

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 11월 9일 (09.11.2017) **WIPO | PCT**

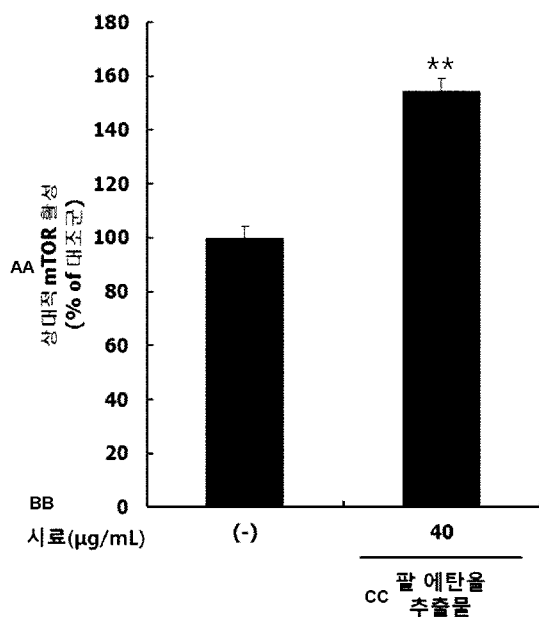


(10) 국제공개번호
WO 2017/192013 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 36/48 (2006.01) *A61K 8/97* (2006.01)
A23L 33/105 (2016.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/004701
- (22) 국제출원일: 2017년 5월 2일 (02.05.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0054290 2016년 5월 2일 (02.05.2016) KR
10-2017-0056162 2017년 5월 2일 (02.05.2017) KR
- (71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 03722 서울시 서대문구 연세로 50 (신촌동), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 황재관 (HWANG, Jae Kwan); 06544 서울시 서초구 신반포로 270, 136동 2501호 (반포동, 반포자이아파트), Seoul (KR). 이세인 (LEE, Se In); 06330 서울시 강남구 개포로 516, 707동 1101호 (개포동, 주공아파트), Seoul (KR). 김미보 (KIM, Mi Bo); 01328 서울시 도봉구 도봉로154가길 21, 401호 (도봉동, 성우스타펠리스), Seoul (KR). 김창희 (KIM, Chang Hee); 08775 서울시 관악구 신원로 26, 103동 203호 (신림동, 신림동부아파트), Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06575 서울시 서초구 사평대로 108, 3층 (반포동), Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

(54) Title: COMPOSITION FOR IMPROVING MUSCULAR FUNCTION OR FOR ENHANCING EXERCISE PERFORMANCE COMPRISING VIGNA ANGULARIS VAR. ANGULARIS

(54) 발명의 명칭: 팔을 포함하는 근 기능 개선 또는 운동수행능력 향상용 조성물



AA ... Relative mTOR activity (% of control)
BB ... Sample
CC ... Ethanol extract of *Vigna angularis* var. *angularis*

(57) Abstract: *Vigna angularis* var. *angularis* according to the present invention is capable of increasing muscle mass and enhancing muscular function or exercise performance through an effect of promoting mRNA or protein expression and the activity of a gene involved in muscle functions, muscle mass increase or differentiation of muscle cells; can prevent, treat or ameliorate a decline in exercise performance, a decline in muscle function, muscle loss, etc. caused by various diseases; and may be effectively used for medicines or food products, etc., since it has no side effects in the body as a natural substance.

(57) 요약서: 본 발명에 따른 팔은 근육의 기능, 근육량 증대 또는 근육세포의 분화에 관여하는 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 및 활성을 촉진시키는 효과를 통해서, 근육량의 증대, 근 기능 또는 운동수행능력의 향상을 가능하게 하고, 각종 질병에 의하여 유발되는 운동수행능력 저하, 근육의 기능 저하, 근육의 손실 등을 예방, 치료 또는 개선할 수 있으며, 천연물질로서 체내 부작용이 없어 의약품 또는 식품 등에 효과적으로 사용될 수 있다.



FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 팔을 포함하는 근 기능 개선 또는 운동수행능력 향상용 조성물

기술분야

- [1] 본 출원은 2016년 05월 02일 출원된 대한민국 특허출원 제10-2016-0054290호; 및 2017년 05월 02일 출원된 대한민국 특허출원 제10-2017-0056162호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.

[2]

- [3] 본 발명은 팔 추출물, 팔 유래 단백질 및 팔 유래 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 근 기능 개선 또는 운동수행능력 향상용 조성물에 관한 것이다.

[4]

배경기술

- [5] 근위축(Muscle atrophy)이란 근육량의 점진적 감소에 의하여 발생하는 것으로, 근육의 약화 및 퇴행을 일컫는다(Cell, 119(7): 907-910, 2004). 근위축은 비활동, 산화적 스트레스 또는 만성 염증 등에 의해 촉진되며 근육 기능과 운동 능력을 약화시킨다(Clinical Nutrition, 26(5): 524-534, 2007).
- [6] 이와 관련되어, 근육 기능을 결정짓는 가장 중요한 요소는 근육량이며, 이는 근육 단백질 합성과 분해의 균형에 의해 유지된다. 근위축증은 단백질 분해가 합성보다 더 일어날 때 발생한다(The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 37(10): 1985-1996, 2005).
- [7] 근육 크기는 근육 내에서 일어나는 동화작용(anabolism)이나 이화작용(catabolism)을 유도하는 세포 내 신호전달 과정(signaling pathways)에 의해 조절되며 근육 단백질의 분해보다 합성을 유도하는 신호전달 반응이 많이 일어날 경우 근육 단백질 합성이 증가 되는데, 이는 근육 단백질 증가에 따른 근육 크기 증가(hypertrophy, 근비대)나 근섬유 수 증가(hyperplasia)로 나타난다(The Korea Journal of Sports Science, 20(3): 1551-1561, 2011).
- [8] 근비대 유도 인자들은 근 세포 내에서 phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt pathway의 자극을 기점으로 다운스트림 단백질(downstream proteins)을 인산화 시킴으로써 단백질 합성을 유도한다. 이 중 PI3K/Akt 신호전달에 의한 mammalian target of rapamycin (mTOR)의 활성화는 세포 내에서 다양한 성장 신호를 통합하는 주요 성장 신호전달 기전으로 인정되고 있다. mTOR의 활성화는 두 개의 다운스트림 타겟(downstream targets)인 4E-binding protein (4EBP1)과 phosphorylated 70-kDa ribosomal S6 kinase (p70S6K)를 활성화시킴으로써 근 단백질 합성을 유도하여 근육량 증가에 기여할 수 있다(The Korea Journal of Sports Science, 20(3): 1551-1561, 2011; The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 43(9): 1267-1276, 2011).

- [9] 이와는 반대로, 전사 인자(transcription factor)인 forhead box (FoxO)가 세포질에서 핵 내로 이동하면 단백질 분해에 관여하는 E3 유비퀴틴 리가아제 인자인 아트로진-1(atrogin-1)과 MuRF-1의 발현을 증가시킨다(Disease Models & Mechanisms, 6: 25-39, 2013). 이들의 발현량이 증가하면 근육 내의 단백질 분해가 촉진되어 근육량이 줄어들게 된다. 따라서 mTOR의 활성 촉진과 atrogin-1과 MuRF-1 발현 억제는 근육 단백질의 양을 증가시켜 근육량을 증가시키게 된다.
- [10] 이 외에도, 근육세포의 분화와 근육 형성은 다양한 근육 조절 인자(muscle regulatory factors)에 의해 조절될 수 있다. 그 중, MyoD는 myogenin의 발현 유도를 통해 근원세포(myoblast)가 근관세포(myotube)되는 과정을 촉진시킨다. 이와 같은 과정을 통해 형성된 근섬유는 다발을 이루어 최종적으로 근육을 형성하게 된다(Cellular and Molecular Life Sciences, 70: 4117-4130, 2013).
- [11]
- [12] 대표적인 두류 중 하나인 팥(*Vigna angularis*)은 쌍떡잎식물 콩과(Fabaceae)의 동부속(*Vigna* spp.)에 속하는 한해살이풀로 콩 다음으로 중요한 두류작물이다. 팥은 비타민 B1이 풍부하여 쌀과 혼합하여 밥을 만들면, 쌀밥에 부족하기 쉬운 비타민을 공급하여 주며 각기병뿐만 아니라 피로회복에도 효과가 있음이 알려져 있다. 팥에 함유된 사포닌은 섬유질과 함께 변통을 돕는 효과가 있고 독을 풀고 배변을 촉진하여 장을 깨끗이 해주며, 신장병 또는 숙취 개선에도 이용된다(Korean Journal of Food Science and Technology, 42(6): 693-698, 2010). 또한, 팥은 항산화(Journal of Food Lipids 11(4): 278-286, 2004), 항당뇨(Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 68(12): 2421-2426, 2004), 항균(Phytotherapy Research 20(2): 162-164, 2006) 미백(International Journal of Molecular Sciences, 12(10): 7048-7058, 2011)등의 활성이 보고 되어있으나, 근육 기능 개선과 관련된 효능에 관하여는 보고된 바 없다.
- [13]
- [14] 이에, 본 발명자들은 식물 추출물 유래의 근위축과 같은 근육 기능 저하와 관련된 질병의 치료제를 개발하고자 노력한 결과, 팥 또는 콩과 식물의 추출물이 근육 세포에서 근단백질 합성 및 근육량 증가와 관련된 단백질의 발현 및 인산화 수준을 증가시킬 수 있으므로, 본 발명의 팥 또는 팥 추출물은 근육 질환 예방 및 치료용, 또는 근 기능 개선용 조성물의 유효성분으로 사용할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[15]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [16] 이에 본 발명자들은 근 기능 개선 또는 운동수행능력 향상 활성을 가지며 안전하게 적용될 수 있는 천연물질을 탐색한 결과, 팥에서 근 기능 개선 또는 운동수행능력 향상 활성이 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

- [17]
- [18] 따라서, 본 발명의 목적은 팥(*Vigna angularis*)의 추출물을 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상용 조성물을 제공하는 것이다.
- [19] 본 발명의 또 다른 목적은, 팥 유래 단백질 또는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상용 조성물을 제공하는 것이다.
- [20] 본 발명의 또 다른 목적은, 팥 추출물을 유효성분으로 포함하는, 근기능 개선용 조성물을 제공하는 것이다.
- [21] 본 발명의 또 다른 목적은, 팥 유래 단백질 또는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 근기능 개선용 조성물을 제공하는 것이다.

[22]

과제 해결 수단

- [23] 상기 과제를 해결하기 위한 수단으로서, 본 발명은 팥(*Vigna angularis*)의 추출물을 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상용 약학적 조성물을 제공한다.
- [24] 또한, 본 발명은 팥 유래 단백질 또는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상용 약학적 조성물을 제공한다.
- [25]
- [26] 상기 과제를 해결하기 위한 또 다른 수단으로서, 본 발명은 팥(*Vigna angularis*)의 추출물을 유효성분으로 포함하는, 근기능 개선용 조성물을 제공한다.
- [27] 또한, 본 발명은 팥 유래 단백질 또는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 근기능 개선용 조성물을 제공한다.

[28]

발명의 효과

- [29] 따라서 본 발명은 팥 추출물, 팥 유래 단백질 또는 팥 유래 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 예방 및 치료용, 근기능 개선용, 또는 운동수행능력 향상용 조성물을 제공한다.
- [30] 본 발명의 팥 추출물은 근육 세포에서 근육 기능, 근육량 조절 또는 근육 세포의 분화에 관여하는 인자들의 mRNA 전사 수준 및 단백질 활성을 촉진시켜 근육량 증대로 인한 근기능 또는 운동수행능력의 향상을 가능하게 하고, 각종 질병에 의하여 유발되는 운동수행능력의 저하, 근기능 저하, 근육 손실 등의 예방, 치료 또는 개선 효과를 나타낼 수 있다. 또한, 본 발명의 팥 추출물, 팥 유래 단백질 및 팥 유래 펩타이드는 천연물질로서 체내 부작용이 없으므로 의약품 또는 식품 등에 효과적으로 사용될 수 있다.

