톡실린 & 에오신 염색은 키트(Merck, Germany)를 이용하여 진행되었다. 근섬유의 단면적은 ImageJ 1.48 software (National Institutes of Health, USA)를 통하여 측정되었다.

[119]

[120] 13. 면역조직화학염색법

[121] 미오신 중쇄 타입 2A와 2B (DSHB, IA, USA)과 항-라미닌 항체(Abcam, Cambirdge, UK)를 이용하여 면역조직 화학염색법을 진행하였다. 카운터스테인은 1 μ M의 DAPI 용액에 의하여 염색하였다. 근섬유의 단면적은 LEICA DM 2500 (Leica, Germany)을 통해 영상으로 시각화한 후, ImageJ 1.48 software(National Institutes of Health, USA)를 통해 측정하였다.

[122]

[123] 14. RNA sequencing

[124] 전체 RNA의 농도는 Quant-IT RiboGreen (Invitrogen, #R11490)을 통해 측정하였다. RNA의 전체 무결성을 평가하기 위하여 TapeStation RNA screentape (Agilent, #5067-5576)을 진행하였다. 오직 높은 순도의 RNA준비를 위하여 RIN 값이 7.0 이상의 RNA만 RNA library construction에 사용되었다.

[125]

Illumina TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Gold Kit (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA, #20020599)에 의해 각 샘플의 전체 RNA 중 0.5 μ g만 library 형성을 위해 사용되었다. 워크플로의 첫 번째 단계는 전체 RNA에서 rRNA를 제거하는 것이다. 이 단계 다음으로, 나머지 mRNA는 승온에서 2가 양이온을 사용하여 작은 조각으로 단편화하였다. 절단된 RNA 단편은 SuperScript II 역전사효소 (Invitrogen, #18064014)와 무작위 프라이머인 DNA 중합효소 I, RNase H 및 dUTP를 사용하여 이중 가닥 cDNA로 복제하였다. 그런 다음 이 cDNA 단편은 최종 수리 과정, 단일 'A' 염기 추가, 어댑터 결합을 거치고 제품을 정제하고 PCR로 농축하여 최종 cDNA 라이브러리를 만들었다.

[126]

라이브러리는 qPCR 정량화 프로토콜 가이드(KAPA BIOSYSTEMS, #KK4854)에 따라 Illumina 시퀀싱 플랫폼용 KAPA 라이브러리 정량화 키트를 사용하여 정량화되었으며 TapeStation D1000 ScreenTape(Agilent Technologies, #5067-5582)를 사용하여 적격되었다. 그런 다음 인덱싱된 라이브러리를 Illumina NovaSeq(Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)에 제출하고 페어드 엔드(2 x 100bp) 시퀀싱을 Macrogen Incorporated에서 수행하였다.

[127]

[128] 15. 인간 유래 근육모세포 배양 및 실험

[129] 인간 유래 근육모세포는 Thermo-Fisher Scientific (USA)에서 구입하였다. 근육모세포를 수조를 사용하여 해동하고 실온에서 5분 동안 180g에서 원심분리하고 20mL DM으로 세척하였다. 그런 다음 근육모세포를 DM에 재현탁하고 4.8 x

10^4 세포/웰의 밀도로 12웰플레이트에 접종하였다. 48시간 후, 근육모세포를 24시간 동안 관심 화합물로 처리하였다. 근관은 H&E로 염색되었다. DIC 캡처 이미지(Olympus CKX41)의 광학 현미경 분석 후 ImageJ 1.48 소프트웨어(National Institutes of Health, USA)를 사용하여 근관 직경을 측정하였다.

[130]

[131] 16. 통계 분석

[132] 통계적 유의성은 Student's t-test를 사용하여 결정되었다. p-value가 0.05보다 작을 때 통계적 유의성을 갖는다고 판단되었다. 언급되지 않는 한 표시된 모든 데이터는 3 회 이상의 실험 반복을 나타내며, 그래프의 오차 막대는 표준 편차이다.

[133]

[134] **결과**

[135] 1. Alox5 억제제(말로틸레이트, 질류톤, 웨델로락톤)는 글루코코르티코이드로 처리된 마우스의 근관에서 위축을 억제한다.

[136] 글루코코르티코이드 처리 모델은 근관 위축에 대한 Alox5 억제제의 효과를 조사하는 데 사용되었다. Alox5 억제제로는 말로틸레이트, 질류톤, 웨델로락톤이 사용되었다. 이 모델은 노화와 패혈증, 기아, 만성폐쇄성폐질환, 당뇨병, 암과 같은 다양한 유형의 골격근 위축으로 인해 글루코코르티코이드 수치가 증가하기 때문에 선택되었다. 글루코코르티코이드인 Dex로 처리한 마우스의 근관은 직경이 감소하고 더 얇은 근관의 비율이 더 많이 나타났으며 이는 근관 위축을 나타낸다. 말로틸레이트 처리는 근관 위축에 대한 Dex의 효과를 억제하였다(도 1a 내지 도 1c). Atrogin-1과 MuRF-1은 골격근 소모에서 상향 조절되는 중요한 근위축조절인자(atrogene)이다. 말로틸레이트 처리는 Dex 처리 근관에서 Atrogin-1 및 MuRF-1의 상향 조절을 억제하였다(도 1d). 더욱이, 총 단백질 합성은 Dex 처리에 의해 감소되었고 말로틸레이트 처리에 의해 회복되었다(도 1e). 전사 인자 FoxO3a(forkhead box O3)는 골격근 위축의 유비퀴틴-프로테아좀 경로의 주요 조절자이다. 이화 신호 전달 경로에 의한 FoxO3a의 탈인산화는 세포질에서 핵으로의 전위 및 표적 근위축조절인자의 상향 조절을 유도하였다. FoxO3a 인산화 수준은 Dex로 처리된 근관에서 감소하고 말로틸레이트 처리에 의해 증가했으며(도 1f), Atrogin-1 발현의 감소를 동반하였다. 조절되지 않은 자가포식은 골격근 위축의 주요 특징이다. Dex 처리는 이전에 설명된 바와 같이 근관에서 자가포식을 증가시켰다(LC3bI에 대한 LC3bII의 비율 증가 및 p62의 발현 감소). Dex 처리된 근관의 자가포식은 말로틸레이트 처리에 의해 감소되었다(도 1g).

[137] 또한, 도 2 및 3을 참고할 때, 텍사메타존 처리시 C2C12 근관의 직경이 감소하였으며, Alox5 저해제인 질류톤, 웨델로락톤과 말로틸레이트 처리 결과, 근섬유의 직경이 회복됨을 확인하였으며, UPS 연관 효소인 Atrogin-1 과 Murf-1의 발현량은 텍사메타존 처리시 증가하였으나, Alox5 저해제인 질류톤, 웨델로락톤과 말로틸레이트 처리 결과, Atrogin-1 과 Murf-1의 발현량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[138]

[139] 2. Alox5 siRNA 유전자 녹다운은 Alox5 산물인 류코트리엔 B4 수치 증가와 관련된 근관 위축을 예방한다.

[140] 말로틸레이트는 Alox5의 선택적 억제제로 특징지어진다. 근관 위축에 대한 Alox5 유전자 녹다운의 효과는 Dex 처리 근관에서 평가되었다. Alox5 siRNA는 Dex 처리된 근관에서 유전자 발현을 감소시키고 근관 위축을 억제하였다(도 4a-c). 유전자 녹다운은 Atrogin-1 발현의 감소를 동반하였다(도 4d). Alox5 발현을 감소시키는 siRNA의 능력은 qPCR 및 웨스턴 블롯팅에 의해 확인하였다(도 4e-f).

[141] Alox5 효소 억제제인 말로틸레이트 처리는 Dex 처리 근관에서 Alox5 발현에 영향을 미치지 않았다(도 4g). 류코트리엔 B4(LTB4)는 NF- κ B 및 FoxO 신호 전달과 같은 염증 반응 및 이화 경로에 관여하는 Alox5 산물이다. LTB4 수준은 Dex 처리 근관에서 증가하고 말로틸레이트에 의해 낮아진 것으로 나타났다(도 4h). 따라서, 외인성 LTB4의 적용은 Dex 처리된 근관 또는 Atrogin-1의 발현에 영향을 미치지 않았다(도 4i-k).

[142]

[143] 3. 말로틸레이트는 근육형성 프로그램(myogenic program)에는 큰 영향을 미치지 않는다.

[144] 말로틸레이트 처리가 근 형성(myogenesis)에 미치는 영향을 평가하기 위해 마우스의 근관을 말로틸레이트의 존재 하에 분화하도록 유도하였다. 분화 마커인 Myh2(myosin heavy chain type 2)의 발현은 근 형성 동안 말로틸레이트 처리의 영향을 받지 않았다(도 5a-b). Akt의 인산화 증가는 근 형성 동안 주요 신호 이벤트이나, 분화된 근관에서 Akt의 인산화 수준은 말로틸레이트 처리에 의해 크게 변경되지 않았다(도 5c). 마스터 유전자 조절기의 발현 분석은 근형성 프로그램(Pax7, Myf5, MyoG 및 Myh2)은 24시간 말로틸레이트 처리 후 유의미한 변화를 나타내지 않았다(도 5d).

[145]

[146] 4. 말로틸레이트는 글루코코르티코이드 처리 모델에서 골격근 위축을 억제한다.

[147] 생체 내에서 골격근 위축을 예방하기 위한 말로틸레이트의 효과를 조사하기 위한 첫 번째 테스트로 Dex 글루코코르티코이드 처리 모델이 선택되었다. 14일 동안의 말로틸레이트 처리는 Dex 처리된 마우스의 체중에 유의한 영향을 미치지 않았다(도 6a-b). 말로틸레이트 처리는 Dex 처리 마우스에서 그립 강도를 상당히 증가시켰다(도 6c). Dex 처리는 rotarod 성능 테스트에서 낙하 대기 시간과 최대 속도를 감소시켰으며, 둘 다 말로틸레이트 처리에 의해 크게 증가하였다(도 6d-e). 골격근 질량의 평가는 말로틸레이트 처리가 텍사메타손 처리된 마우스의 대퇴사두근 및 가자미근에서 질량을 증가시키는 것으로 나타났다(도 6f-g). 평균 근 섬유 단면적(cross sectional area, CSA)과 더 큰 CSA를 갖는 섬유의 비율은 말로틸레이트 처리에 의해 증가하였다(도 6h-j). ELISA 분석은 Alox5 산물인 LTB4의 수

준이 Dex 처리된 근육에서 증가하고 말로틸레이트 처리에 의해 낮아짐을 나타낸다(도 6k). 말로틸레이트 처리는 또한 Dex 처리된 마우스에서 근위축조절인자인 atrogen-1 및 MuRF-1의 발현을 감소시켰다(도 6l).

[148]

[149] 5. 말로틸레이트는 노화 마우스의 골격근 위축을 억제한다.

[150] 노화 관련 골격근 위축(근감소증이라고 함)을 치료하기 위한 말로틸레이트의 가능성을 평가하기 위해, 노화 마우스를 4주 동안 경구 전달로 치료하였다. 말로틸레이트 처리는 노화 마우스의 체질량에 영향을 미치지 않았다(도 7a-b). 말로틸레이트 처리에 의해 그립 강도가 크게 증가하였다(도 7c). 낙상 평균 대기 시간은 말로틸레이트 처리된 마우스에서 증가했지만 통계적 유의성에 도달하지 못했다(도 7d). 대퇴사두근과 가자미근 근육량은 말로틸레이트 처리된 노화 마우스에서 유의하게 증가하였다(도 7e-f). 대퇴사두근의 조직학적 분석은 평균 근섬유 단면적이 말로틸레이트 처리에 의해 증가되었음을 보여주었다(도 7h). 근섬유 직경 분포는 거대 근섬유(>5000 μm^2)가 말로틸레이트 처리된 노화 마우스에서 훨씬 더 큰 비율을 나타냄을 나타낸다(도 7i). 느린 클래스 I 연속 섬유에 비해 노화 동안 우선적으로 위축을 겪는 속근 섬유 유형 IIA 및 IIB의 면적조직학적 분석은 말로틸레이트 처리가 속섬유의 CSA를 보존함을 나타낸다(도 7j-l).

[151]

[152] 6. 말로틸레이트 처리된 근관의 세포 전사체 분석

[153] 말로틸레이트에 의한 Alox5 억제가 근육 위축을 억제하는 메커니즘에 대한 개요를 얻기 위해 Dex로 인한 위축을 겪는 근관을 말로틸레이트로 처리하고 RNA Seq를 사용하여 세포 전사체를 조사하였다. 발현 패턴은 처리되지 않은 Dex 처리 근관, 정상 근관 또는 말로틸레이트 단독으로 처리된 근관을 비교하였다(도 8a). 히트맵과 화산 플롯은 Dex 또는 Dex와 말로틸레이트로 처리된 근관 사이에서 총 139개의 차등적으로 발현된 유전자(DEG)를 보여주었다(도 8b-c). KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 경로 분석은 대사 경로가 말로틸레이트 처리에 의해 고도로 상향 조절되었음을 보여주었다(도 8d). 유전자 온톨로지(GO) 기능 분석은 기관 발달이 Dex 단독에 비해 Dex와 말로틸레이트로 처리된 근관에서 증가된 최고의 생물학적 과정임을 나타낸다(도 8e). 말로틸레이트 및 미처리와 비교하여 Dex와 말로틸레이트 및 Dex 단독에서 차등 발현을 나타내는 유전자에 대한 히트맵을 도 8f에 나타내었다. 골격근 위축과 관련된 것으로 알려진 많은 유전자의 발현은 말로틸레이트 처리에 의해 조절되었다. 골격근 위축과 관련이 있는 것으로 알려진 유전자는 도 8g에 나타내었다.

[154]

[155] 7. 말로틸레이트는 인간의 골격근 배양에서 위축을 예방한다.

[156] 인간 기증자의 골격근 전구체 세포를 근관으로 분화시키고 텍사메타손 처리에 의해 위축을 일으키도록 유도하였다. 조직학적 분석은 증가된 평균 근관 직경과 더 큰 크기의 근관(도 9a-b)의 더 큰 비율에 의해 나타난 바와 같이 말로틸레이트

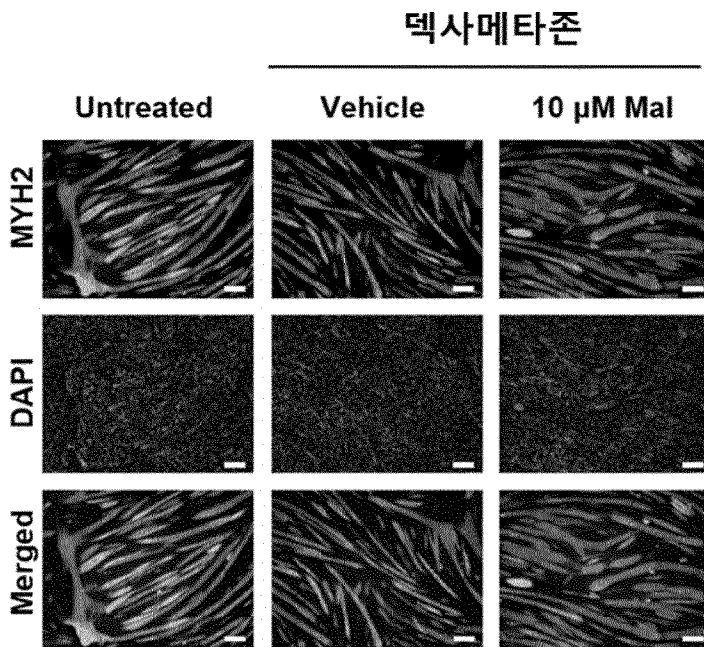
의 공동 처리가 인간 근관의 위축을 예방할 수 있음을 나타낸다. 말로틸레이트 처리는 또한 인간 근관에서 근위축조절인자인, atrogen-1 및 MuRF-1의 발현을 유의하게 감소시켰다(도 9c).

청구범위

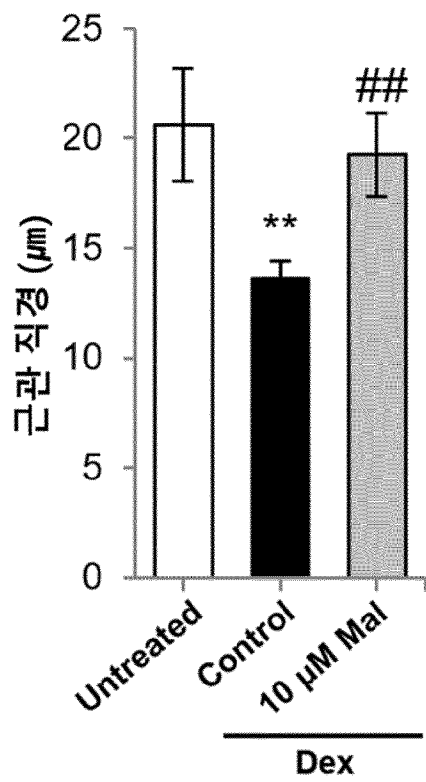
- [청구항 1] Alox5(Arachidonate 5-Lipoxygenase) 억제제를 포함하는 근감소증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 Alox5 억제제는 핵산, 항체, 앵타머, 펩타이드, 단백질, 화합물 또는 천연물인, 근감소증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 Alox5 억제제는 말로틸레이트(Malotilate), 웨델로락톤(Wedelolactone), 질류톤(Zileuton), 노르디하이드로구아이어트산(Nordihydroguaiaretic acid), 프소랄리딘(Psoralidin), 도세베논(Docebenone), 리코펠론(Licofelone), 로나팔레인(Lonapalene), 에나자드렘(Enazadrem), 시르실리올(Cirsiliol), 피크리닌(Picrinine), 아트레류톤(Atreleuton) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종인, 근감소증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 근감소증 예방 또는 치료는 류코트리엔 B4(LTB4)의 생산 감소에 의한 것인, 근감소증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 근감소증 예방 또는 치료는 Atrogin-1 또는 MuRF-1의 발현 감소; 또는 Efna5(Ephrin A5), Fut4(Fucosyltransferase 4), Igf1(Insulin-like growth factor 1), Sod3(Superoxide dismutase 3) 및 Plk 1(Polo like kinase1) 중에서 선택되는 1종 이상 유전자의 발현 증가에 의한 것인, 근감소증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 상기 근감소증은 노화에 의한 것인, 근감소증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 7] Alox5(Arachidonate 5-Lipoxygenase) 억제제를 포함하는 근감소증 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 8] 청구항 7에 있어서, 상기 Alox5 억제제는 핵산, 항체, 앵타머, 펩타이드, 단백질, 화합물 또는 천연물인, 근감소증 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 9] 청구항 7에 있어서, 상기 Alox5 억제제는 말로틸레이트(Malotilate), 웨델로락톤(Wedelolactone), 질류톤(Zileuton), 노르디하이드로구아이어트산(Nordihydroguaiaretic acid), 프소랄리딘(Psoralidin), 도세베논(Docebenone), 리코펠론(Licofelone), 로나팔레인(Lonapalene), 에나자드렘(Enazadrem), 시르실리올(Cirsiliol), 피크리닌(Picrinine), 아트레류톤(Atreleuton) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종인 근감소증 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 10] 청구항 7에 있어서, 상기 근감소증 예방 또는 개선은 류코트리엔 B4(LTB4)의 생산 감소에 의한 것인, 근감소증 예방 또는 개선용 건강기능식품.

- [청구항 11] 청구항 7에 있어서, 상기 근감소증 예방 또는 개선은 Atrogin-1 또는 MuRF-1의 발현 감소; 또는 Efna5(Ephrin A5), Fut4(Fucosyltransferase 4), Igf1(Insulin-like growth factor 1), Sod3(Superoxide dismutase 3) 및 Plk 1(Polo like kinase1) 중에서 선택되는 1종 이상 유전자의 발현 증가에 의한 것인, 근감소증 예방 또는 개선용 건강기능식품.
- [청구항 12] 청구항 7에 있어서, 상기 근감소증은 노화에 의한 것인, 근감소증 예방 또는 개선용 건강기능식품.

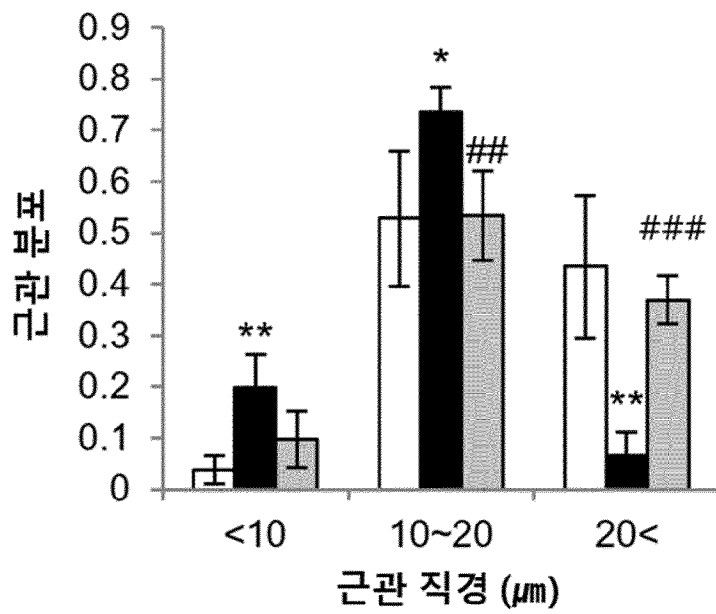
[도 1a]



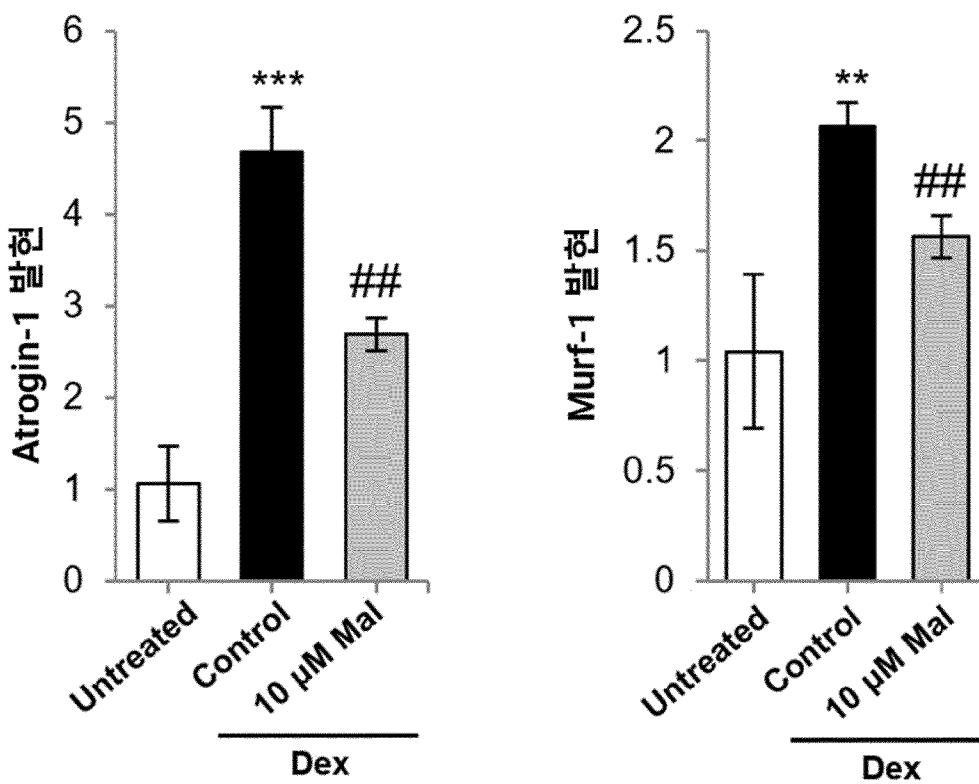
[도 1b]



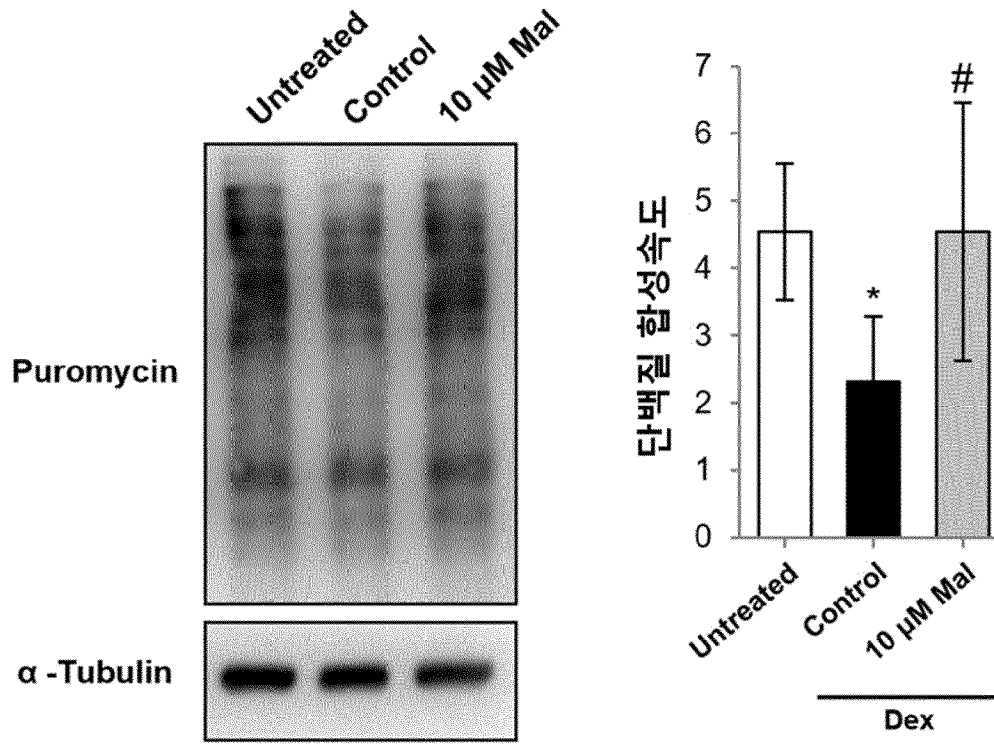
[도1c]



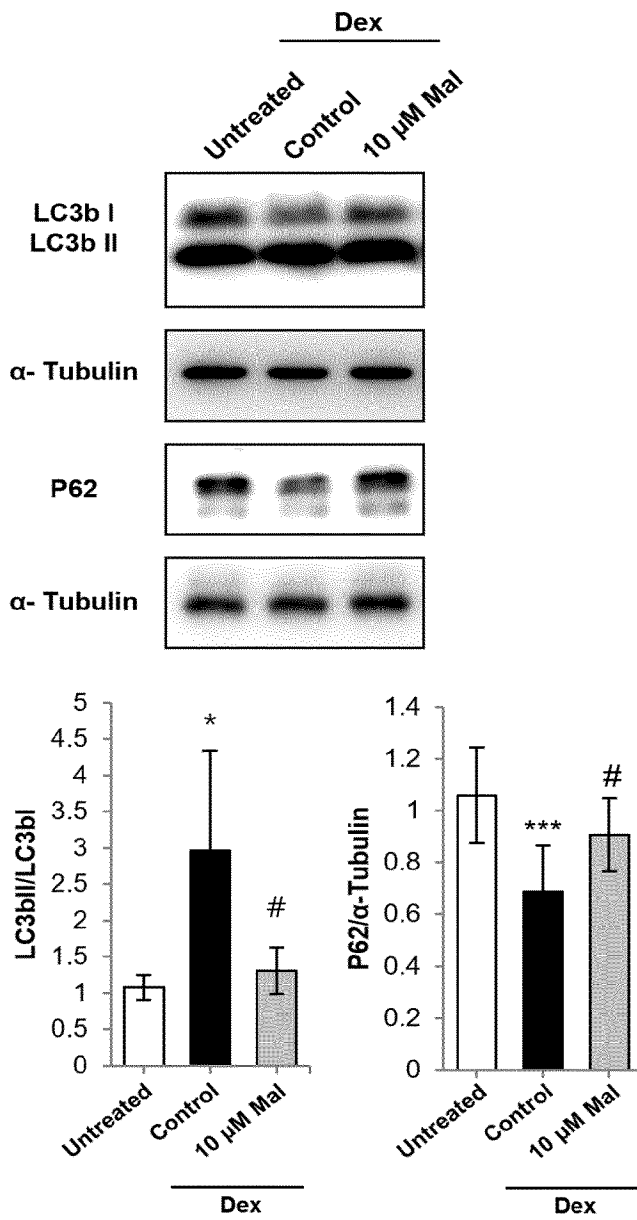
[도1d]