[31]

도면의 간단한 설명

- [32] 도 1은 L6 근육세포에서, 팥 에탄올 추출물 처리에 따른 mTOR의 활성을 측정한 결과를 보여준다.

- [33] 도 2는 L6 근육세포에서, 팔 에탄올 추출물 처리에 따른 mRNA translation 관련 생체지표 p-p70S6K와 p-4EBP1의 단백질 발현량을 측정한 결과를 보여준다.
- [34] 도 3은 L6 근육세포에서, 팔 에탄올 추출물 처리에 따른 근 단백질 분해 촉진 생체지표 MuRF-1 및 atrogin-1의 mRNA 발현량을 측정한 결과를 보여준다.
- [35] 도 4는 L6 근육세포에서, 팔 에탄올 추출물 처리에 따른 근육 분화 생체지표 MyoD와 myogenin의 mRNA 발현량을 측정한 결과를 보여준다.
- [36] 도 5는 L6 근육세포에서, 팔 열수 추출물 처리에 따른 mTOR의 활성을 측정한 결과를 보여준다.
- [37] 도 6은 L6 근육세포에서, 팔 아임계 추출물 처리에 따른 mTOR의 발현 수준을 측정한 결과를 보여준다.
- [38] 도 7은 L6 근육세포에서, 팔 단백질 및 효소 반응에 의한 팔 펩타이드 처리에 따른 mTOR의 발현 수준을 측정한 결과를 보여준다.
- [39] 도 8은 L6 근육세포에서, 팔 펩타이드 처리에 따른 mRNA translation 관련 생체지표 p-p70S6K와 p-4EBP1의 단백질 발현량을 측정한 결과를 보여준다.
- [40] 도 9는 L6 근육세포에서, 팔 펩타이드 처리에 따른 근육 분화 생체지표 MyoD와 myogenin의 mRNA 발현량을 측정한 결과를 보여준다.
- [41] 도 10은 L6 근육세포에서, 검은팔 에탄올 추출물 처리에 따른 mTOR의 활성을 측정한 결과를 보여준다.
- [42] 도 11은 COS-7 신장세포에서, 팔 에탄올 추출물 처리에 따른 PGC-1 α 의 활성을 측정한 결과를 보여준다.
- [43] 도 12는 L6 근육세포에서, 팔 에탄올 추출물 처리에 따른 미토콘드리아 생합성 생체지표 PGC-1 α , ERR α , NRF-1, Tfam의 mRNA 발현량을 측정한 결과를 보여준다.
- [44] 도 13은 L6 근육세포에서, 팔 단백질 및 효소 반응에 의한 팔 펩타이드 처리에 따른 PGC-1 α 의 활성을 측정한 결과를 보여준다.
- [45] 도 14는 L6 근육세포에서, 팔 펩타이드 처리에 따른 미토콘드리아 생합성 생체지표 PGC-1 α , ERR α , NRF-1, Tfam의 mRNA 발현량을 측정한 결과를 보여준다.
- [46] 도 15는 COS-7 신장세포에서, 검은팔 에탄올 추출물 처리에 따른 PGC-1 α 의 활성을 측정한 결과를 보여준다.
- [47] 도 16은 근위축 유도 쥐에서, 팔 에탄올 추출물 처리에 따른 근력을 측정한 결과를 보여준다.
- [48] 도 17은 근위축 유도 쥐에서, 팔 에탄올 추출물 처리에 따른 지구력을 측정한 결과를 보여준다(a: 운동시간, b: 운동거리).
- [49] 도 18은 근위축 유도 쥐에서, 팔 에탄올 추출물 처리에 따른 전경골근의 무게를 측정한 결과를 보여준다.
- [50]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[51] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[52]

[53] 본 발명은 팥(*Vigna angularis*)의 추출물을 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상용 약학적 조성물을 제공한다.

[54] 본 명세서에서 '팥(*Vigna angularis*)'은 쌍떡잎식물 콩과(Fabaceae)의 동부속(*Vigna* spp.)에 속하는 팥(*V. angularis* W.F.Wight), 검은팥(*V. angularis* var. *angularis*) 또는 그 이외의 식물들의 씨앗을 건조한 것이며, 이들을 단독으로 사용하여도 좋고, 혼합하여 사용하여도 좋다.

[55] 본 명세서에서 '팥 추출물'은 팥을 추출하여 수득한 추출물을 의미한다. 팥 추출물의 제조방법은 팥으로부터 물, C₁ 내지 C₆의 유기용매, 아임계 유체 및 초임계 유체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 용매로 팥을 추출하여 수득할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 용매는 탄소수 1 내지 6의 알코올(alcohol), 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌 클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane), 시클로헥산(cyclohexane) 및 석유에테르(petroleum ether)로 이루어진 군 중에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[56] 보다 구체적으로, 상기 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[57] 1) 팥에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[58] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및

[59] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하는 단계.

[60] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 팥은 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다.

[61] 상기 방법에 있어서, 팥 추출물의 추출 방법으로는 여과법, 열수 추출, 침지 추출, 환류냉각 추출, 초음파추출, 초고압 추출 및 아임계 추출 등 당업계의 통상적인 방법을 이용할 수 있다. 추출 방법과 관련하여, 상기 초고압 추출을 수행하는 경우 100 내지 500 Mpa의 압력으로 추출하는 것이 바람직하다.

[62] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[63]

[64] 또한, 본 발명은 팥 유래 단백질 또는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상용 약학적 조성물을 제공한다.

[65] 본 명세서에서, '팥 유래 단백질'은 하기 i) 내지 v) 단계로 이루어진 방법으로

수득할 수 있다:

- [66] i) 건조된 팔을 분쇄하고 헥산을 용매로 추출하는 단계;
- [67] ii) 상기 단계 i)에서 추출한 헥산 추출물을 제거하고, 박에 물을 가하여 pH 7.0 내지 10.0 조건에서 방치하는 단계;
- [68] iii) 상기 단계 ii)에서 방치한 용액을 원심분리하여 상등액을 수득하는 단계;
- [69] iv) 상기 단계 iii)에서 수득한 상등액을 다시 pH 2.0 내지 6.0 조건에서 방치하는 단계; 및
- [70] v) 상기 단계 iv)에서 방치한 용액을 다시 원심분리하여 침전한 침전체를 팔 유래 단백질로 수득하는 단계.
- [71] 본 명세서에서, '팔 유래 펩타이드'는 팔로부터 분리한 팔 단백질에 단백질 가수분해효소를 처리하여 수득한 것을 의미한다. 구체적으로, 팔 유래 펩타이드는 하기 i) 내지 vii) 단계로 이루어진 방법으로 수득할 수 있다:
- [72] i) 건조된 팔을 분쇄하고 헥산을 용매로 추출하는 단계;
- [73] ii) 상기 단계 i)에서 추출한 헥산 추출물을 제거하고, 박에 물을 가하여 pH 7.0 내지 10.0 조건에서 방치하는 단계;
- [74] iii) 상기 단계 ii)에서 방치한 용액을 원심분리하여 상등액을 수득하는 단계;
- [75] iv) 상기 단계 iii)에서 수득한 상등액을 다시 pH 2.0 내지 6.0 조건에서 방치하는 단계;
- [76] v) 상기 단계 iv)에서 방치한 용액을 다시 원심분리하여 침전한 침전체를 팔 유래 단백질로 수득하는 단계;
- [77] vi) 상기 단계 v)에서 수득한 팔 유래 단백질에 가수분해효소를 가하고 효소 반응한 후, 여과하여 침전물을 제거하는 단계; 및
- [78] vii) 상기 단계 vi)에서 침전물이 제거된 여과액을 동결건조하여 펩타이드를 수득하는 단계.
- [79] 본 명세서에서, 상기 '가수분해효소'는 알카라아제(Alcalase), 플라보르자임(Flavourzyme), 뉴트라아제(Neutrase), 프로타멕스(Protamex) 및 단백질가수분해효소-NP (Protease-NP)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 가수분해효소일 수 있다.
- [80]
- [81] 본 명세서에서 근육 질환은 근기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환으로 당업계에서 보고된 질병인 것이 바람직하다. 상기 근육 소모 또는 퇴화는 유전적 요인, 후천적 요인, 노화 등을 원인으로 발생하며, 근육 소모는 근육량의 점진적 손실, 근육, 특히 골격근 또는 수의근 및 심장근육의 약화 및 퇴행을 특징으로 한다. 이와 관련된 질환의 예로는 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육 퇴화, 근무력증, 악액질(cachexia) 및 근육감소증(sarcopenia) 등을 들 수 있다. 본 발명의 조성물은 근육량 증대 효과가 있으며, 근육은 그 종류를 제한하지 않는다.
- [82] 본 명세서에서, '근'은 심줄, 근육, 건을 포괄적으로 지칭하고, '근 기능' 또는

'근육 기능'은 근육의 수축에 의해 힘을 발휘할 수 있는 능력을 의미하며, 근육이 저항을 이겨내기 위하여 최대한의 수축력을 발휘할 수 있는 근력; 근육이 주어진 중량에 얼마나 오랫동안 또는 얼마나 여러 번 수축과 이완을 반복할 수 있는지 나타내는 능력인 근 지구력; 및 단시간 내에 강한 힘을 발휘하는 능력인 순발력을 포함한다. 상기 근 기능은 근육량에 비례하며, 용어 '근 기능 개선'은 근 기능을 보다 긍정적인 방향으로 향상시키는 것을 의미한다.

- [83] 본 명세서에서, '운동수행능력'은 일상생활이나 스포츠에서 볼 수 있는 신체동작을 외형적으로 달리기, 뛰기, 던지기, 헤엄치기 등으로 구분할 때, 상기 동작을 빠르게, 강하게, 정확하게, 오래, 능숙하게 할 수 있는 정도를 나타내는 것으로, 운동수행능력은 근력, 민첩성 및 지구력 등의 인자로 규정된다. 용어 '운동수행능력 향상'은 운동수행능력을 개선하거나 향상시키는 것을 말한다.
- [84] 본 발명의 조성물이 운동수행능력 향상용 약학적 조성물인 경우, 운동능력의 퇴화로 인한 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 이와 관련된 질환의 예로는 퇴행성 질환, 미토콘드리아 이상 질환, 지구력 저하증, 순발력 저하증, 무기력증, 근육 폐기 및 우울증 등을 들 수 있다. 본 발명의 조성물은 운동수행능력 향상 효과가 있으며, 운동의 형태 및 종류를 제한하지 않는다.
- [85]
- [86] 본 발명의 근 기능 개선용 약학적 조성물인 경우, 근육 소모 또는 퇴화로 인한 근육 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 근육 소모 및 퇴화는 유전적 요인, 후천적 요인, 노화 등을 원인으로 발생하며, 근육 소모는 근육량의 점진적 손실, 근육, 특히 골격근 또는 수의근 및 심장근육의 약화 및 퇴행을 특징으로 한다. 이와 관련된 질환의 예로는 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육 퇴화, 근무력증, 악액질(cachexia) 및 근육감소증(sarcopenia) 등을 들 수 있다. 본 발명의 조성물은 근육량 증대 효과가 있으며, 근육은 그 종류를 제한하지 않는다.
- [87] 본 발명의 운동수행능력 향상용 약학적 조성물인 경우, 운동능력 퇴화로 인한 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 이와 관련된 질환의 예로는 미토콘드리아 이상 질환, 지구력 저하증, 순발력 저하증, 무기력증, 근육 폐기 및 우울증 등을 들 수 있다. 본 발명의 조성물은 운동수행능력 향상 효과가 있으며, 운동의 형태 및 종류를 제한하지 않는다.
- [88]
- [89] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 또한 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등을 포함할 수 있다. 또한, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는