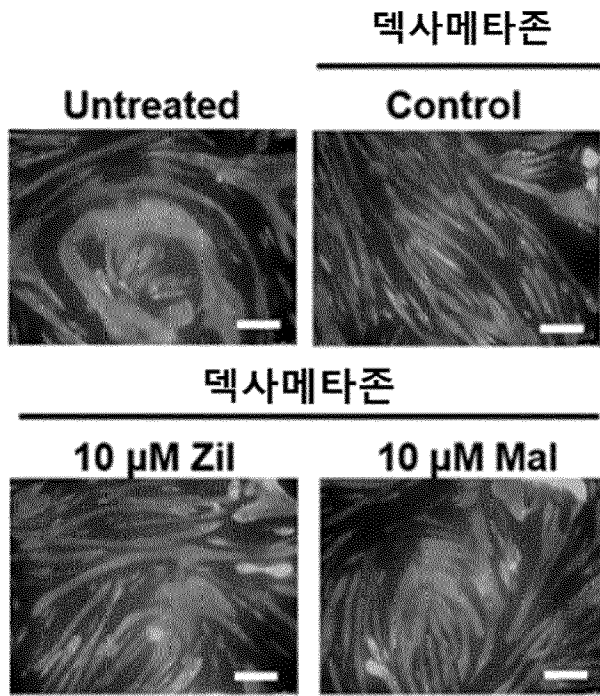
[도 1e]



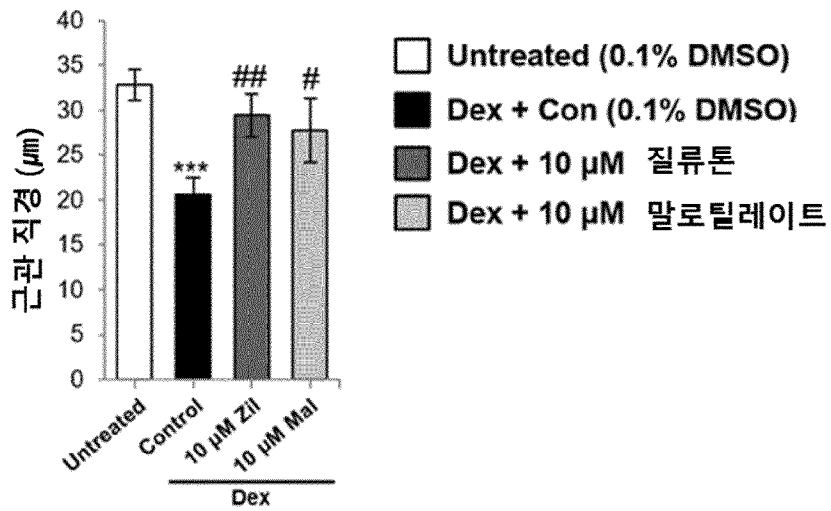
[도 1g]



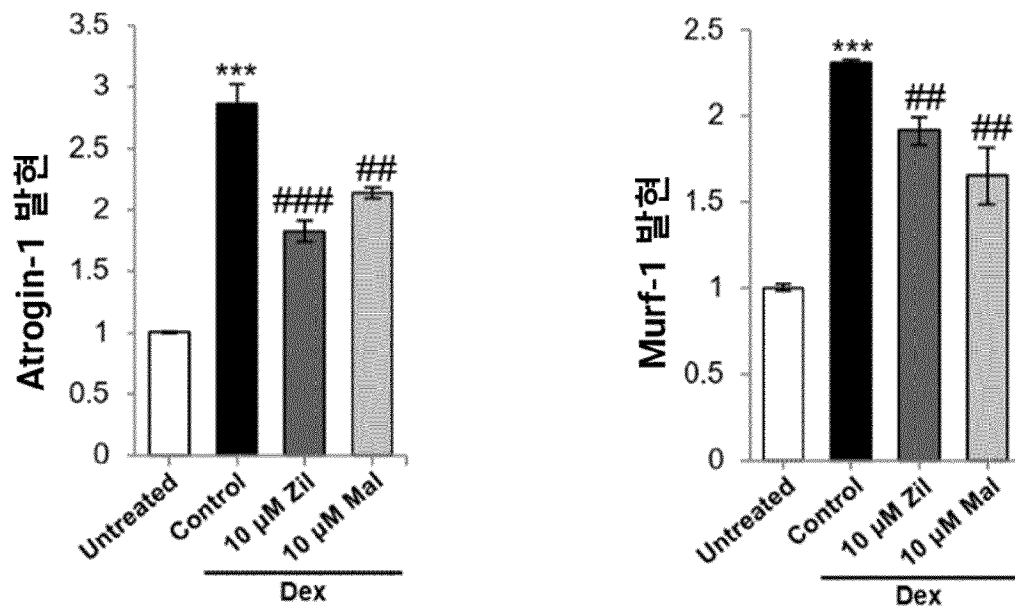
[도2a]



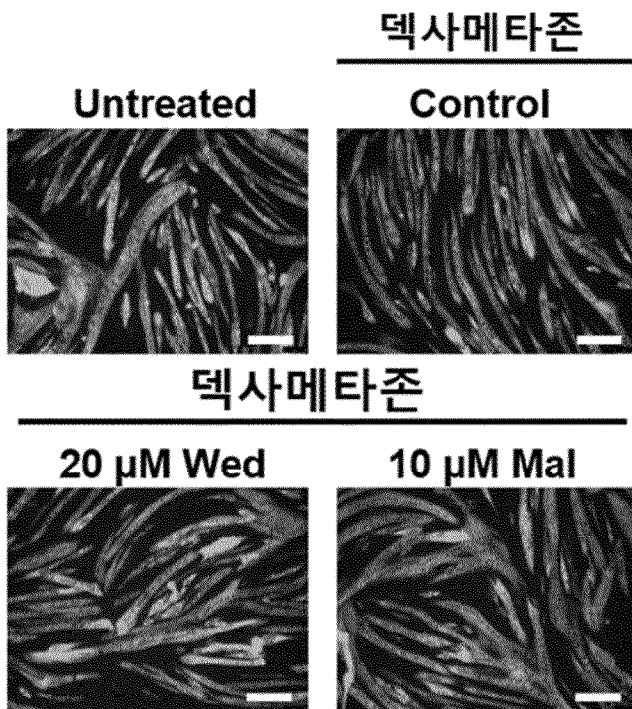
[도2b]



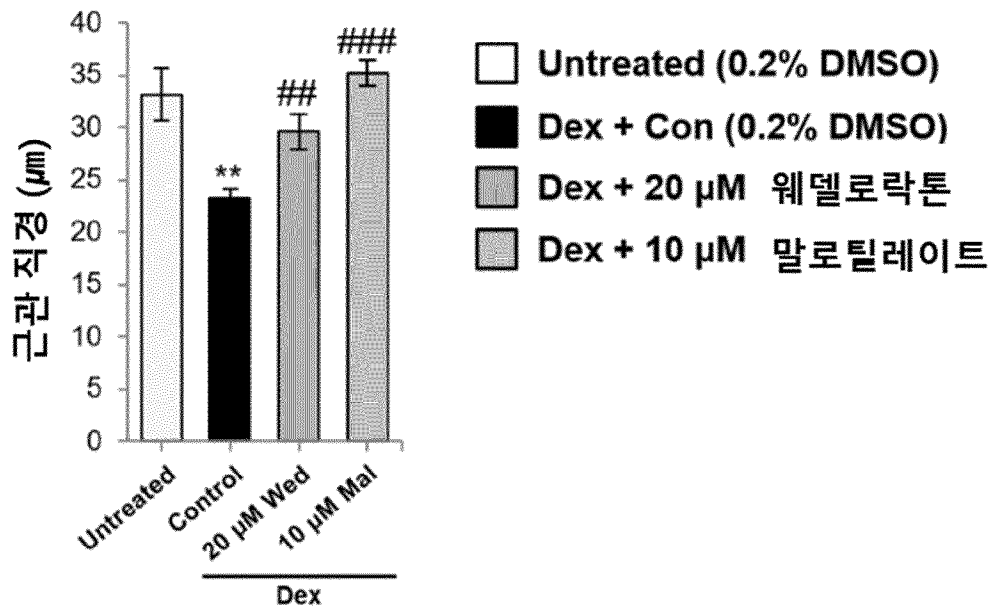
[도2c]



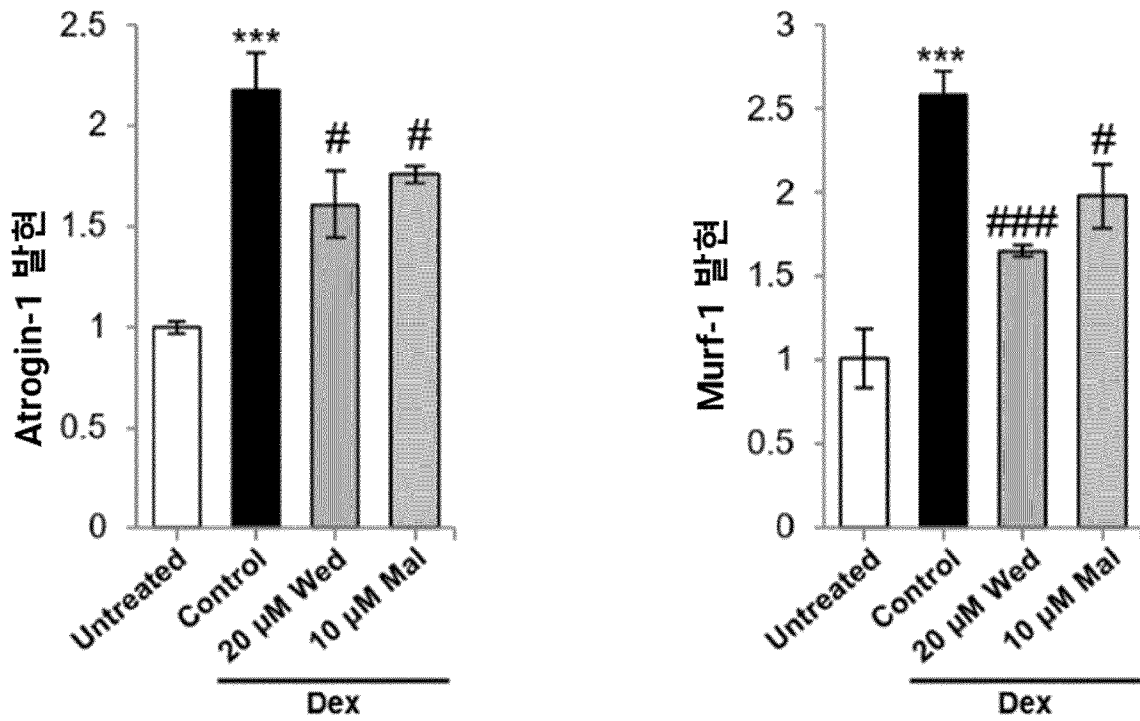
[도3a]



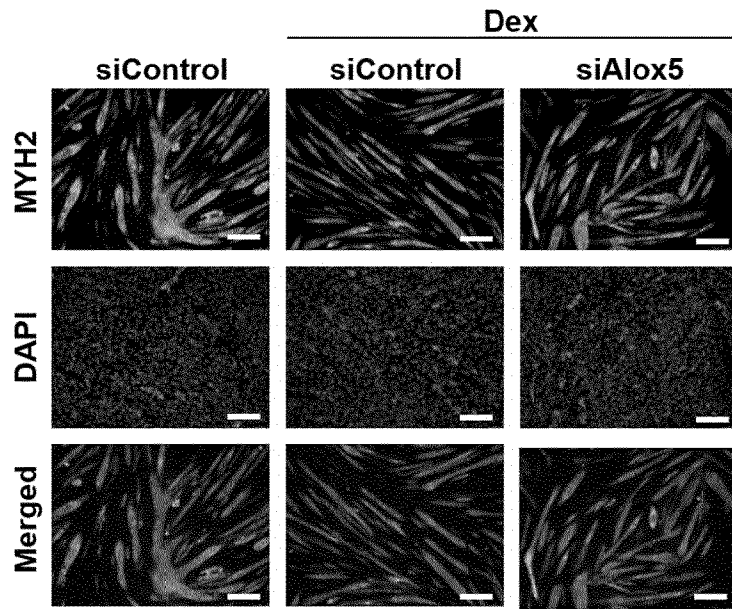
[도3b]



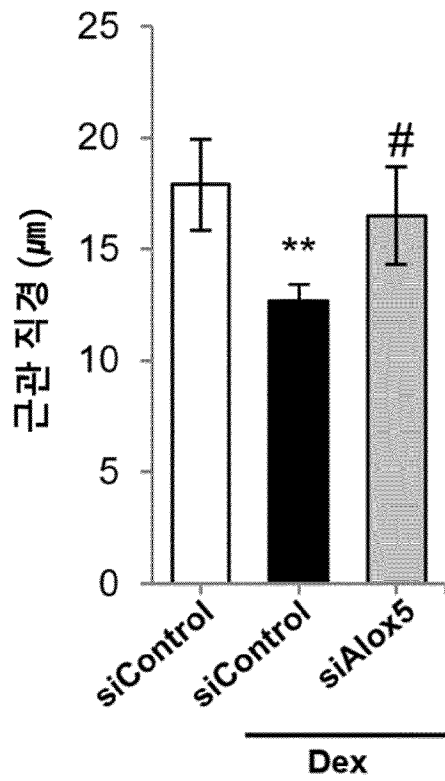
[도3c]



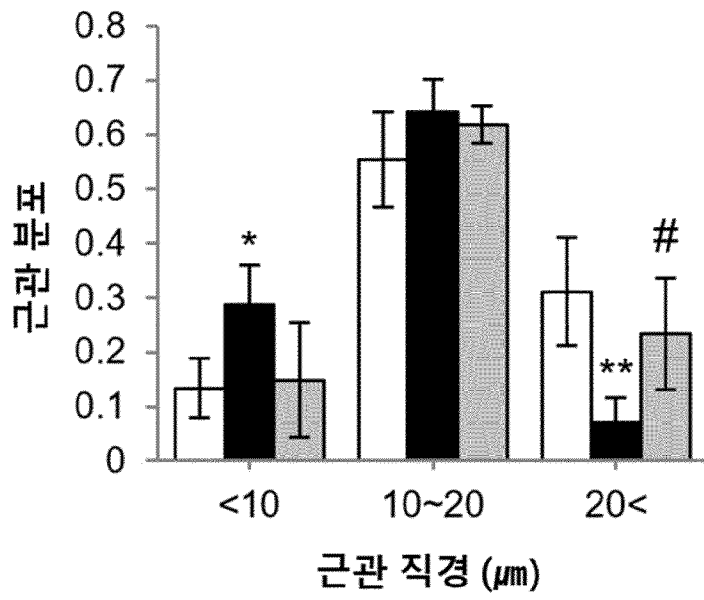
[도4a]



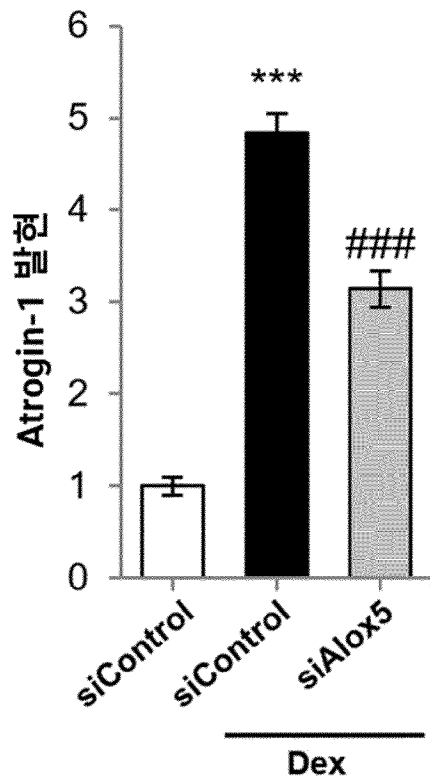
[도4b]



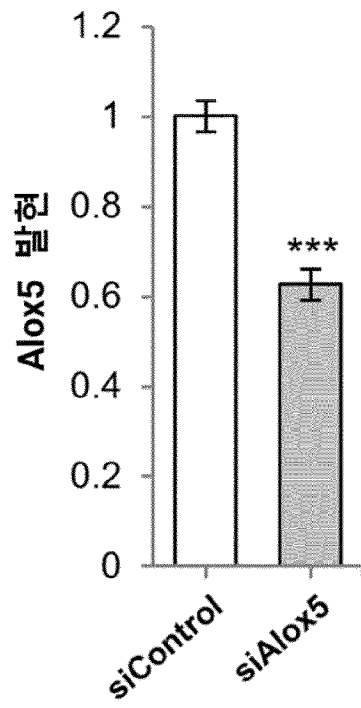
[도4c]



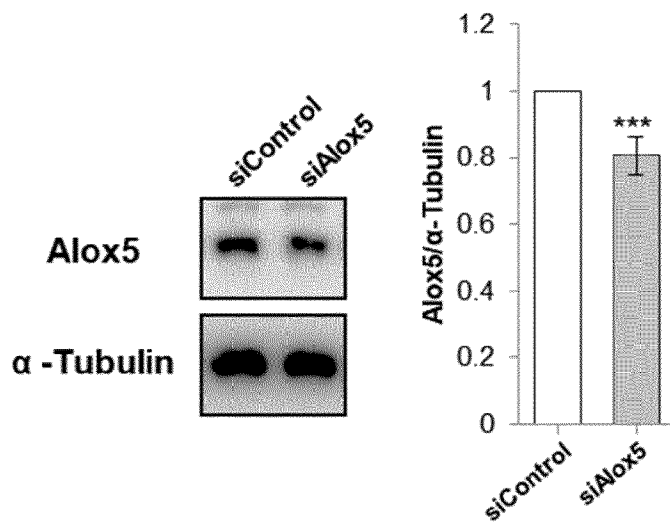
[도4d]



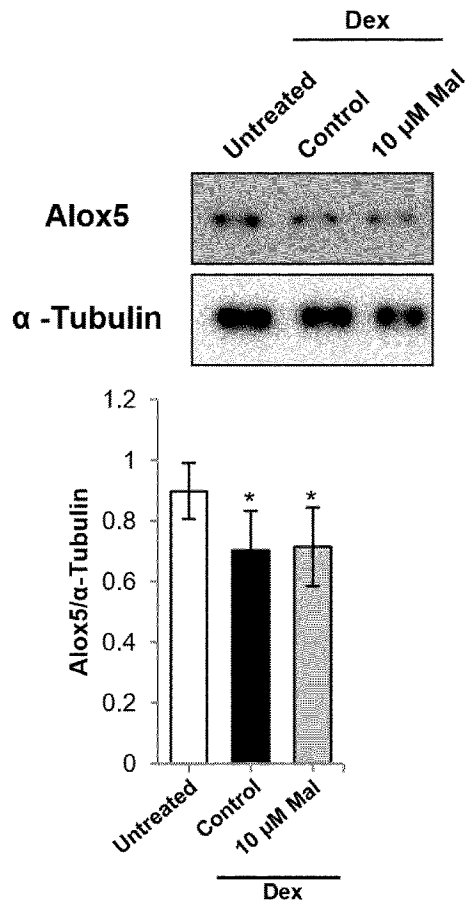
[도4e]



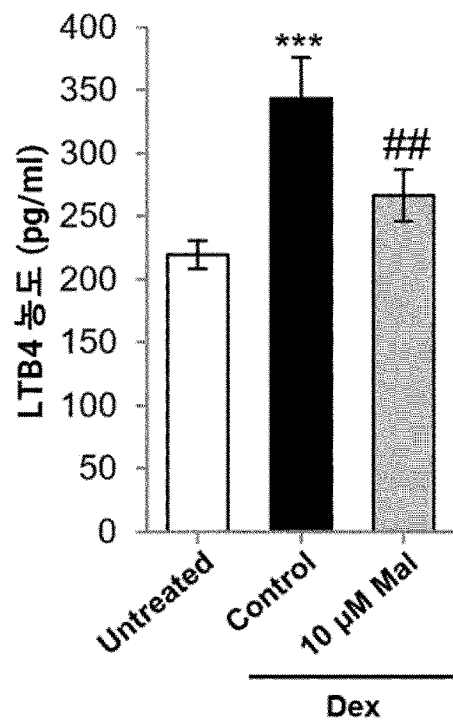
[도4f]



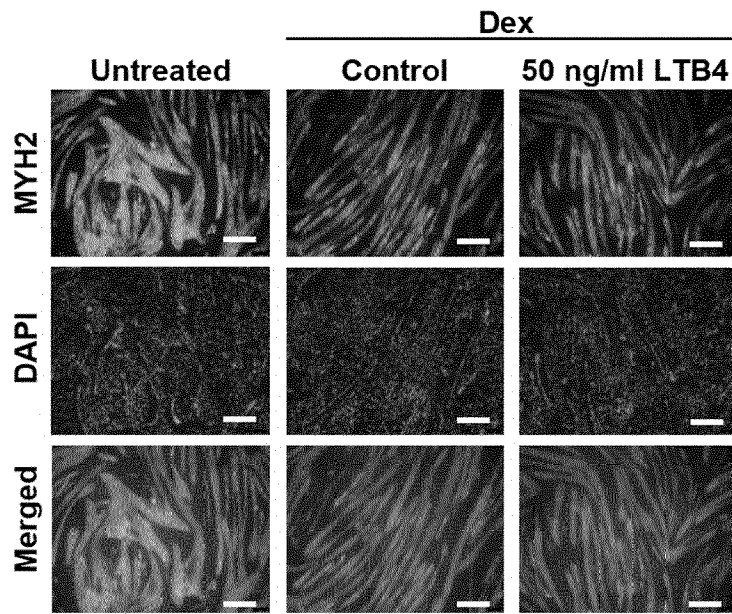
[도4g]



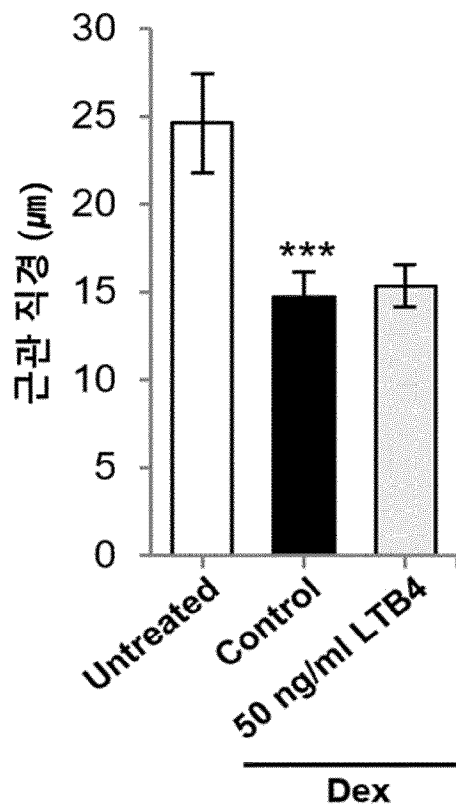
[도4h]



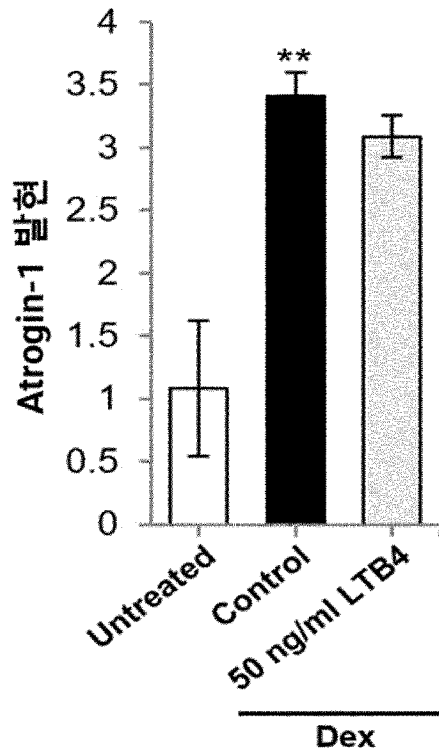
[도4i]



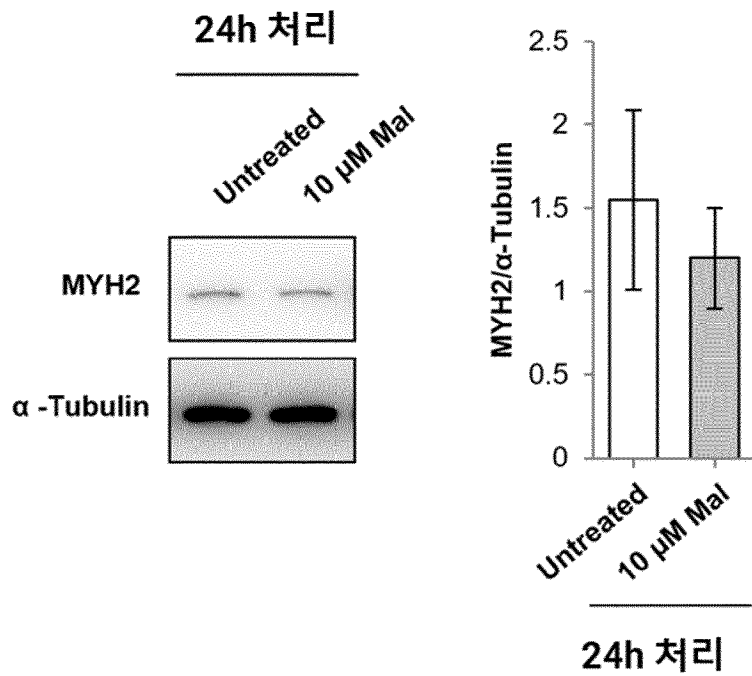
[도4j]



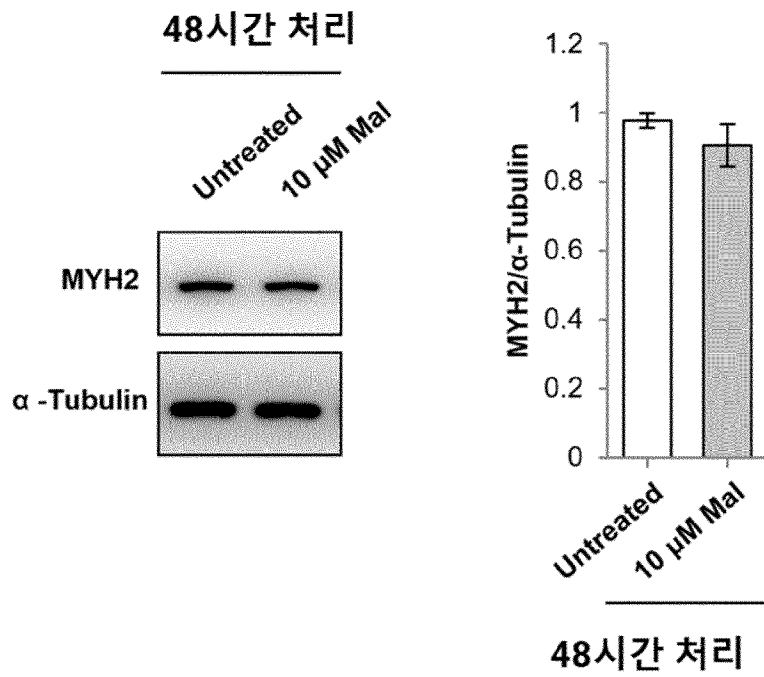
[도4k]