아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

- [90] 본 발명의 약학적 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들어, 경구 또는 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구적인 투여방법으로는 이에 제한되는 것은 아니나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여될 수 있다.
- [91] 본 발명의 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화 할 수 있다. 제형화할 경우에는 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS), 항산화제, 정균제, 킬레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 충전제, 증량제, 결합제, 아췌반트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제 습윤제, 붕해제 또는 계면활성제, 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [92] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 액제, 젤제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 또는 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분(옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분 등 포함), 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 덱스트로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 말티톨, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로즈 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 예컨대, 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다.
- [93] 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물 또는 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 또는 보존제 등이 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 붕해제로 첨가할 수 있으며, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [94] 비경구적으로 투여하는 경우 본 발명의 약학적 조성물은 적합한 비경구용 담체와 함께 주사제, 경피 투여제 및 비강 흡입제의 형태로 당 업계에 공지된 방법에 따라 제형화될 수 있다. 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물

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

- [95] 경피 투여제의 경우 연고제, 크림제, 로션제, 젤제, 외용액제, 파스타제, 리니먼트제, 에어로졸제 등의 형태가 포함된다. 상기에서 '경피 투여'는 약학적 조성물을 국소적으로 피부에 투여하여 약학적 조성물에 함유된 유효한 양의 활성성분이 피부 내로 전달되는 것을 의미한다.
- [96] 흡입 투여제의 경우, 본 발명에 따라 사용되는 화합물은 적합한 추진제, 예를 들면, 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체를 사용하여, 가압 팩 또는 연무기로부터 에어로졸 스프레이 형태로 편리하게 전달할 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투약 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공하여 결정할 수 있다. 예를 들면, 흡입기 또는 취입기에 사용되는 젤라틴 캡슐 및 카트리지는 화합물, 및 락토즈 또는 전분과 같은 적합한 분말 기체의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화할 수 있다. 비경구 투여용 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042, Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기재되어 있다.
- [97]
- [98] 본 발명의 약학적 조성물은 팔 추출물, 팔 단백질 또는 팔 펩타이드를 유효량으로 포함할 때 바람직한 근 기능 개선 효과 또는 운동수행능력 증강 효과를 제공할 수 있다. 본 명세서에서, '유효량'이라 함은 음성 대조군에 비해 그 이상의 반응을 나타내는 양을 말하며 바람직하게는 근 기능을 향상시키거나 운동수행능력을 향상하기에 충분한 양을 말한다. 본 발명의 약학적 조성물에 팔 추출물, 팔 단백질 또는 팔 펩타이드가 0.01 내지 99.99% 포함될 수 있으며, 잔량은 약학적으로 허용 가능한 담체가 차지할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 팔 추출물, 팔 단백질 또는 팔 펩타이드의 유효량은 조성물이 제품화되는 형태 등에 따라 달라질 것이다.
- [99] 본 발명의 약학적 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 비경구 투여시는 상기 팔 추출물, 팔 단백질 또는 팔 펩타이드를 기준으로 하루에 체중 1

kg당 바람직하게 0.01 내지 50 mg, 더 바람직하게는 0.1 내지 30 mg의 양으로 투여되도록, 그리고 경구 투여시는 팔 추출물, 팔 단백질 또는 팔 펩타이드를 기준으로 하루에 체중 1 kg당 바람직하게 0.01 내지 100 mg, 더 바람직하게는 0.01 내지 10 mg의 양으로 투여되도록 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 그러나 상기 팔 추출물, 팔 단백질 또는 팔 펩타이드의 용량은 약학적 조성물의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설을 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 팔 추출물, 팔 단백질 또는 팔 펩타이드를 근 기능 개선 또는 운동수행능력 증강을 위한 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

[100] 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 또는 생물학적 반응조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[101]

[102] 본 발명의 약학적 조성물은 또한 팔 추출물, 팔 단백질 또는 팔 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 외용제의 제형으로 제공할 수 있다.

[103] 본 발명의 약학적 조성물을 피부외용제로 사용하는 경우, 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 유화제, 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 활성제, 친유성 활성제 또는 지질 소낭 등 피부 외용제에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 피부 과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 또한 상기 성분들은 피부 과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.

[104] 본 발명의 약학적 조성물이 피부 외용제로 제공될 경우, 이에 제한되는 것은 아니나, 연고, 패취, 겔, 크림 또는 분무제 등의 제형일 수 있다.

[105]

[106] 또한, 본 발명의 근기능 개선 또는 운동수행능력 향상용 식품 조성물을 제공한다.

[107] 본 발명의 식품 조성물이 근 기능 개선용 식품 조성물인 경우, 근기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환으로 당업계에 보고된 질병의 예방 또는 개선에 사용될 수 있다. 상기 근육 소모 또는 퇴화는 유전적 요인, 후천적 요인, 노화 등을 원인으로 발생하며, 근육 소모는 근육량의 점진적 손실, 근육, 특히 골격근 또는 수의근 및 심장근육의 약화 및 퇴행을 특징으로 한다. 이와 관련된 질환의 예로는 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육 퇴화, 근무력증, 악액질(cachexia) 및

근육감소증(sarcopenia) 등을 들 수 있다. 본 발명의 조성물은 근육량 증대 효과가 있으며, 근육은 그 종류를 제한하지 않는다. 상기 근 기능은 근육량에 비례하며, 용어 '근 기능 개선'은 근 기능을 보다 긍정적인 방향으로 향상시키는 것을 의미한다.

[108] 본 발명의 식품 조성물이 운동수행능력 향상용 식품 조성물인 경우, 운동능력의 퇴화로 인한 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 이와 관련된 질환의 예로는 퇴행성 질환, 미토콘드리아 이상 질환, 지구력 저하증, 순발력 저하증, 무기력증, 근육 폐기 및 우울증 등을 들 수 있다. 본 발명의 조성물은 운동수행능력 향상 효과가 있으며, 운동의 형태 및 종류를 제한하지 않는다.

[109]

[110] 본 발명의 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food), 식품 첨가제(food additives) 및 사료 등의 모든 형태를 포함하며, 인간 또는 가축을 비롯한 동물을 취식대상으로 한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당 업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.

[111] 상기 유형의 식품 조성물은 당 업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다. 일반 식품으로는 이에 한정되지 않지만 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지 콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게이트, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 옛, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물 유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 상기 팔 추출물 및 팔 펩타이드를 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 영양보조제로는 이에 한정되지 않지만 캡슐, 타블렛, 환 등에 팔 추출물, 팔 단백질 또는 팔 펩타이드를 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 건강기능식품으로는 이에 한정되지 않지만 예를 들면, 상기 팔 추출물 자체를 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용(건강음료)할 수 있도록 액상화, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 상기 팔 추출물, 팔 단백질 또는 팔 펩타이드를 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다. 또한, 상기 팔 추출물, 팔 단백질 또는 팔 펩타이드와 근 기능 개선 또는 운동수행능력 향상 효과가 있다고 알려진 공지의 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다.

[112] 본 발명의 근 기능 개선 또는 운동수행능력 향상용 조성물이 건강음료 조성물로 이용되는 경우, 상기 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드; 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아

추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

- [113] 팔 추출물, 팔 단백질 또는 팔 펩타이드를 는 근 기능 개선 또는 운동수행능력 향상용 식품 조성물의 유효성분으로 함유될 수 있는데, 그 양은 근 기능 개선 또는 운동수행능력 향상용 작용을 달성하기에 유효한 양으로 특별히 한정되는 것은 아니나, 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%인 것이 바람직하다. 본 발명의 식품 조성물은 팔 추출물과 함께 근 기능 개선 또는 운동수행능력 향상용 조성물에 효과가 있는 것으로 알려진 다른 활성 성분과 함께 혼합하여 제조될 수 있다.

- [114] 상기 외에 본 발명의 건강식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[115]

발명의 실시를 위한 형태

- [116] 이하 본 발명을 실시예, 실험예 및 제조예를 통하여 보다 상세하게 설명한다.

- [117] 단, 하기 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 실험예 및 제조예에 한정되는 것은 아니다.

[118]

[119]

- [120] [실시예 1] 팔 추출물의 제조

- [121] <1-1> 팔의 메탄올 추출물 제조

- [122] 건조된 팔(*Vigna angularis* W.F.Wight)을 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 팔 분말 100 g을 100% 메탄올 1 L에 침지하여 24 시간 동안 상온에 방치한 후 추출액을 수득하는 과정을 3회 반복하였다. 수득한 추출액을 와트만(Whatman) 2번 여과지로 감압 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매 성분을 제거한 팔 메탄올 추출물을 수득하였다.

[123]

- [124] <1-2> 팔의 에탄올 추출물 제조

- [125] 건조된 팔(*V. angularis* W.F.Wight)을 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 팔 분말 100 g을 100%, 70%, 50% 또는 30% 에탄올 1 L에 침지하여 24 시간 동안 상온에 방치한 후 추출액을 수득하는 과정을 3회 반복하였다. 수득한 추출액을 와트만

2번 여과지로 감압 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매 성분을 제거한 팔 에탄올 추출물을 수득하였다.

[126]

[127] <1-3> 팔의 에틸아세테이트 추출물 제조

[128] 건조된 팔(*V. angularis* W.F.Wight)을 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 팔 분말 100 g을 100% 에틸아세테이트 1 L에 침지하여 24 시간 동안 상온에 방치한 후 추출액을 수득하는 과정을 3회 반복하였다. 수득한 추출액을 와트만 2번 여과지로 감압 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매 성분을 제거한 팔 에틸아세테이트 추출물을 수득하였다.

[129]

[130] <1-4> 팔의 헥산 추출물 제조

[131] 건조된 팔(*V. angularis* W.F.Wight)을 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 팔 분말 100 g을 100% 헥산 1 L에 침지하여 24 시간 동안 상온에 방치한 후 추출액을 수득하는 과정을 3회 반복하였다. 수득한 추출액을 와트만 2번 여과지로 감압 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매 성분을 제거한 팔 헥산 추출물을 수득하였다.

[132]

[133] <1-5> 팔의 열수 추출물 제조

[134] 건조된 팔(*V. angularis* W.F.Wight)을 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 팔 분말 100 g을 물 1 L에 넣고 80°C에서 2 시간 교반하여 추출액을 수득하였다. 수득한 추출액을 와트만 2번 여과지로 감압 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매 성분을 제거한 팔 열수 추출물을 수득하였다.

[135]

[136] <1-6> 팔 초고압 추출물의 제조

[137] 건조된 팔(*V. angularis* W.F.Wight)을 믹서로 분쇄한 다음, 18% 에탄올 76 mL을 폴리에틸렌(polyethylene) 팩에 넣고 밀봉한 후 초고압 추출장치(Frescal MFP-7000; Mitsubishi Heavy Industries, Tokyo, Japan)를 이용하여 추출하였다. 초고압 추출 조건으로서 추출압력을 320 MPa, 추출시간은 5 분으로 설정하였다. 추출된 시료는 와트만 2번 여과지로 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거함으로써 팔 초고압 추출물을 얻었다.

[138]

[139] <1-7> 팔 아임계 추출물의 제조

[140] 건조된 팔(*V. angularis* W.F.Wight)을 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 팔 50 g을 1 L 물과 함께 아임계 추출장치(Biovan, Gyeonggi, Korea)의 아임계수 반응기에 넣고 밀폐하였다. 밀폐 후, 반응기의 온도를 200°C까지 상승시켰으며, 반응기의 온도가 200°C에 도달하면 상기 온도를 20 분간 유지하여 추출을 하였다. 20 분 후, 추출물을 냉각수가 공급되는 저장탱크로 이송하여 30°C까지 급속 냉각시킨 후, 부유 잔사를 분리하기 위해 3,600 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 상등액만

취하였다. 동결건조기(ilShin Lab Co. Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 용매를 전부 제거함으로써 팔 아임계 추출물을 얻었다.