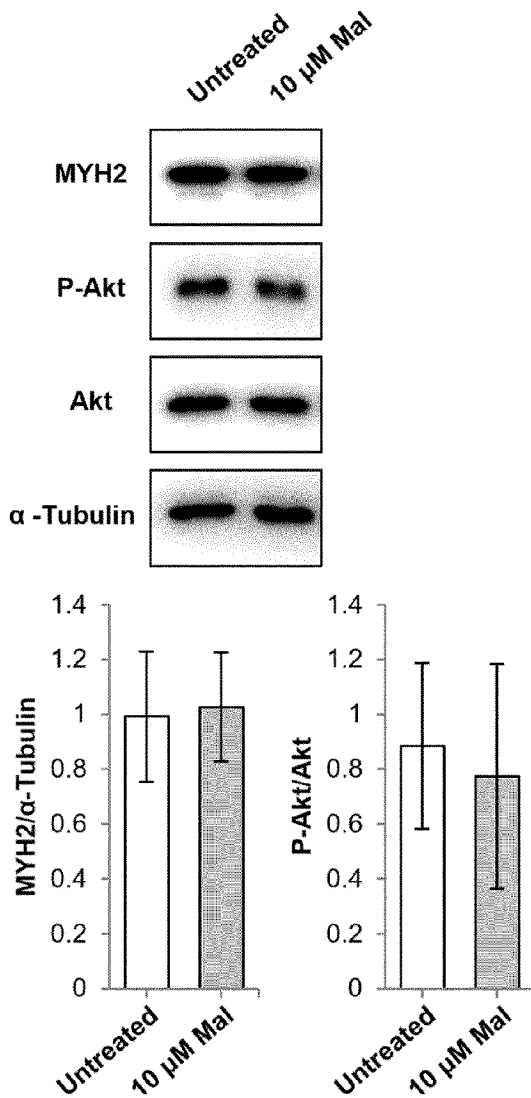
[도5a]



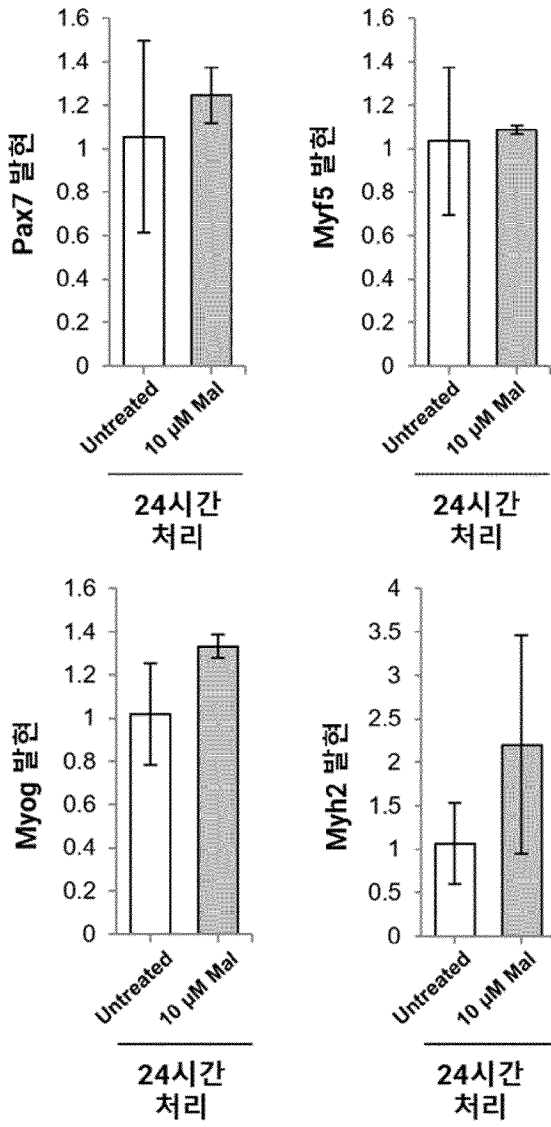
[도5b]



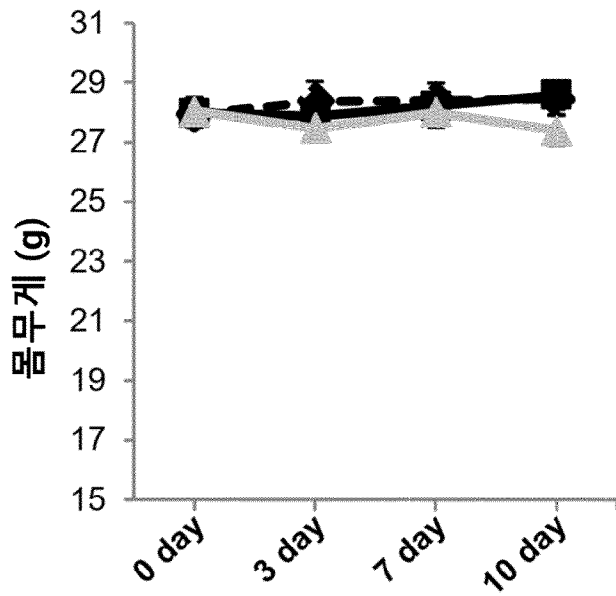
[도5c]



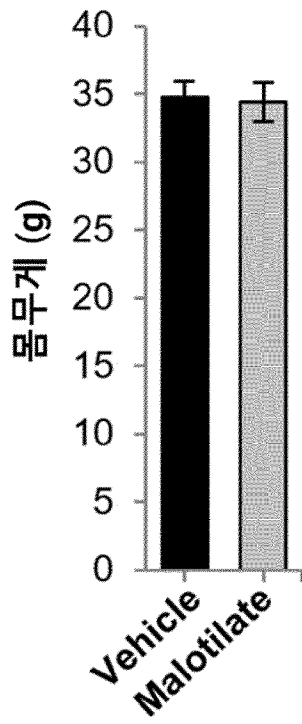
[도5d]



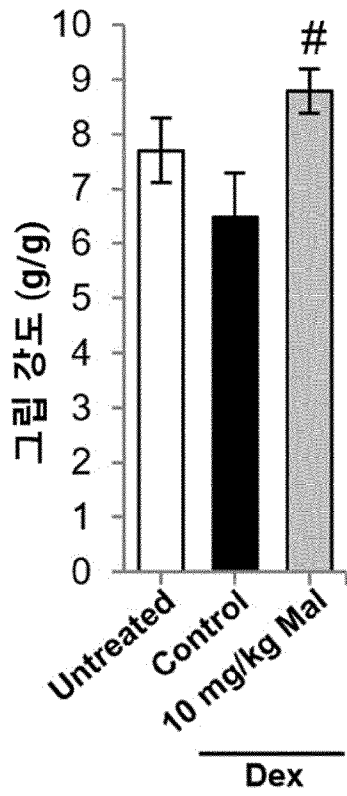
[도6a]



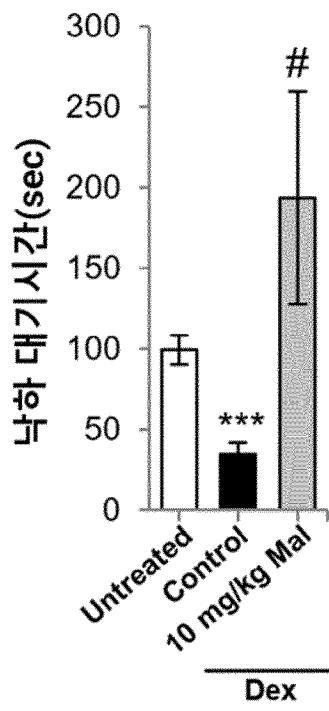
[도6b]



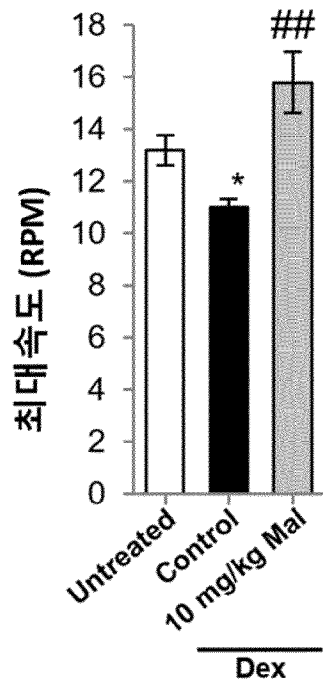
[도6c]



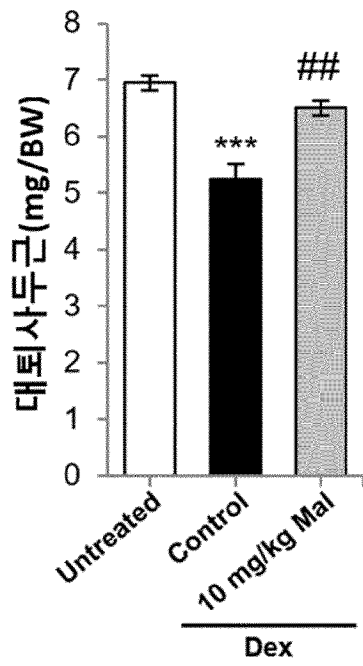
[도6d]



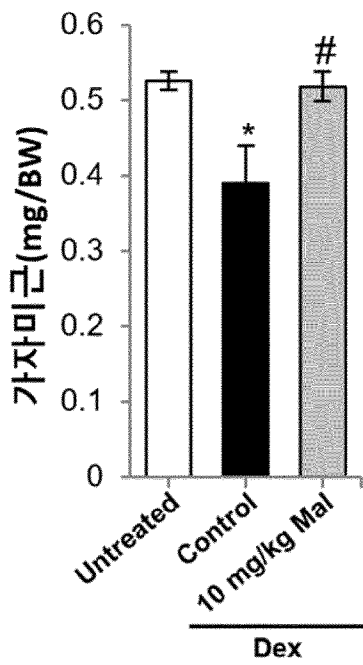
[도6e]



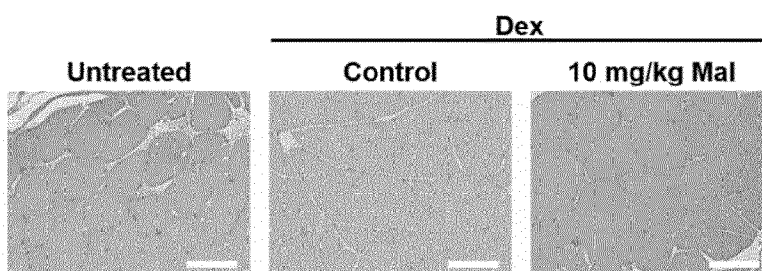
[도6f]



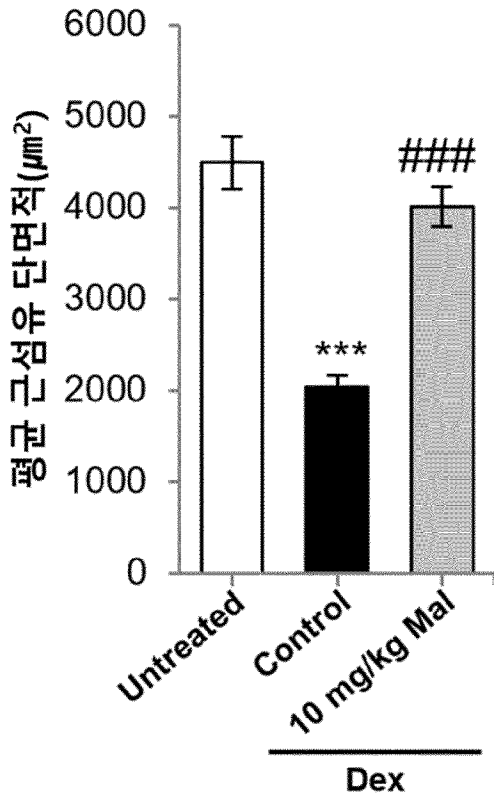
[도6g]



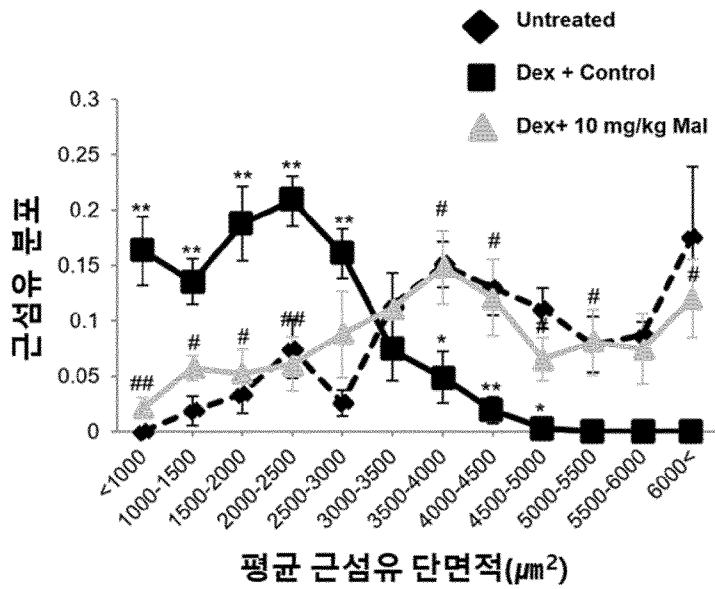
[도6h]



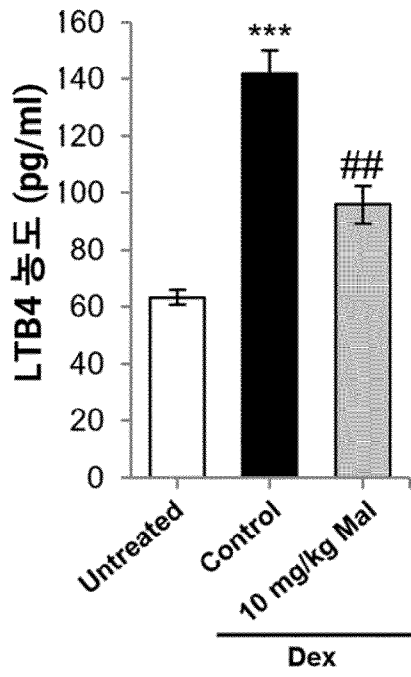
[도6i]