[141]

[142] **[실시예 2] 팔 유래 단백질 및 펩타이드의 분리**

[143] **<2-1> 팔 유래 단백질의 분리**

[144] 건조된 팔(*V. angularis* W.F.Wight)을 분쇄한 다음, 분쇄한 팔 시료 1 kg을 1 L 헥산에 넣고 상온에서 4시간 교반하면서 추출하였다. 헥산 추출물을 제거한 뒤, 남은 박에 물을 넣고 pH 9, 25에서 30분간 방치하였다. 6,000 rpm에서 30 분간 원심분리하여 상등액 취하고, 상등액을 pH 4.5, 25의 조건에서 30 분간 다시 방치하였다. 6,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 침전된 단백질을 수득하였으며, 침전된 단백질을 물에 녹이고 중성화과정을 거쳐 동결건조기(ilShin Lab Co. Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 물을 전부 제거함으로써 분리한 팔 단백질을 수득하였다.

[145]

[146] **<2-2> 알카라아제(Alcalase) 처리에 따른 팔 펩타이드 제조**

[147] 실시예 <2-1>에서 수득한 팔 단백질에 단백질 분해효소인 1% 알카라아제(Novozymes, Bagsvaerd, Denmark)를 가하고 50에서 6시간 동안 효소반응을 시켰다. 6 시간 후에, 90에서 20 분간 효소를 불활성화시키고 와트만 2번 여과지로 여과하여 침전물을 제거하였다. 여과된 액체를 동결건조기(ilShin Lab Co. Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 물을 전부 제거함으로써 알카라아제 처리에 의한 팔 펩타이드를 수득하였다.

[148]

[149] **<2-3> 플라보르자임(Flavourzyme) 처리에 따른 팔 펩타이드 제조**

[150] 상기 실시예 <2-2>에서와 동일한 방법으로 알카라아제 대신 플라보르자임(Novozymes)을 처리하여 플라보르지임 처리에 의한 팔 펩타이드를 수득하였다.

[151]

[152] **<2-4> 뉴트라제(Neutrase) 처리에 따른 팔 펩타이드 제조**

[153] 상기 실시예 <2-2>에서와 동일한 방법으로 알카라아제 대신 뉴트라제(Novozymes)을 처리하여 뉴트라제 처리에 의한 팔 펩타이드를 수득하였다.

[154]

[155] **<2-5> 프로타멕스(Protamex) 처리에 따른 팔 펩타이드 제조**

[156] 상기 실시예 <2-2>에서와 동일한 방법으로 알카라아제 대신 프로타멕스(Novozymes)를 처리하여 프로타멕스 처리에 의한 팔 펩타이드를 수득하였다.

[157]

[158] **<2-6> 프로테아제-NP(Protease-NP) 처리에 따른 팔 펩타이드 제조**

[159] 상기 실시예 <2-2>에서와 동일한 방법으로 알카라아제 대신 프로테아제-NP(Bioland, Asan, Korea)를 처리하여 프로테아제-NP 처리에 의한 팔 펩타이드를 수득하였다.

[160]

[161] **[실시예 3] 검은팥 추출물의 제조**

[162] **<3-1> 검은팥의 메탄올 추출물 제조**

[163] 건조된 검은팥(*V. angularis* var. *angularis*)을 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 검은팥 분말 100 g을 100% 메탄올 1 L에 침지하여 24 시간 동안 상온에 방치한 후 추출액을 수득하는 과정을 3회 반복하였다. 수득한 추출액을 와트만(Whatman) 2번 여과지로 감압 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매 성분을 제거한 검은팥 메탄올 추출물을 수득하였다.

[164]

[165] **<3-2> 검은팥의 에탄올 추출물 제조**

[166] 건조된 검은팥(*V. angularis* var. *angularis*)을 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 검은팥 분말 100 g을 100%, 70%, 50% 또는 30% 에탄올 1 L에 침지하여 24 시간 동안 상온에 방치한 후 추출액을 수득하는 과정을 3회 반복하였다. 수득한 추출액을 와트만 2번 여과지로 감압 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매 성분을 제거한 검은팥 에탄올 추출물을 수득하였다.

[167]

[168] **<3-3> 검은팥의 에틸아세테이트 추출물 제조**

[169] 건조된 검은팥(*V. angularis* var. *angularis*)을 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 검은팥 분말 100 g을 100% 에틸아세테이트 1 L에 침지하여 24 시간 동안 상온에 방치한 후 추출액을 수득하는 과정을 3회 반복하였다. 수득한 추출액을 와트만 2번 여과지로 감압 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매 성분을 제거한 검은팥 에틸아세테이트 추출물을 수득하였다.

[170]

[171] **<3-4> 검은팥의 헥산 추출물 제조**

[172] 건조된 검은팥(*V. angularis* var. *angularis*)을 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 검은팥 분말 100 g을 100% 헥산 1 L에 침지하여 24 시간 동안 상온에 방치한 후 추출액을 수득하는 과정을 3회 반복하였다. 수득한 추출액을 와트만 2번 여과지로 감압 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매 성분을 제거한 검은팥 헥산 추출물을 수득하였다.

[173]

[174] **<3-5> 검은팥의 열수 추출물 제조**

[175] 건조된 검은팥(*V. angularis* var. *angularis*)을 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 검은팥 분말 100 g을 물 1 L에 넣고 80°C에서 2 시간 교반하여 추출액을 수득하였다. 수득한 추출액을 와트만 2번 여과지로 감압 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매 성분을 제거한 검은팥 열수 추출물을 수득하였다.

[176]

[177] **<3-6> 검은팥 초고압 추출물의 제조**

[178] 건조된 검은팥(*V. angularis* var. *angularis*)을 믹서로 분쇄한 다음, 18% 에탄올 76

mL을 폴리에틸렌(polyethylene) 팩에 넣고 밀봉한 후 초고압 추출장치(Frescal MFP-7000; Mitsubishi Heavy Industries, Tokyo, Japan)를 이용하여 추출하였다. 초고압 추출 조건으로서 추출압력을 320 MPa, 추출시간은 5 분으로 설정하였다. 추출된 시료는 와트만 2번 여과지로 여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거함으로써 검은팔 초고압 추출물을 얻었다.

[179]

[180] <3-7> 검은팔 아임계 추출물의 제조

[181] 건조된 검은팔(*V. angularis* var. *angularis*)을 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 검은팔 50 g을 1 L 물과 함께 아임계 추출장치(Biovan, Gyeonggi, Korea)의 아임계수 반응기에 넣고 밀폐하였다. 밀폐 후, 반응기의 온도를 200°C까지 상승시켰으며, 반응기의 온도가 200°C에 도달하면 상기 온도를 20 분간 유지하여 추출을 하였다. 20 분 후, 추출물을 냉각수가 공급되는 저장탱크로 이송하여 30°C까지 급속 냉각시킨 후, 부유 잔사를 분리하기 위해 3,600 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 상등액만 취하였다. 동결건조기(ilShin Lab Co. Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 용매를 전부 제거함으로써 검은팔 아임계 추출물을 얻었다.

[182]

[183] [실시예 4] 검은팔 유래 단백질 및 펩타이드의 분리

[184] <4-1> 검은팔 유래 단백질의 분리

[185] 건조된 검은팔(*V. angularis* var. *angularis*)을 분쇄한 다음, 분쇄한 검은팔 시료 1 kg을 1 L 헥산에 넣고 상온에서 4시간 교반하면서 추출하였다. 헥산 추출물을 제거한 뒤, 남은 박에 물을 넣고 pH 9, 25에서 30분간 방치하였다. 6,000 rpm에서 30 분간 원심분리하여 상등액 취하고, 상등액을 pH 4.5, 25의 조건에서 30 분간 다시 방치하였다. 6,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 침전된 단백질을 수득하였으며, 침전된 단백질을 물에 녹이고 중성화과정을 거쳐 동결건조기(ilShin Lab Co. Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 물을 전부 제거함으로써 분리한 검은팔 단백질을 수득하였다.

[186]

[187] <4-2> 알카라아제(Alcalase) 처리에 따른 검은팔 펩타이드 제조

[188] 실시예 <4-1>에서 수득한 검은팔 단백질에 단백질 분해효소인 1% 알카라아제(Novozymes, Bagsvaerd, Denmark)를 가하고 50에서 6시간 동안 효소반응을 시켰다. 6 시간 후에, 90에서 20 분간 효소를 불활성화시키고 와트만 2번 여과지로 여과하여 침전물을 제거하였다. 여과된 액체를 동결건조기(ilShin Lab Co. Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 물을 전부 제거함으로써 알카라아제 처리에 의한 검은팔 펩타이드를 수득하였다.

[189]

[190] <4-3> 플라보르자임(Flavourzyme) 처리에 따른 검은팔 펩타이드 제조

[191] 상기 실시예 <4-2>에서와 동일한 방법으로 알카라아제 대신 플라보르자임(Novozymes)을 처리하여 플라보르자임 처리에 의한 검은팔 펩타이드를

수득하였다.

[192]

[193] <4-4> 뉴트라제(Neutrase) 처리에 따른 검은팔 펩타이드 제조

[194] 상기 실시예 <4-2>에서와 동일한 방법으로 알카라아제 대신 뉴트라제(Novozymes)을 처리하여 뉴트라제 처리에 의한 검은팔 펩타이드를 수득하였다.

[195]

[196] <4-5> 프로타멕스(Protamex) 처리에 따른 검은팔 펩타이드 제조

[197] 상기 실시예 <4-2>에서와 동일한 방법으로 알카라아제 대신 프로타멕스(Novozymes)를 처리하여 프로타멕스 처리에 의한 검은팔 펩타이드를 수득하였다.

[198]

[199] <4-6> 프로테아제-NP(Protease-NP) 처리에 따른 검은팔 펩타이드 제조

[200] 상기 실시예 <4-2>에서와 동일한 방법으로 알카라아제 대신 프로테아제-NP(Bioland, Chaonan, Korea)를 처리하여 프로테아제-NP 처리에 의한 검은팔 펩타이드를 수득하였다.

[201]

[202] [실험예 1] 팔 에탄올 추출물의 근육 생성 활성 확인

[203] mTOR 단백질은 인산화되어 활성화되었을 때, 근 세포 내의 PI3K/Akt 신호전달경로에서 근단백질 합성 및 근육량 증가에 관여하는 단백질의 활성화를 유도할 수 있음이 알려져 있다. 이에, 팔 에탄올 추출물의 근육 생성 유도 활성을 확인하기 위해, mTOR Sandwich ELISA kit (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 이용하여 mTOR의 활성을 확인하였다.

[204] 근육모세포주인 L6 세포(ATCC; Manassas, VA, USA)를 10% 우태아혈청(FBS; Hyclone, Logan, UT, USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM; Hyclone)와 함께 6-웰 플레이트에 1×10^5 cell/mL이 되도록 접종 후 24 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 웰에 있는 배지를 제거하고 2% 말 혈청(HS; Hyclone)이 함유된 DMEM (Hyclone)로 교환하여 6일간 추가 배양하여 L6 세포를 근관세포(myotube)로 분화시켰다. 그런 다음, 상기 실시예 <1-2>에서 100% 에탄올로 제조한 팔 에탄올 추출물을 40 μ g/mL의 농도로 세포에 처리하고 12 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세포 용해 완충용액(cell lysis buffer)를 처리하여 세포를 용해시켰다. 수득한 세포 용해물 내 단백질을 브래드포드(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) 법으로 정량한 다음, 1 mg/mL 농도로 정량하여 항-mTOR 항체가 부착된 마이크로웰에 세포 용해물을 50 μ L씩 분주하여 37°C에서 2 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세척 완충용액(Washing buffer)으로 총 4회 씻은 후, 확인용 항체(detection antibody)를 처리하고 37°C에서 1시간 배양했으며, 다시 세척 완충용액으로 총 4회 씻은 후, 겨자무 과산화효소(horseradish peroxidase, HRP)가 접합된 2차 항체를 넣고 37°C에서 30 분 동안 배양하였다. 마지막으로 세척 완충용액으로 총 4회 씻은 후, TMB 기질을

각 웰에 넣고 37 에서 10 분 동안 배양하고 정지 완충용액(stop solution)을 가하여 TBM의 반응을 멈추었다. 2 분 뒤, 450 nm의 파장으로 흡광도를 측정하여 팔 에탄올 추출물을 처리한 근관 세포 내 mTOR 수준을 측정하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

- [205] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 팔 에탄올 추출물의 처리에 의해 L6 근육세포에서 mTOR의 활성이 유의적(** $p < 0.01$)으로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이는 본 발명의 팔 에탄올 추출물이 근육세포 내에서 근육 생성을 증가시키는 능력이 우수하다는 것을 의미한다.

[206]

- [207] [실험예 2] 팔 에탄올 추출물의 근단백질 합성 관여 인자의 mRNA 전사수준 확인

- [208] 근육모세포주인 L6 세포(ATCC)를 10% FBS (Hyclone)가 함유된 DMEM와 함께 6-웰 플레이트에 2×10^5 cell/mL이 되도록 접종 후 배양하였다. 세포 밀도가 약 80 내지 85%가 되었을 때, 웰에 있는 배지를 제거하고 2% HS (Hyclone)가 함유된 DMEM (Hyclone)로 교환하여 L6 세포를 근관세포(myotube)로 분화시켰다. 6일 후, 상기 실시예 <1-2>에서 100% 에탄올로 제조한 팔 에탄올 추출물을 25, 50 또는 40 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 녹인 DMEM (Hyclone)으로 배지를 교환하고 24 시간 동안 배양하였다. 이때, 시료 대신 0.01% DMSO를 처리한 군을 대조군으로 하였다. 24 시간 후, 세포를 수득하여 단백질 가수분해효소 억제제 각테일(Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA)이 포함된 NP-40 완충용액(ELPIS-Biotech, Daejeon, Korea)으로 용해시켜 세포 용해물을 수득하였다. 수득한 세포 용해물은 13,000 rpm으로 10 분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액 내 단백질 농도를 브래드포드로 정량한 다음, 일정 농도의 단백질을 5 분간 가열하고 10% SDS-PAGE gel에 전개하여 SDS-PAGE 전기영동으로 세포 내 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 니트로셀룰로스 막으로 전달하였다. 그런 다음, 항-p-p70S6K 항체, 항-t-p70S6K 항체, 항-p-4EBP1 항체, 항-t-4EBP1 항체 또는 항- α -tubulin 항체(Cell Signaling Technology)를 각각 2.5% 소 혈청 알부민(BSA)에 1:1000 비율로 희석하여 1차 항체로서 니트로셀룰로스 막에 전달된 단백질과 20시간 동안 상온에서 반응시켰다. 1차 항체를 반응시킨 다음, (Tris-buffer Saline Tween20 (TBST)를 이용하여 니트로셀룰로스 막을 10 분간 3 회 세척하였다. 그런 다음, 1차 항체를 인지하는 HRP가 접합된 2차 항체(Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TA, USA)를 2.5% BSA (bioWORLD)에 1:5000이 되도록 희석하여 니트로셀룰로스 막과 2시간 동안 상온에서 반응시켰으며, TBST를 이용하여 10분씩 3회에 걸쳐 세척하였다. 단백질 밴드는 ECL 웨스턴블롯 검출 시약(Amersham, Tokyo, Japan)을 사용하여 발색하였으며, G;BOX EF 이미징 시스템 (Syngene, Cambridge, UK)을 이용하여 발색된 단백질 밴드를 확인하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

- [209] 그 결과, 도 2에서 나타난 바와 같이, 팔 에탄올 추출물을 처리함에 따라 L6

근육세포에서 mRNA 전사 과정을 통해 근단백질 합성에 관여하는 p-p70S6K 및 p-4EBP1의 단백질 발현 수준이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이는 본 발명의 팔 에탄올 추출물이 근육세포 내에서 근단백질 합성을 위한 관련 인자의 mRNA 번역 과정을 촉진시키는 것을 의미한다.

[210]

[211] [실험예 3] 팔 에탄올 추출물의 근 단백질 분해 억제 활성 확인

[212] 근육모세포주인 L6 세포(ATCC)를 10% FBS (Hyclone) 함유 DMEM (Hyclone)와 함께 6-웰 플레이트에 2×10^5 cell/mL이 되도록 접종 후 배양하였다. 세포 밀도가 약 80 내지 85%가 되었을 때, 웰에 있는 배지를 제거하고 2% HS (Hyclone)가 함유된 DMEM (Hyclone)으로 교환하여 L6 세포를 근관세포(myotube)로 분화시켰다. 2일에 한 번씩 새로운 배지로 교체하여 총 6일 동안 분화를 진행하였다. 분화 후, 50 ng/mL의 TNF- α 가 함유된 DMEM 배지에 상기 실시예 <1-2>에서 100% 에탄올로 제조한 팔 에탄올 추출물을 20 또는 40 μ g/mL의 농도로 녹인 후, 세포에 처리하였다. 6시간 후, TRIzol시약(Takara, Osaka, Japan)을 사용하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 총 RNA는 나노드랍(NanoDrop 1000; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)을 이용하여 정량하였다. 16 μ L RNA를 정량하여, 역전사효소 프리믹스(Reverse Transcriptase Premix, ELPIS-Biotech)와 혼합하여 PCR 기계(Gene Amp PCR System 2700; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 42°C 55분, 70°C 15분의 조건에서 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA 중 4 μ L의 cDNA, 하기 [표 1]에 기재된 서열의 정방향 및 역방향 프라이머쌍(Bioneer, Deajeon, Korea), 및 PCR 프리믹스(ELPIS-Biotech)를 혼합하여 PCR 시료를 제조한 뒤, 95°C에서 30초, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분을 30번 반복하여 PCR을 수행하였다.

[213] PCR 결과 증폭된 cDNA를 1.5% 아가로스 젤로 전기영동으로 분리하였으며, G;BOX EF 영상화 시스템(Syngene)을 이용하여 cDNA 밴드를 확인하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[214]

[215] [표1]

본 발명에서 PCR 수행을 위해 사용한 프라이머 서열

증폭유전자	서열명	서열번호	서열	방향
Atrogin-1	Atrogin_F	서열번호 1	5'-GTCCAGAGAGTCGGCAA GTC-3'	정방향
	Atrogin_R	서열번호 2	5'-GTCGGTGATCGTGAGAC CTT-3'	역방향
MuRF-1	MuRF_F	서열번호 3	5'-TCTACTCGGCCACAGGC GCT-3'	정방향
	MuRF_R	서열번호 4	5'-CTTGACAGCTCCCGCCGC AA-3'	역방향
β -Actin	Actin_F	서열번호 5	5'-CTGTGTGGATTGGTGGCT CTAT-3'	정방향
	Actin_R	서열번호 6	5'-GTGTAAAACGCAGCTCA GTAACA3'	역방향

[216]

[217] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 팔 에탄올 추출물을 처리함에 따라 L6 근육세포에서 atrogin-1 및 MuRF-1의 mRNA 발현이 감소함을 알 수 있었다. 이는 본 발명의 팔 에탄올 추출물이 근육세포 내에서 근 단백질 분해를 억제하는 능력이 우수하다는 것을 의미한다.

[218]

[219] [실험예 4] 팔 에탄올 추출물의 근육 분화 촉진 활성 확인

[220] 근육모세포주인 L6 세포(ATCC)를 10% FBS (Hyclone) 함유 DMEM (Hyclone)와 함께 6-웰 플레이트에 2×10^5 cell/mL이 되도록 접종 후 배양하였다. 세포 밀도가 약 80 내지 85%가 되었을 때, 웰에 있는 배지를 제거하고 2% HS가 함유된 DMEM (Hyclone)에 상기 실시예 <1-2>에서 100% 에탄올로 제조한 팔 에탄올 추출물을 25, 50 또는 40 μ g/mL의 농도로 녹인 후, 세포에 처리하여 근관세포로 분화를 유도하였다. 이 때, 시료 대신 0.01% DMSO를 처리한 군을 대조군으로 사용하였다. 이 과정을 2 일간 3회 반복, 총 6일 동안 진행하여 분화시킨 후, TRIzol시약(Takara)을 사용하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA는 상기 [실험예 3]과 동일한 방법으로 cDNA 합성 및 PCR을 수행하여 MyoD 및 myogenin의 mRNA 전사 수준을 확인하였다. PCR을 위해 사용한 프라이머(Bioneer)의 서열은 하기 [표 2]에 나타난 바와 같다. PCR 결과 증폭된 cDNA를 1.5% 아가로즈 젤로 전기영동으로 분리하였으며, G;BOX EF 영상화

시스템(Syngene)을 이용하여 cDNA 밴드를 확인하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[221]

[222] [표2]

본 발명에서 PCR 수행을 위해 사용한 프라이머 서열

증폭유전자	서열명	서열번호	서열	방향
MyoD	MyoD_F	서열번호 7	5'-GGATGGTGCCCCTGGGTC	정방향
	MyoD_R	서열번호 8	5'-TGGCCTTCGCTGTGAGTC	역방향
Myogenin	Myogenin_F	서열번호 9	5'-TGGGCTGCCACAAGCCA	정방향
	Myogenin_R	서열번호 10	5'-CAGCCCAGCCACTGGCA	역방향
β -Actin	Actin_F	서열번호 5	5'-CTGTGTGGATTGGTGGCT	정방향
	Actin_R	서열번호 6	5'-GTGTAAAACGCAGCTCA	역방향

[223]

[224] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 팔 에탄올 추출물을 처리함에 따라 L6 근육세포에서 MyoD 및 myogenin의 mRNA 발현이 증가함을 알 수 있었다. 이는 본 발명의 팔 에탄올 추출물이 근육세포 내에서 근육 분화를 촉진하는 능력이 우수하다는 것을 의미한다.

[225]

[226] [실험예 5] 팔 열수 추출물의 근육생성 활성

[227] 상기 실험예 1에서와 동일한 방법으로 실시예 <1-5>에서 제조한 팔 열수 추출물을 40 μ g/mL로 처리하여 mTOR 활성을 평가하였다. 그 결과를 도 5 나타내었다.

[228] 도 5 나타난 바와 같이 팔 열수 추출물의 처리에 의해 L6 근육세포에서 mTOR의 활성이 유의적(** $p < 0.01$)으로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이는 본 발명의 팔 열수 추출물이 근육세포 내에서 근육 생성을 증가시키는 능력이 우수하다는 것을 의미한다.