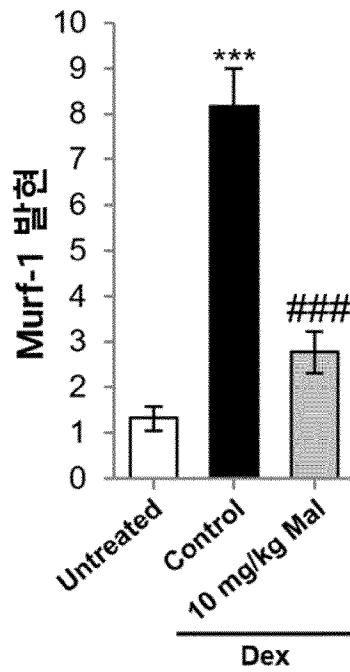
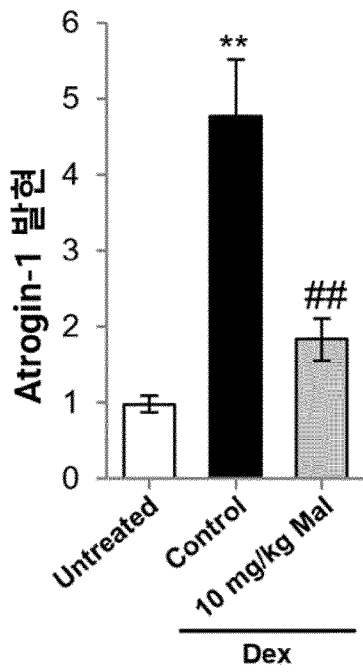
[도6j]



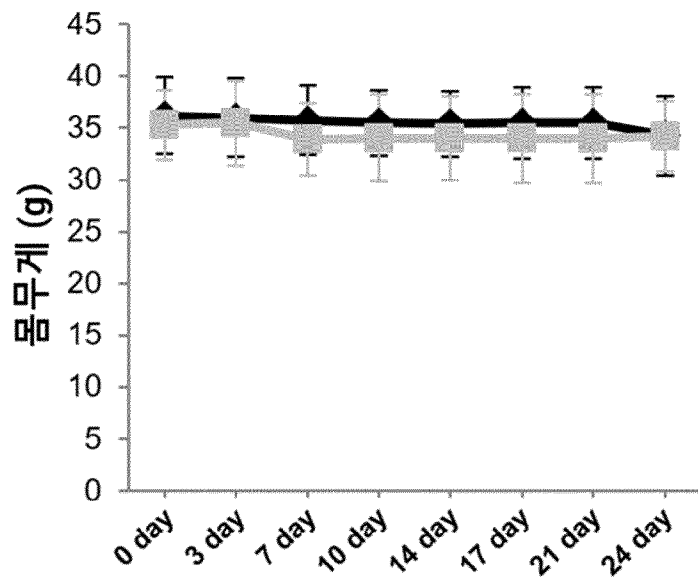
[도6k]



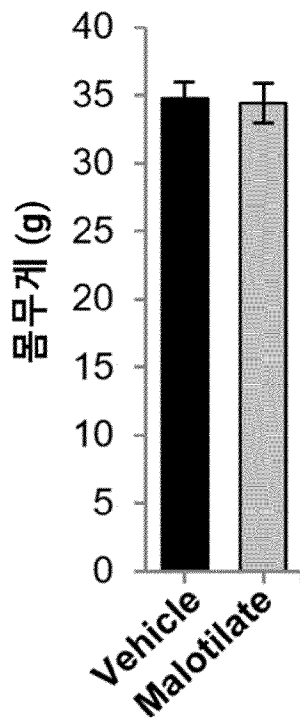
[도6l]



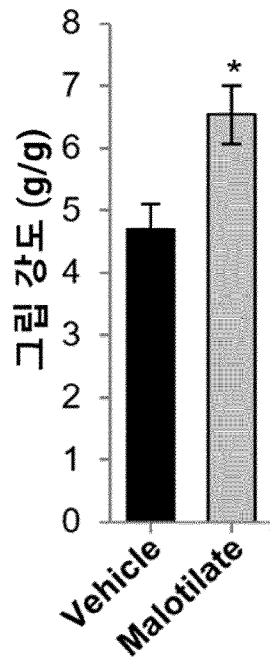
[도7a]



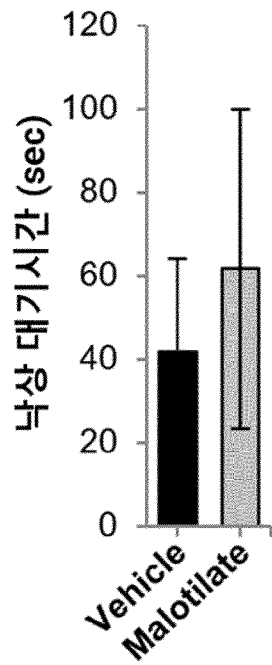
[도7b]



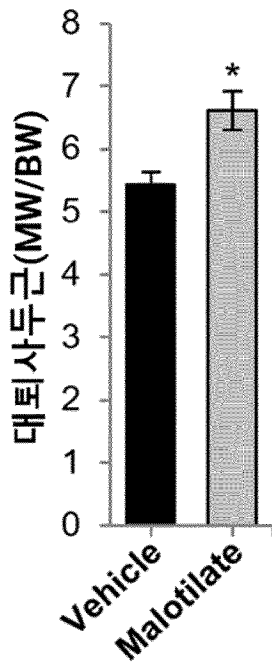
[도7c]



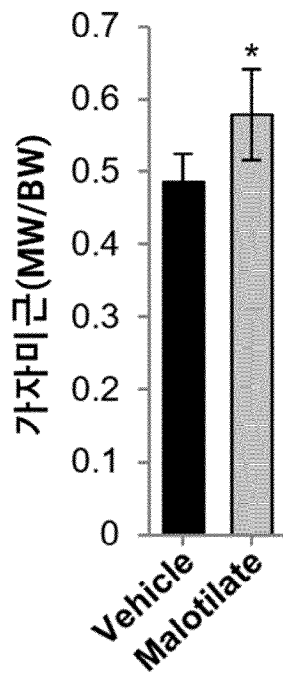
[도7d]



[도7e]

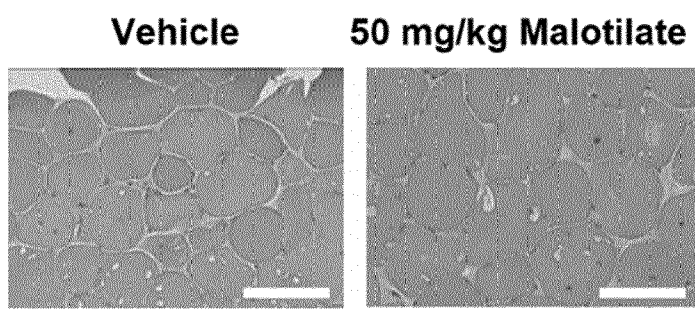


[도7f]

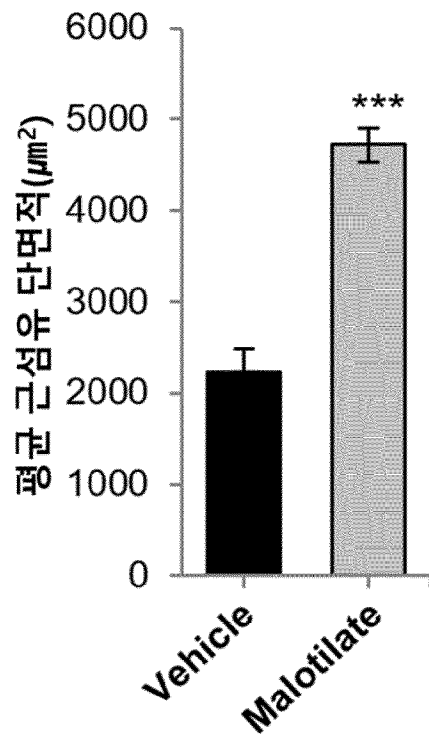


[도7g]

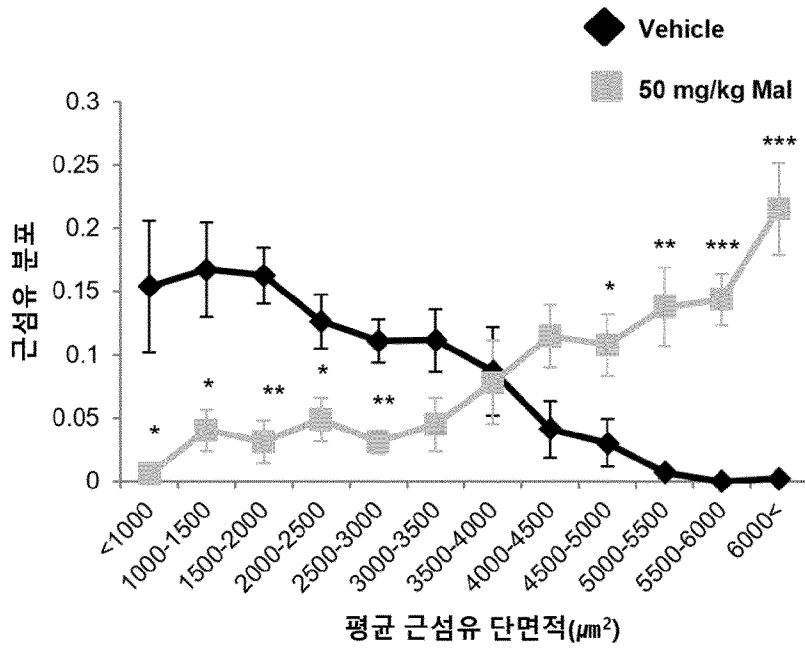
노화 마우스 (22 개월)



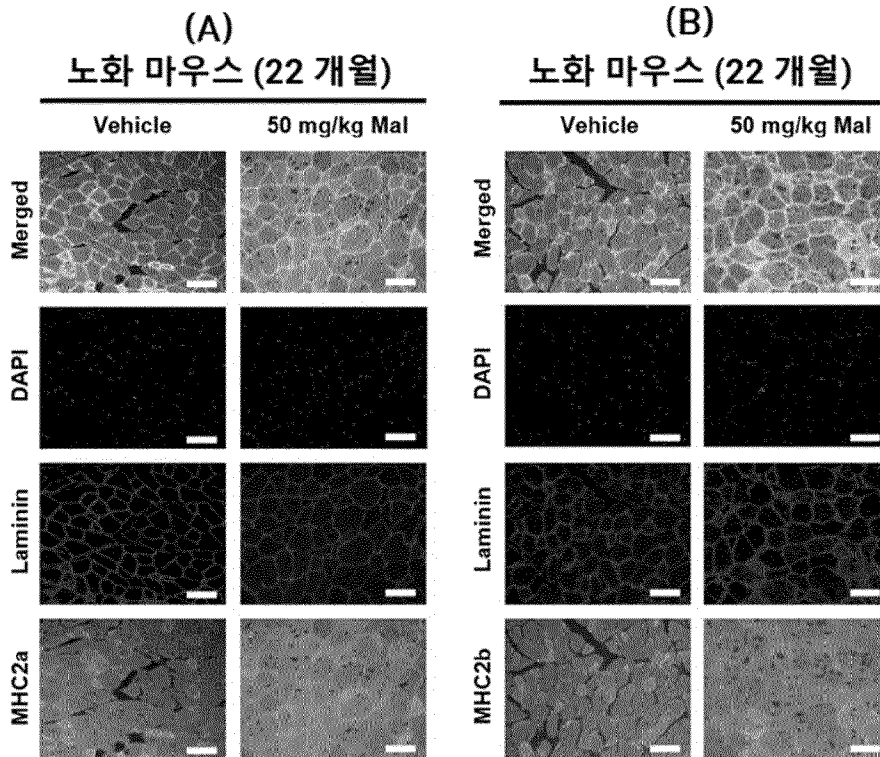
[도7h]



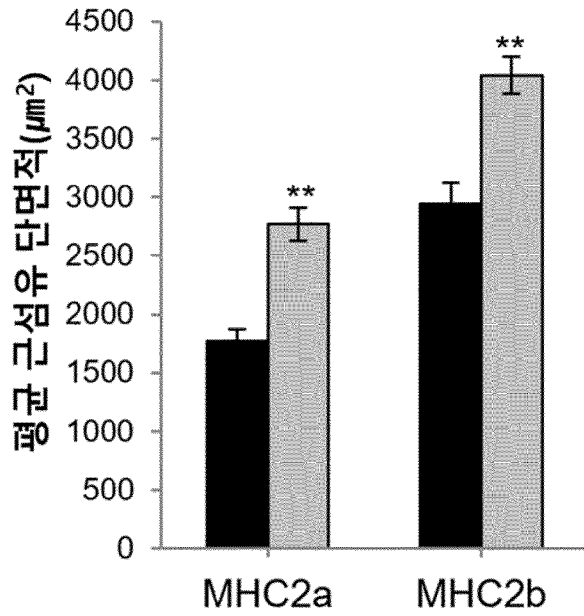
[도7i]



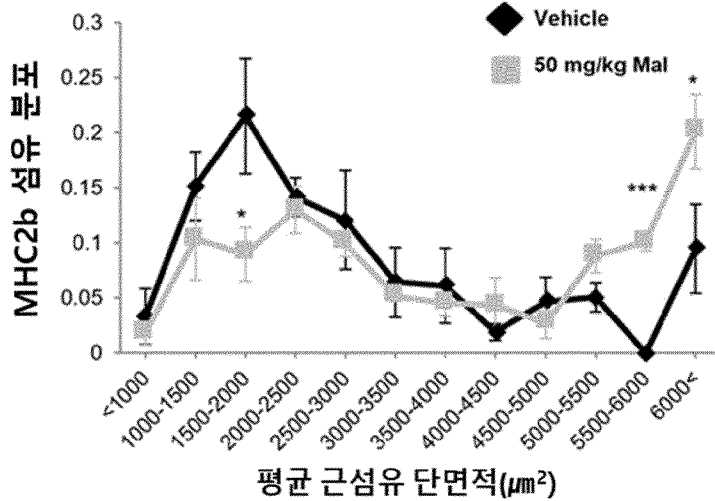
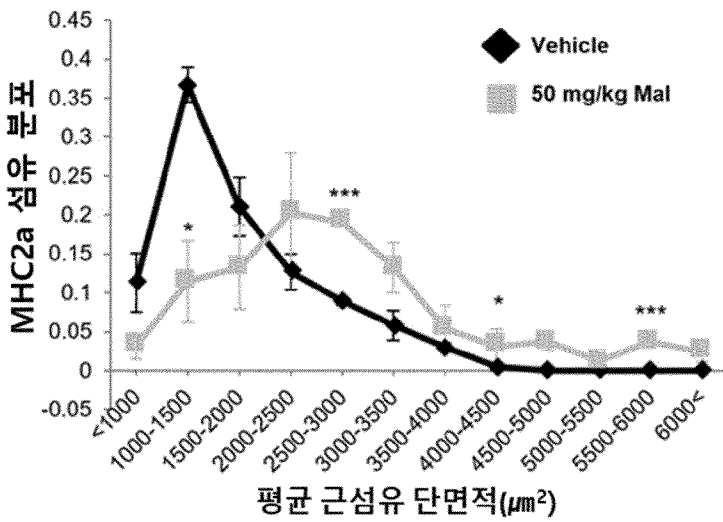
[도7j]