[229]

[230] [실험예 6] 팔 아임계 추출물의 근육생성 활성

- [231] 상기 실험예 1에서와 동일한 방법으로 실시예 <1-7>에서 제조한 팔 아임계 추출물을 5 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리하여 mTOR 활성을 평가하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [232] 도 6에 나타낸 바와 같이 팔 아임계 추출물의 처리에 의해 L6 근육세포에서 mTOR의 활성이 유의적(** $p < 0.01$)으로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이는 본 발명의 팔 아임계 추출물이 근육세포 내에서 근육 생성을 증가시키는 능력이 우수하다는 것을 의미한다.
- [233]
- [234] **[실험예 7] 팔 단백질 및 펩타이드의 근육생성 활성**
- [235] 상기 실험예 1에서와 동일한 방법으로 실시예 <2-1>, <2-4> <2-5>, <2-6> 에서 제조한 팔 단백질과 팔 펩타이드를 40 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리하여 mTOR 활성을 평가하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [236] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이 팔 단백질과 팔 펩타이드의 처리에 의해 L6 근육세포에서 mTOR의 활성이 유의적(** $p < 0.01$)으로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이는 본 발명의 팔 단백질과 팔 펩타이드가 근육세포 내에서 근육 생성을 증가시키는 능력이 우수하다는 것을 의미한다.
- [237]
- [238] **[실험예 8] 팔 펩타이드의 mRNA 전사 촉진 활성**
- [239] 상기 실험예 2에서와 동일한 방법으로 실시예 <2-5>에서 제조한 팔 펩타이드를 50과 또는 100 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리하여 mTOR 활성을 평가하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.
- [240] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이 팔 펩타이드를 처리함에 따라 L6 근육세포에서 mRNA 전사 과정을 통해 근단백질 합성에 관여하는 p-p70S6K 및 p-4EBP1의 단백질 발현양이 증가한 것을 확인할 수 있다. 이는 본 발명의 팔 펩타이드가 근육세포 내에서 근단백질 합성을 위한 mRNA 전사 과정을 촉진시키는 것을 의미한다.
- [241]
- [242] **[실험예 9] 팔 펩타이드의 근육 분화 촉진 활성**
- [243] 상기 실험예 4에서와 동일한 방법 실험을 진행하였다. 팔 에탄올 추출물 대신 상기 실시예 <2-5>에서 제조한 팔 펩타이드를 50 또는 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 녹인 후, 세포에 처리하여 근관세포 분화를 유도하였다. 이 때, 시료 대신 0.01% DMSO를 처리한 군을 대조군으로 하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.
- [244] 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이 팔 펩타이드를 처리함에 따라 L6 근육세포에서 MyoD 및 myogenin의 mRNA 발현이 증가함을 알 수 있었다. 이는 본 발명의 팔 펩타이드가 근육세포 내에서 근육 분화를 촉진하는 능력이 우수하다는 것을 의미한다.
- [245]
- [246] **[실험예 10] 검은팔 에탄올 추출물의 근육생성 활성**

- [247] 상기 실험예 1에서와 동일한 방법으로 실시예 <3-2>에서 100% 에탄올로 제조한 검은팔 에탄올 추출물을 40 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리하여 mTOR 활성을 평가하였다. 그 결과를 도 10에 나타내었다.
- [248] 도 10에 나타낸 바와 같이 검은팔 에탄올 추출물의 처리에 의해 L6 근육세포에서 mTOR의 활성이 유의적(** $p < 0.01$)으로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이는 본 발명의 검은팔 에탄올 추출물이 근육세포 내에서 근육 생성을 증가시키는 능력이 우수하다는 것을 의미한다.
- [249]
- [250] **[실험예 11] 팔 에탄올 추출물의 운동수행능력 향상 활성**
- [251] 팔 에탄올 추출물의 운동수행능력을 평가하기 위해 PGC-1 α 활성을 루시퍼라제 분석으로 수행하였다. COS7 원숭이 신장세포(ATCC)를 1.5×10^5 cells/well로 24-웰 플레이트에서 배양한 뒤, 리포펙터(Aptabio, Yongin, Korea)를 이용하여 pGL3-PGC-1 α -Luc 플라스미드 (Addgene, Cambridge, MA, USA)를 세포에 형질주입 하였다. 4시간 형질주입 후, 세포를 24시간 동안 안정화시켰다. 그런 다음, 상기 실시예 <1-2>에서 100% 에탄올로 제조한 팔 에탄올 추출물을 40 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 DMEM에 녹인 후, 세포에 24시간 처리하였다. 최종 24시간 후, NP-40 완충용액(ELPIS-Biotech)으로 용해시켜 세포 용해하였고, 세포 용해물 내 루시퍼라제 활성을 측정하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.
- [252] 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이 팔 에탄올 추출물이 운동수행능력에 관여하는 주요인자인 PGC-1 α 의 활성을 유의적(** $p < 0.01$)으로 증가시킴을 알 수 있었다. 따라서 팔 에탄올 추출물은 운동수행능력을 증진시킴을 확인하였다.
- [253]
- [254] **[실험예 12] 팔 에탄올 추출물의 미토콘드리아 생합성 촉진 활성**
- [255] 상기 실험예 4에서와 동일한 방법으로 실험을 진행하였다. 상기 실시예 1-2에서 100% 에탄올로 제조한 팔 에탄올 추출물을 25, 50, 40 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 녹인 후, 세포에 처리하여 myotube 분화를 유도하였다. 이 때, 시료 대신 0.01% DMSO를 처리한 군을 대조군으로 하였다. 또한 RT-PCR시 하기의 특정 프라이머(Bioneer)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과를 도 12에 나타내었다.
- [256]
- [257]

[258] [표3]

본 발명에서 PCR 수행을 위해 사용한 프라이머 서열

증폭유전자	서열명	서열번호	서열	방향
PGC-1 α	PGC_F	서열번호 11	5'-ATGTGTCGCCTTCTTGCTC T-3'	정방향
	PGC_R	서열번호 12	5'-ATCTACTGCCTGGGGACC TT-3'	역방향
ERR α	ERR_F	서열번호 13	5'-AAGGGGATGGAGACCACA GT-3'	정방향
	ERR_R	서열번호 14	5'-TGAGGTGGGAGCTGATAG GG-3'	역방향
NRF-1	NRF_F	서열번호 15	5'-TGGACCCAAGCATTACGG AC-3'	정방향
	NRF_R	서열번호 16	5'-GGTCATTTCACCGCCCTGT A-3'	역방향
Tfam	Tfam_F	서열번호 17	5'-GCTTCCAGGAGGCTAAGG AT-3'	정방향
	Tfam_R	서열번호 18	5'-CCCAATCCCAATGACAAC TC-3'	역방향
β -Actin	Actin_F	서열번호 5	5'-CTGTGTGGATTGGTGGCTC TAT-3'	정방향
	Actin_R	서열번호 6	5'-GTGTAAAACGCAGCTCAG TAACA3'	역방향

[259]

[260] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이 팔 에탄올 추출물을 처리함에 따라 PGC-1 α , ERR α , NRF-1, Tfam의 mRNA 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이는 본 발명의 팔 에탄올 추출물이 운동수행능력에 깊은 연관성이 있는 미토콘드리아 생합성 관련 유전자 발현을 증가시키는 능력이 우수하다는 것을 의미한다.

[261]

[262] [실험예 13] 팔 단백질 및 펩타이드의 운동수행능력 향상 활성

[263] 상기 실험예 11에서와 동일한 방법으로 실시예 <2-1>, <2-2>, <2-3>, <2-4>, <2-5> 및 <2-6>에서 제조한 팔 단백질 및 팔 펩타이드를 각각 40 μ g/mL로 처리하여 PGC-1 α 활성을 평가하였다. 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[264] 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이 팔 단백질 및 팔 펩타이드가 운동수행능력에

관여하는 주요인자인 PGC-1 α 의 활성을 유의적(**p < 0.01)으로 증가시킴을 알 수 있었다. 따라서 팔 단백질 및 팔 펩타이드는 운동수행능력을 증진시킴을 확인하였다.

[265]

[266] **[실험예 14] 팔 펩타이드의 미토콘드리아 생합성 촉진 활성**[267] 상기 실험예 4에서와 동일한 방법으로 실시예 <2-5>에서 제조한 팔 펩타이드를 50 또는 100 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리하여 팔 펩타이드의 미토콘드리아 생합성 촉진 활성을 평가하였다. 그 결과를 도 14에 나타내었다.[268] 그 결과, 도 14에 나타낸 바와 같이 팔 펩타이드를 처리함에 따라 PGC-1 α , ERR α , NRF-1, Tfam의 mRNA 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이는 본 발명의 팔 펩타이드가 운동수행능력에 깊은 연관성이 있는 미토콘드리아 생합성 관련 유전자 발현을 증가시키는 능력이 우수하다는 것을 의미한다.

[269]

[270] **[실험예 15] 검은팔 에탄올 추출물의 운동수행능력 향상 활성**[271] 상기 실험예 11에서와 동일한 방법으로 실시예 <3-2>에서 100% 에탄올로 제조한 검은팔 에탄올 추출물을 40 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리하여 PGC-1 α 활성을 평가하였다. 그 결과를 도 15에 나타내었다.[272] 그 결과, 도 15에 나타낸 바와 같이 검은팔 에탄올 추출물이 운동수행능력에 관여하는 주요인자인 PGC-1 α 의 활성을 유의적(**p < 0.01)으로 증가시킴을 알 수 있었다. 따라서 검은팔 에탄올 추출물은 운동수행능력을 증진시킴을 확인하였다.

[273]

[274] **[실험예 16] 팔 펩타이드의 근위축 억제 활성**[275] **<16-1> 동물의 사육 및 근위축 유도**[276] 실험동물로 생후 7주된 수컷쥐(C57BL/6N; Young Bio)를 구입하여 실험을 진행하였다. 모든 동물의 사육은 연세실험동물연구센터(Yonsei Laboratory Animal Research Center; YLARC, Seoul, Korea)에서 진행되었으며, 사육실 환경은 온도 23 ± 2 , 상대습도 $55 \pm 10\%$ 로 유지시켰다. 실험 시작 전, 총 20마리의 쥐를 무작위로 1군당 5마리가 되도록 정상군, 근위축군, 팔300 투여군, 팔600 투여군으로 나누었다. 1주일간 적응시킨 후, 325 mg/kg의 트리브로모메탄올(tribromoethanol, Sigma-aldrich)을 복강 주사하여 마취를 유도하였다. 마취 후, 근위축군과 팔 투여군에 있는 쥐의 오른쪽 뒷다리(hindlimb) 장딴지근육(gastrocnemius muscle)과 오른쪽 발바닥을 피부 스테이플러(skin stapler)(Unidus, Chungcheongbuk-do, Korea)를 사용하여 스테이플러 심으로 근육을 손상시키고 오른쪽 뒷다리가 움직이지 못하게 하였으며 이 상태를 일주일 간 유지시켰다. 일주일 후, 장딴지근과 발바닥에 고정되어 있던 스테이플러 심을 제거하고 다시 일주일간 실시예 <1-2>에서 50% 에탄올로 제조한 팔 에탄올 추출물을 300 mg/kg 또는 600 mg/kg의 농도로 매일

경구투여하여 회복을 유도하였다. 이 때, 정상군과 근위축군은 시료 대신에 식염수로 경구투여를 실시하였다.

[277]

[278] **<16-2> 근력 측정**

[279] 경구 투여 기간이 끝나고, 근력측정기(Chatillon force measurement system; Columbus Instrument, Columbus, OH, USA)를 이용하여 쥐의 근력을 측정하였다. 쥐가 근력측정기의 막내를 놓을 때까지 일정한 힘으로 쥐의 꼬리를 당겼으며, 한 마리당 총 5회 연속 테스트를 실시하였다.

[280] 그 결과, 도 16에 나타낸 바와 같이 정상군에 비해 근위축군에서 근력이 유의적(* $p < 0.05$)으로 감소하였으나 팔 에탄올 추출물을 처리함에 따라 근력이 유의적(* $p < 0.05$)으로 증가한 것을 확인하였다. 이는 본 발명의 팔 에탄올 추출물이 근위축으로 인해 감소한 근력을 증가시키는 효과가 우수하다는 것을 의미한다.

[281]

[282] **<16-3> 지구력 측정**

[283] 트레드밀 기기(LE8710MTS; Panlab, Barcelona, Spain)를 이용하여 실험동물의 운동수행능력을 평가하였다. 최초 8 m/min의 속도로 시작하여, 1 분마다 1 m/min씩 속도를 높였다. 쥐가 shock grid에 닿았을 때 0.2 mA의 전기를 주도록 설정하였으며, 쥐가 전기충격을 10초간 받아도 더 이상 달리지 않는 시점에서 실험을 멈추고 시간과 거리를 측정하였다.

[284] 그 결과, 도 17에 나타낸 바와 같이 정상군에 비해 근위축군에서 운동거리 및 운동시간이 유의적(* $p < 0.05$)으로 감소하였으나 팔 에탄올 추출물을 처리함에 따라 운동거리 및 시간이 유의적(* $p < 0.05$)으로 증가한 것을 확인하였다. 이는 본 발명의 팔 에탄올 추출물이 근위축으로 인해 감소한 운동수행능력을 향상시키는 효과가 우수하다는 것을 의미한다.

[285]

[286] **<16-4> 근육 무게 측정**

[287] 근력과 운동수행능력 측정이 끝난 후, 실험동물을 325 mg/kg의 트리브로모메탄올(Sigma-aldrich)을 복강 주사하여 마취 후 심채혈을 통해 희생하였다. 심장박동이 멈춘 것을 확인한 뒤, 오른쪽 뒷다리에서 손상을 입지 않은 전경골근(tibialis anterior muscle)을 적출하여 무게를 측정하였다.

[288] 그 결과, 도 18에 나타낸 바와 같이 정상군에 비해 상처를 입지 않은 근위축군의 전경골근의 무게가 운동시간이 유의적(* $p < 0.05$)으로 감소하였으나 팔 에탄올 추출물을 처리함에 무게가 유의적(* $p < 0.05$)으로 증가한 것을 확인하였다. 이는 본 발명의 팔 에탄올 추출물이 근위축으로 인해 감소한 근육의 무게를 증가시키는 효과가 우수하다는 것을 의미한다.

[289]

[290] 이하, 본 발명에 따른 상기 팔을 유효성분으로 함유하는 근기능 개선용 또는

운동수행능력 증강용 식품류 및 의약품의 제조예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다. 상기 근 기능 개선 효과 또는 운동수행능력 증강 효과가 우수한 팔 에탄올 추출물을 가지고 하기와 같은 조성성분 및 조성비에 따라 제조예 1 내지 2의 의약품 및 식품 조성물을 통상적인 방법에 따라서 제조하였다.

[291]

[292] [제조예 1] 의약품

[293] [제조예 1-1] 산제

[294] 상기 실시예 1 내지 4의 팔 추출물, 팔 펩타이드, 검은팔 추출물 또는 검은팔 펩타이드 50 mg, 결정셀룰로오스 2 g을 혼합한 후 통상의 산제 제조방법에 따라서 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[295]

[296] [제조예 1-2] 정제

[297] 상기 실시예 1 내지 4의 팔 추출물, 팔 펩타이드, 검은팔 추출물 또는 검은팔 펩타이드 50 mg, 결정셀룰로오스 400 mg, 스테아린산 마그네슘 5 mg을 혼합한 후 통상의 정제 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[298]

[299] [제조예 1-3] 캡슐제

[300] 상기 실시예 1 내지 4의 팔 추출물, 팔 펩타이드, 검은팔 추출물 또는 검은팔 펩타이드 30 mg, 유청단백질 100 mg, 결정셀룰로오스 400 mg, 스테아린산 마그네슘 6 mg을 혼합한 후 통상의 캡슐제 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[301]

[302] [제조예 2] 식품

[303] [제조예 2-1] 건강식품의 제조

[304] 상기 실시예 1 내지 4의 팔 추출물, 팔 펩타이드, 검은팔 추출물 또는 검은팔 펩타이드 1000 mg, 비타민 A 아세테이트 70 μ g, 비타민 E 1.0 mg, 비타민 B1 0.13 mg, 비타민 B2 0.15 mg, 비타민 B6 0.5 mg, 비타민 B12 0.2 μ g, 비타민 C 10 mg, 비오틴 10 μ g, 니코틴산아미드 1.7 mg, 엽산 50 μ g, 판토텐산 칼슘 0.5 mg, 황산제1철 1.75 mg, 산화아연 0.82 mg, 탄산마그네슘 25.3 mg, 제1인산칼륨 15 mg, 제2인산칼슘 55 mg, 구연산칼륨 90 mg, 탄산칼슘 100 mg, 염화마그네슘 24.8 mg를 혼합하여 제조할 수 있으며, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[305]

[306] [제조예 2-2] 건강음료의 제조

[307] 상기 실시예 1 내지 4의 팔 추출물, 팔 펩타이드, 검은팔 추출물 또는 검은팔 펩타이드 1000 mg, 구연산 1000 mg, 올리고당 100 g, 매실농축액 2 g, 타우린 1

g에 정제수를 가하여 전체 900 mL 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 L용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 건강음료 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[308]

[309] **[제조예 2-3] 츄잉껌**

[310] 껌 베이스 20 중량%, 설탕 76.9 중량%, 향료 1 중량% 및 물 2 중량% 와 상기 실시예 실시예 1 내지 4의 팔 추출물, 팔 펩타이드, 검은팔 추출물 또는 검은팔 펩타이드 0.1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 츄잉껌을 제조하였다.

[311]

[312] **[제조예 2-4] 캔디**

[313] 설탕 60 중량%, 물엿 39.8 중량% 및 향료 0.1 중량%와 상기 실시예 1 내지 4의 팔 추출물, 팔 펩타이드, 검은팔 추출물 또는 검은팔 펩타이드 0.1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 캔디를 제조하였다.

[314]

[315] **[제조예 2-5] 비스킷**

[316] 박력 1급 25.59 중량%, 중력 1급 22.22 중량%, 정백당 4.80 중량%, 식염 0.73 중량%, 포도당 0.78 중량%, 팜쇼트닝 11.78 중량%, 암모늄 1.54 중량%, 중조 0.17 중량%, 중아황산나트륨 0.16 중량%, 쌀가루 1.45 중량%, 비타민 B 0.0001 중량%, 밀크향 0.04 중량%, 물 20.6999 중량%, 전지분유 1.16 중량%, 대용분유 0.29 중량%, 제1인산칼슘 0.03 중량%, 살포염 0.29 중량% 및 분무유 7.27 중량%와 상기 실시예 1 내지 4의 팔 추출물, 팔 펩타이드, 검은팔 추출물 또는 검은팔 펩타이드 1.00 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 비스킷을 제조하였다.

청구범위

- [청구항 1] 팔(*Vigna angularis*)의 추출물을 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 추출물은 물, C₁ 내지 C₆의 유기용매, 아임계 유체 및 초임계 유체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 용매로 팔을 추출하여 수득한 것을 특징으로 하는, 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상용 약학적 조성물.
- [청구항 3] 팔 유래 단백질 또는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상용 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제 3항에 있어서, 상기 팔 유래 단백질은 하기 i) 내지 v) 단계로 이루어진 방법으로 수득하고, 상기 팔 유래 펩타이드는 하기 i) 내지 vii) 단계로 이루어진 방법으로 수득하는 것을 특징으로 하는, 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상용 약학적 조성물:
- i) 건조된 팔을 분쇄하고 헥산을 용매로 추출하는 단계;
 - ii) 상기 단계 i)에서 추출한 헥산 추출물을 제거하고, 박에 물을 가하여 pH 7.0 내지 10.0 조건에서 방치하는 단계;
 - iii) 상기 단계 ii)에서 방치한 용액을 원심분리하여 상등액을 수득하는 단계;
 - iv) 상기 단계 iii)에서 수득한 상등액을 다시 pH 2.0 내지 6.0 조건에서 방치하는 단계;
 - v) 상기 단계 iv)에서 방치한 용액을 다시 원심분리하여 침전한 침전체를 팔 유래 단백질로 수득하는 단계;
 - vi) 상기 단계 v)에서 수득한 팔 유래 단백질에 가수분해효소를 가하고 효소 반응한 후, 여과하여 침전물을 제거하는 단계; 및
 - vii) 상기 단계 vi)에서 침전물이 제거된 여과액을 동결건조하여 펩타이드를 수득하는 단계.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서, 상기 단계 vi)의 가수분해 효소는 알카라아제(Alcalase), 플라보르자임(Flavourzyme), 뉴트라아제(Neutrase), 프로타멕스(Protamex) 및 단백질가수분해효소-NP(Protease-NP)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 가수분해효소로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상용 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 팔은 팔(*V. angularis* W.F.Wight) 및 검은팔(*V. angularis* var. *angularis*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 다인 것을 특징으로 하는, 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상용 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 근육 질환은 근기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환인 것을 특징으로 하는,

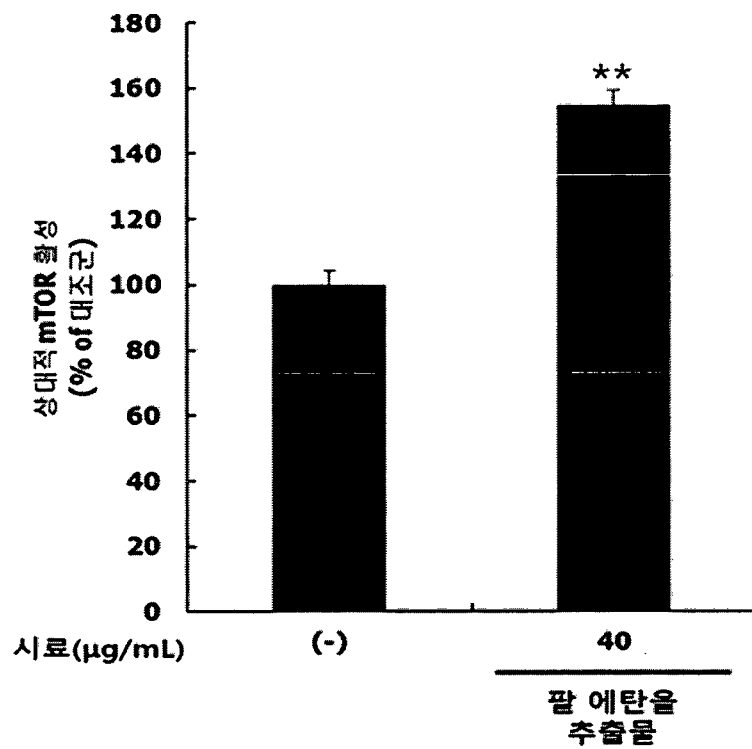
- 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상용 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제 7항에 있어서, 상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증, 악액질(cachexia) 및 근육감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상용 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 운동수행능력 향상은 퇴행성 질환, 미토콘드리아 이상 질환, 지구력 저하증, 순발력 저하증, 무기력증, 근육 폐기 및 우울증 등으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 질병을 예방 또는 치료하는 것임을 특징으로 하는, 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상용 약학적 조성물.
- [청구항 10] 팔(*Vigna angularis*)의 추출물을 유효성분으로 포함하는, 근기능 개선 또는 운동수행능력 향상용 식품 조성물.
- [청구항 11] 제 10항에 있어서, 상기 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 유기용매, 아임계 유체 및 초임계 유체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 용매로 팔을 추출하여 수득한 것을 특징으로 하는, 근기능 개선 또는 운동수행능력 향상용 식품 조성물.
- [청구항 12] 팔 유래 단백질 또는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 근기능 개선 또는 운동수행능력 향상용 식품 조성물.
- [청구항 13] 제 12항에 있어서, 상기 팔 유래 단백질은 하기 i) 내지 v) 단계로 이루어진 방법으로 수득하고, 상기 팔 유래 펩타이드는 하기 i) 내지 vii) 단계로 이루어진 방법으로 수득하는 것을 특징으로 하는, 근기능 개선 또는 운동수행능력 향상용 식품 조성물:
- i) 건조된 팔을 분쇄하고 hexan을 용매로 추출하는 단계;
 - ii) 상기 단계 i)에서 추출한 hexan 추출물을 제거하고, 박에 물을 가하여 pH 7.0 내지 10.0 조건에서 방치하는 단계;
 - iii) 상기 단계 ii)에서 방치한 용액을 원심분리하여 상등액을 수득하는 단계;
 - iv) 상기 단계 iii)에서 수득한 상등액을 다시 pH 2.0 내지 6.0 조건에서 방치하는 단계;
 - v) 상기 단계 iv)에서 방치한 용액을 다시 원심분리하여 침전한 침전체를 팔 유래 단백질로 수득하는 단계;
 - vi) 상기 단계 v)에서 수득한 팔 유래 단백질에 가수분해효소를 가하고 효소 반응한 후, 여과하여 침전물을 제거하는 단계; 및
 - vii) 상기 단계 vi)에서 침전물이 제거된 여과액을 동결건조하여 펩타이드를 수득하는 단계.
- [청구항 14] 제 13 항에 있어서, 상기 단계 vi)의 가수분해 효소는 알카라아제(Alcalase), 플라보르자임(Flavourzyme), 뉴트라아제(Neutrase),

프로타멕스(Protamex) 및 단백질을 가수분해 효소-NP(Protease-NP)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질을 가수분해 효소로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 근기능 개선 또는 운동수행능력 향상용 식품 조성물.