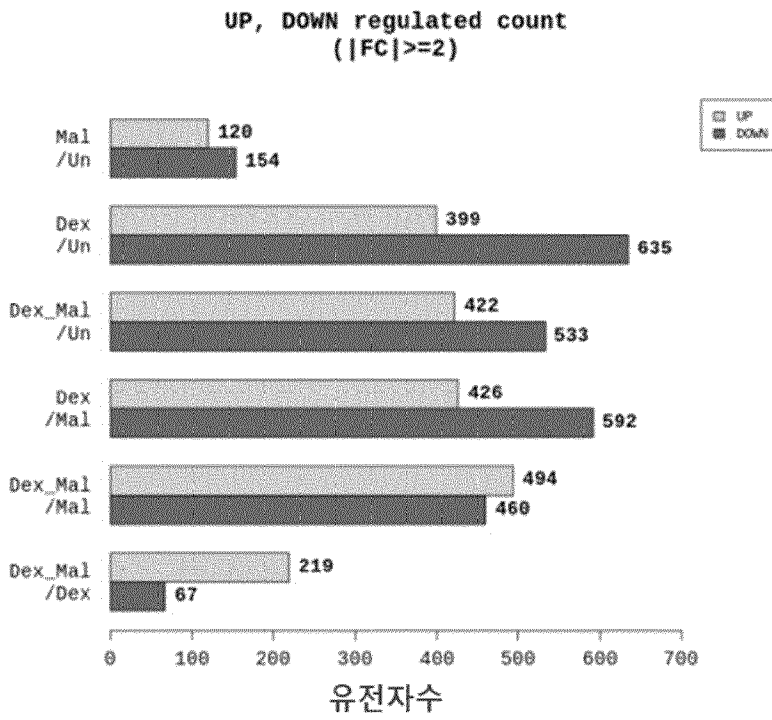
[도7k]



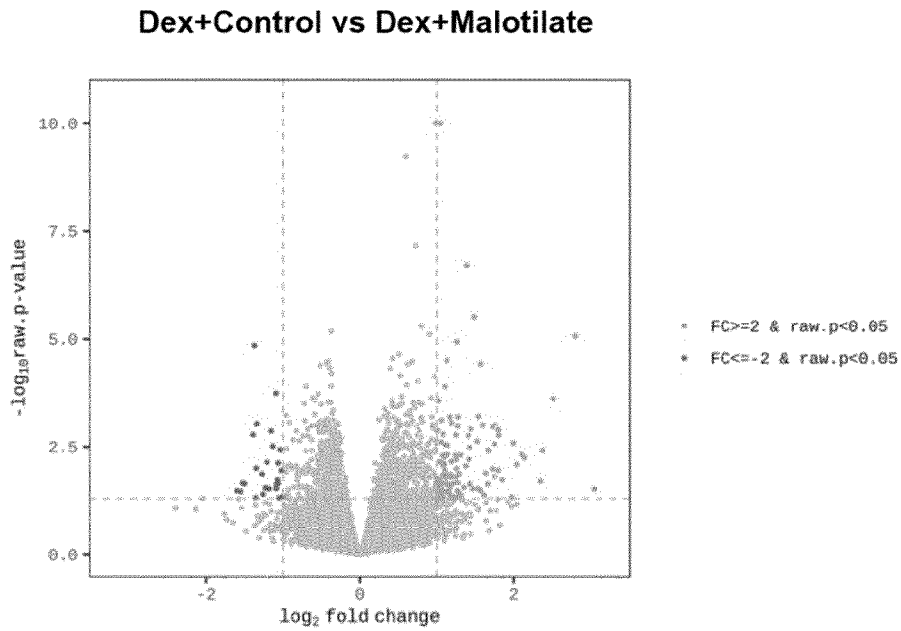
[도7l]



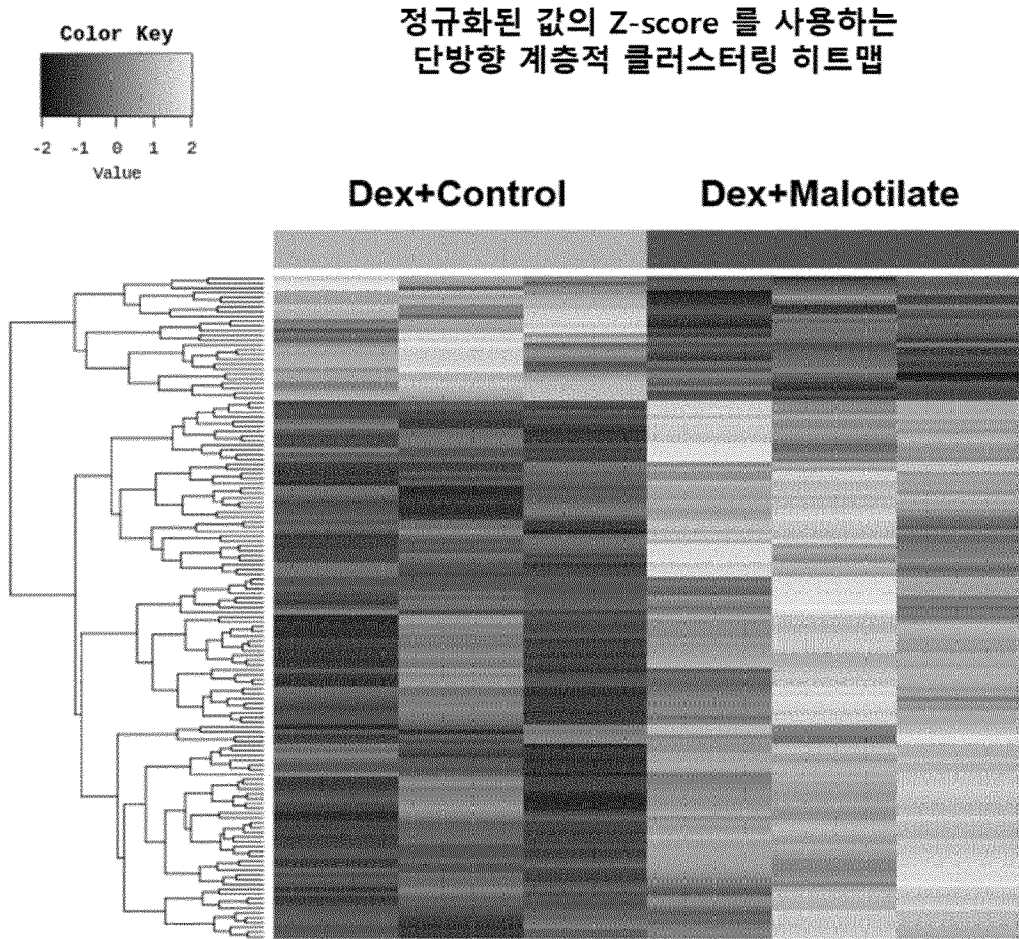
[도8a]



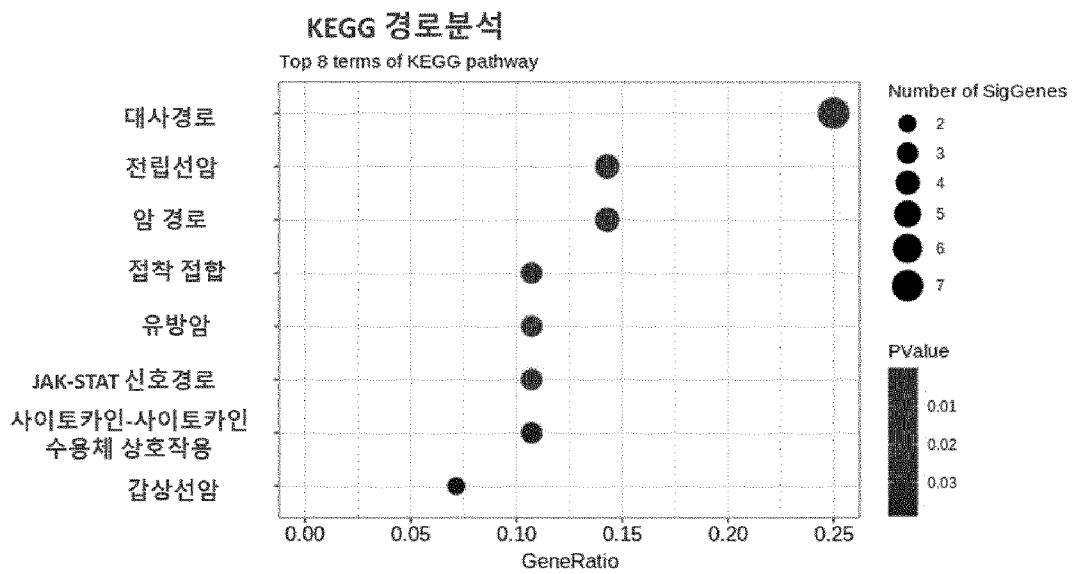
[도8b]



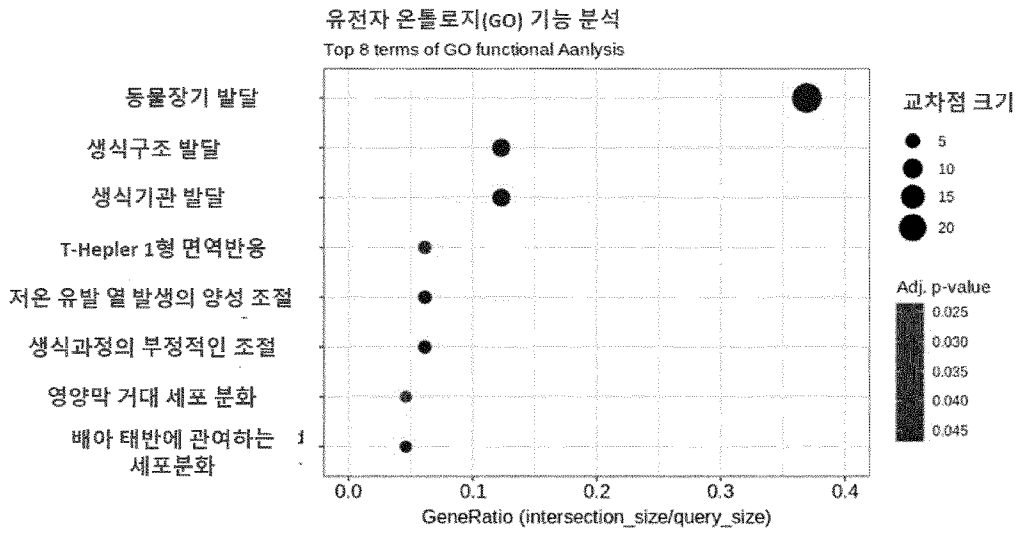
[도8c]



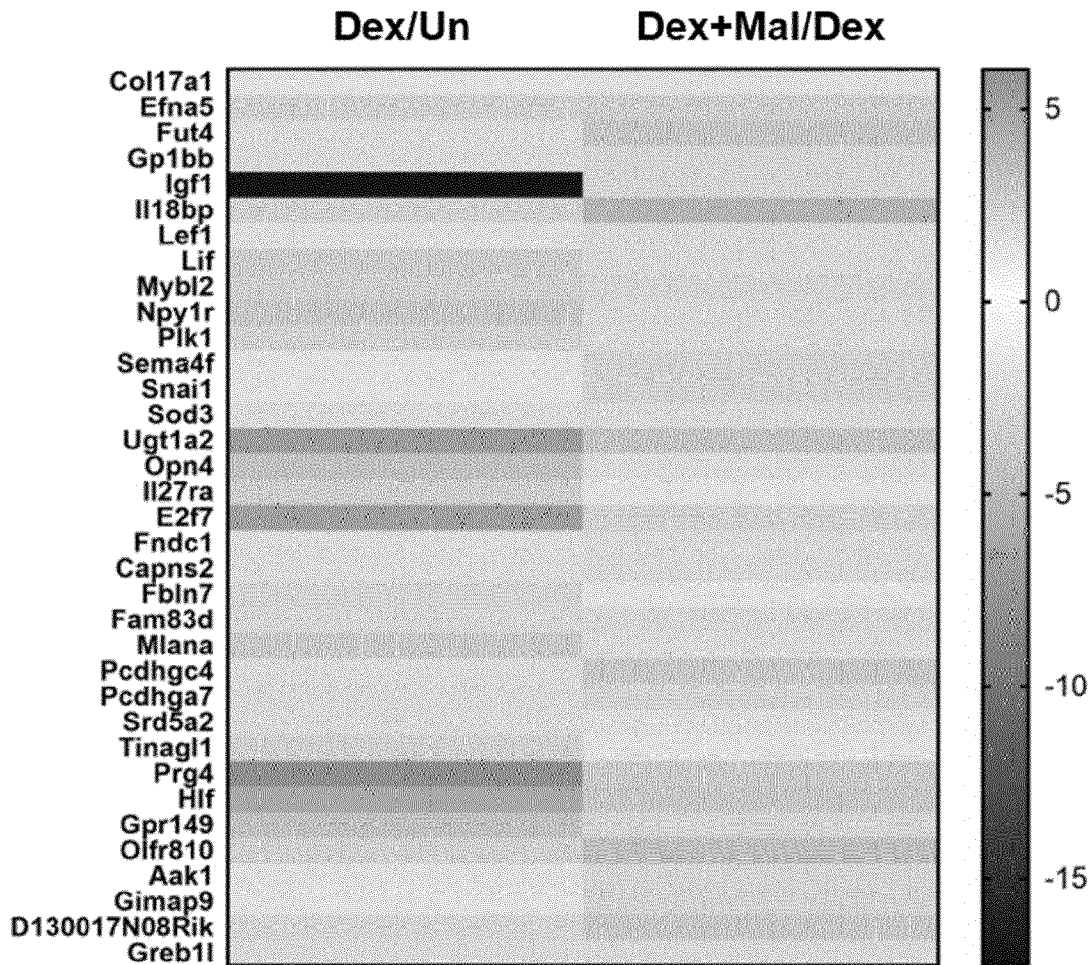
[도8d]



[도8e]



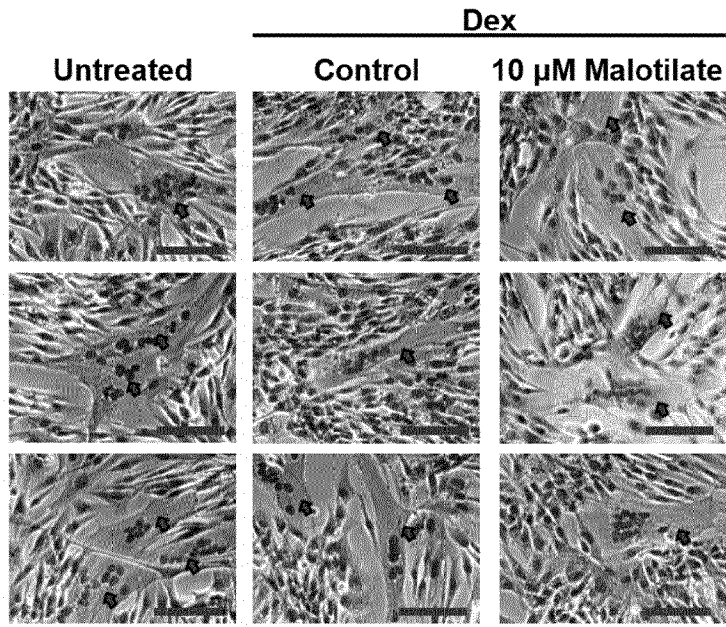
[도8f]



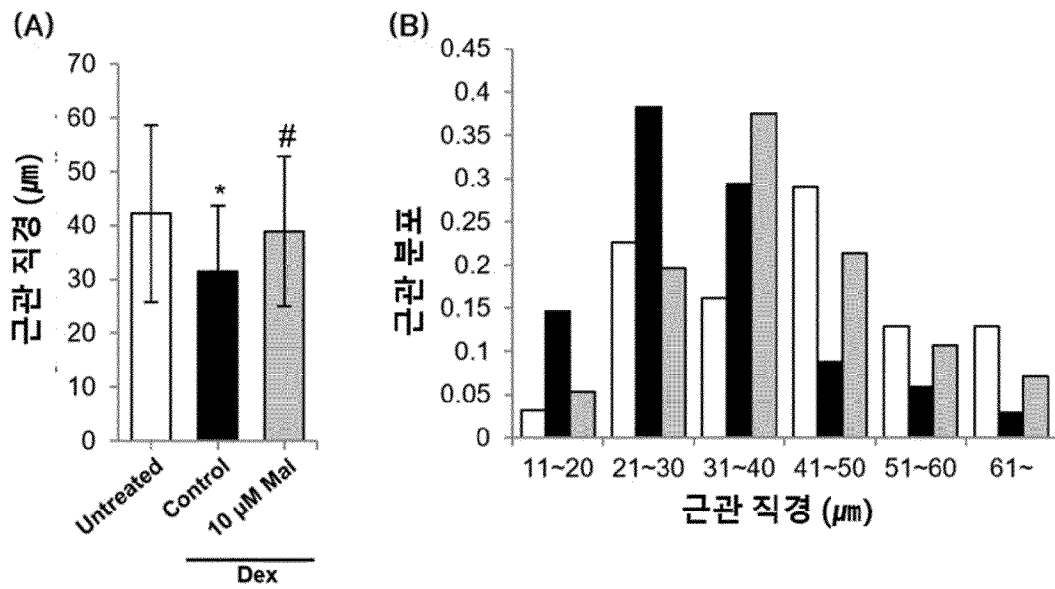
[도8g]

Gene_ID	Transcript_ID	Gene_Symbol	Description	Dex/Un	Dex+Mal/Dex
13640	NM_010109	Efna5	ephrin A5	-3.387657434	2.67166442
14345	NM_010242	Fut4	fucosyltransferase 4	-2.585502337	3.110126184
16000	NM_001111274	Igf1	insulin-like growth factor 1	-17.27002887	2.265058312
20657	NM_011435	Sod3	superoxide dismutase 3, extracellular	-2.632685712	2.010569838
18817	NM_011121	Plk1	polo like kinase 1	-3.305305622	2.010892279

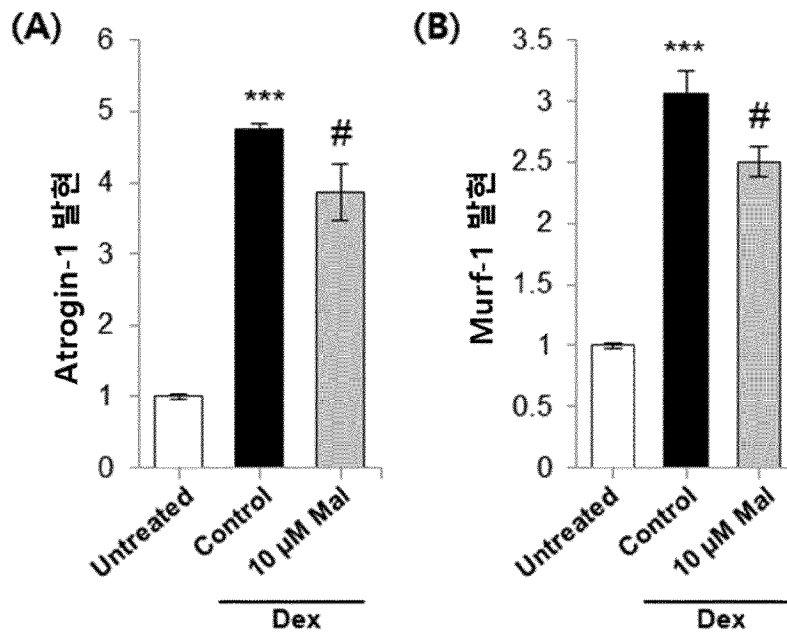
[도9a]



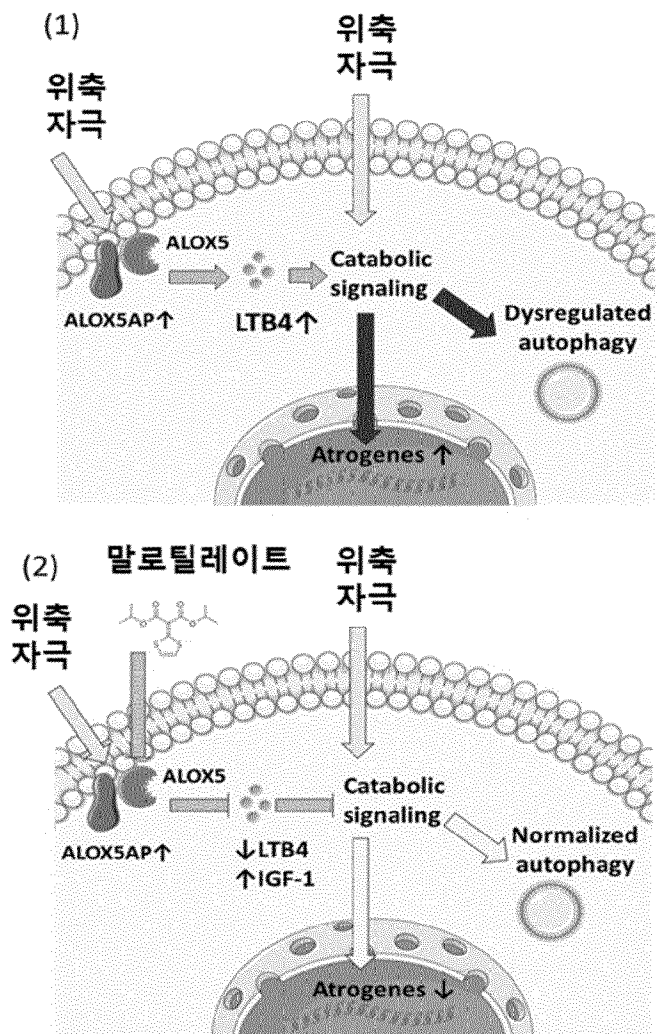
[도9b]



[도9c]



[도10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/002932

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 31/385(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61P 21/00(2006.01)i; A23L 33/10(2016.01)i; A23L 33/13(2016.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 31/385(2006.01); A61K 31/045(2006.01); A61K 31/352(2006.01); A61K 31/575(2006.01); A61K 47/26(2006.01); A61K 47/36(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: Alox5(Arachidonate 5-Lipoxygenase), 근감소증(sarcopenia), 근육(muscle), 류코트리엔 B4(leukotriene B4), 억제제(inhibitor)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GOLDMAN, S. M. et al. Evaluation of licofelone as an adjunct anti-inflammatory therapy to biologic scaffolds in the treatment of volumetric muscle loss. Cell and Tissue Research. 2021, vol. 385, pp. 149-159. See abstract; and pages 150, 153 and 157.	1-12
A	KWAK, H. J. et al. 5-LO inhibition ameliorates palmitic acid-induced ER stress, oxidative stress and insulin resistance via AMPK activation in murine myotubes. scientific reports. 2017, vol. 7, no. 5025, pp. 1-14. See abstract; and pages 2-4.	1-12
A	KR 10-2020-0143710 A (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 24 December 2020 (2020-12-24) See abstract; and claims 1 and 5.	1-12
A	KR 10-2007-0089926 A (YOO, Seo Hong) 04 September 2007 (2007-09-04) See claims 1-3, 29 and 57.	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 24 May 2023		Date of mailing of the international search report 24 May 2023
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/KR2023/002932

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2018-0059390 A (SPHERIUM BIOMED S.L.) 04 June 2018 (2018-06-04) See claims 1, 3 and 19.	1-12
<hr/>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/002932

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/002932

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2020-0143710 A	24 December 2020	AU 2019-251191 A1	29 October 2020
		CA 3096545 A1	17 October 2019
		CN 112912072 A	04 June 2021
		EP 3773543 A1	17 February 2021
		EP 3773543 A4	06 April 2022
		JP 2021-521122 A	26 August 2021
		US 2021-0059977 A1	04 March 2021
		WO 2019-199776 A1	17 October 2019
KR 10-2007-0089926 A	04 September 2007	EP 1814558 A2	08 August 2007
		EP 1814558 B1	15 December 2010
		EP 2255812 A1	01 December 2010
		JP 2008-518935 A	05 June 2008
		KR 10-1358078 B1	06 February 2014
		US 2006-0142241 A1	29 June 2006
		WO 2006-050165 A2	11 May 2006
		WO 2006-050165 A3	06 July 2006
KR 10-2018-0059390 A	04 June 2018	EP 3212177 A1	06 September 2017
		JP 2017-533956 A	16 November 2017
		US 2017-0319519 A1	09 November 2017
		WO 2016-066851 A1	06 May 2016

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/385(2006.01)i; A61K 31/713(2006.01)i; A61P 21/00(2006.01)i; A23L 33/10(2016.01)i; A23L 33/13(2016.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 31/385(2006.01); A61K 31/045(2006.01); A61K 31/352(2006.01); A61K 31/575(2006.01); A61K 47/26(2006.01); A61K 47/36(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: Alox5(Arachidonate 5-Lipoxygenase), 근감소증(sarcopenia), 근육(muscle), 류코트리엔 B4(leukotriene B4), 억제제(inhibitor)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	GOLDMAN, S. M. 등, "Evaluation of licofelone as an adjunct anti-inflammatory therapy to biologic scaffolds in the treatment of volumetric muscle loss", Cell and Tissue Research, 2021, 385권, 페이지 149-159 초록; 페이지 150, 153, 157	1-12
A	KWAK, H. J. 등, "5-LO inhibition ameliorates palmitic acid-induced ER stress, oxidative stress and insulin resistance via AMPK activation in murine myotubes", scientific reports, 2017, 7권, 5025호, 페이지 1-14 초록; 페이지 2-4	1-12
A	KR 10-2020-0143710 A (더 제너럴 하스피탈 코포레이션) 2020.12.24 요약; 청구항 1, 5	1-12
A	KR 10-2007-0089926 A (유서홍) 2007.09.04 청구항 1-3, 29, 57	1-12
A	KR 10-2018-0059390 A (스페리움 바이오메드 에스.엔.) 2018.06.04 청구항 1, 3, 19	1-12
<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 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2023년05월24일 (24.05.2023)	2023년05월24일 (24.05.2023)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	허주형	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))
 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2020-0143710 A	2020/12/24	AU 2019-251191 A1	2020/10/29
		CA 3096545 A1	2019/10/17
		CN 112912072 A	2021/06/04
		EP 3773543 A1	2021/02/17
		EP 3773543 A4	2022/04/06
		JP 2021-521122 A	2021/08/26
		US 2021-0059977 A1	2021/03/04
		WO 2019-199776 A1	2019/10/17
KR 10-2007-0089926 A	2007/09/04	EP 1814558 A2	2007/08/08
		EP 1814558 B1	2010/12/15
		EP 2255812 A1	2010/12/01
		JP 2008-518935 A	2008/06/05
		KR 10-1358078 B1	2014/02/06
		US 2006-0142241 A1	2006/06/29
		WO 2006-050165 A2	2006/05/11
		WO 2006-050165 A3	2006/07/06
KR 10-2018-0059390 A	2018/06/04	EP 3212177 A1	2017/09/06
		JP 2017-533956 A	2017/11/16
		US 2017-0319519 A1	2017/11/09
		WO 2016-066851 A1	2016/05/06