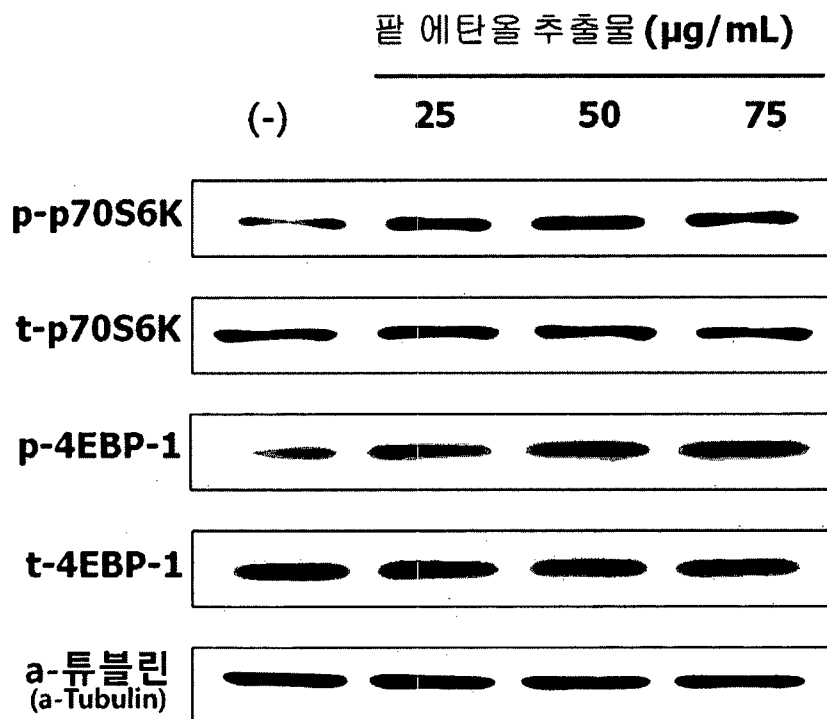
- [청구항 15] 제 10항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 팔은 팔(*V. angularis* W.F.Wight) 및 검은팔(*V. angularis* var. *angularis*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 다인 것을 특징으로 하는, 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상용 약학적 조성물.
- [청구항 16] 제 10항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 근육 질환은 근기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환인 것을 특징으로 하는, 근기능 개선 또는 운동수행능력 향상용 식품 조성물.
- [청구항 17] 제 16항에 있어서, 상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증, 악액질(cachexia) 및 근육감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 근기능 개선 또는 운동수행능력 향상용 식품 조성물.
- [청구항 18] 제 10항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서, 운동수행능력 향상은 퇴행성 질환, 미토콘드리아 이상 질환, 지구력 저하증, 순발력 저하증, 무기력증, 근육 폐기 및 우울증 등으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 질병을 예방 또는 치료하는 것임을 특징으로 하는, 근기능 개선 또는 운동수행능력 향상용 식품 조성물.
- [청구항 19] 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상을 위한, 팔(*Vigna angularis*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 용도.
- [청구항 20] 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상을 위한, 팔 유래 단백질을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 용도.
- [청구항 21] 근기능 개선 또는 운동수행능력 향상을 위한, 팔 추출물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물의 용도.
- [청구항 22] 근기능 개선 또는 운동수행능력 향상을 위한, 팔 유래 단백질 또는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 식품 조성물의 용도.
- [청구항 23] 팔(*Vigna angularis*) 추출물을 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 근육 질환 치료 방법.
- [청구항 24] 팔 유래 단백질 또는 펩타이드를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 근육 질환 치료 방법.
- [청구항 25] 팔(*Vigna angularis*) 추출물을 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 운동수행능력 향상 방법.
- [청구항 26] 팔 유래 단백질 또는 펩타이드를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 운동수행능력 향상 방법.
- [청구항 27] 팔(*Vigna angularis*) 추출물을 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를

- 포함하는, 근기능 개선 방법.
- [청구항 28] 팔 유래 단백질 또는 펩타이드를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 근기능 개선 방법.

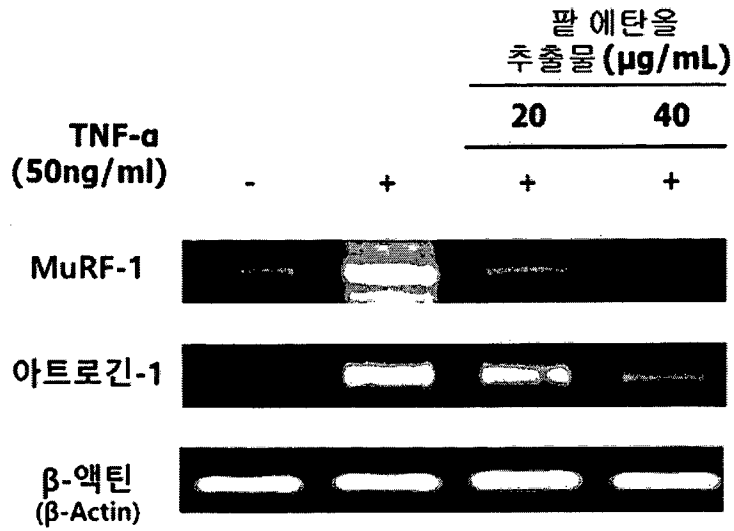
[도1]



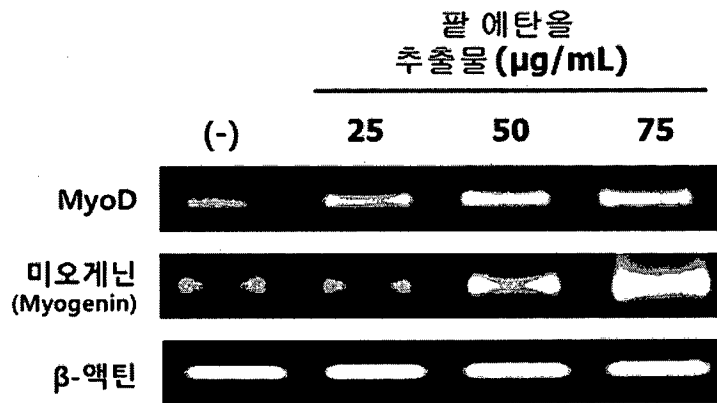
[도2]



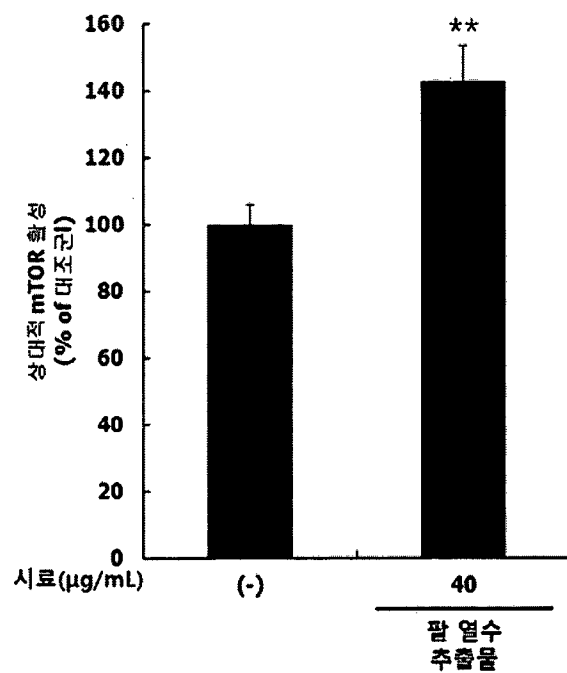
[도3]



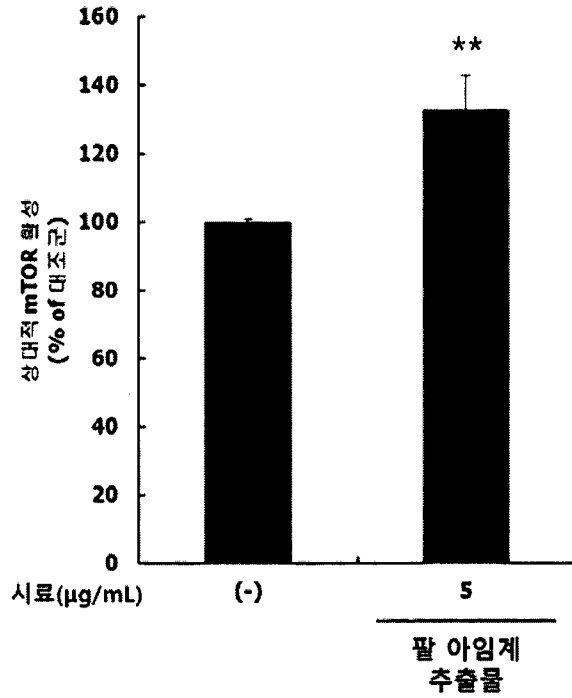
[도4]



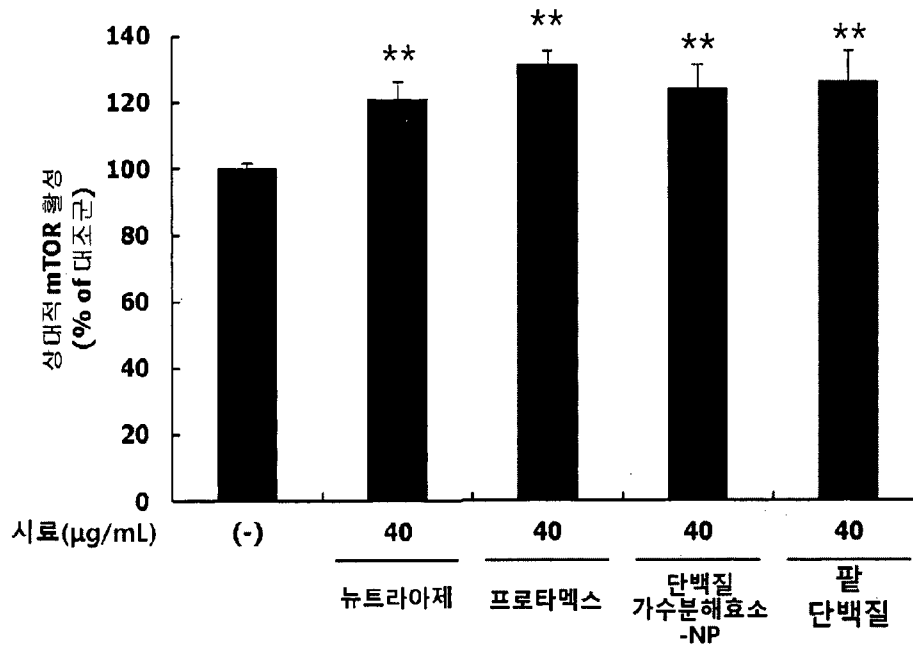
[도5]



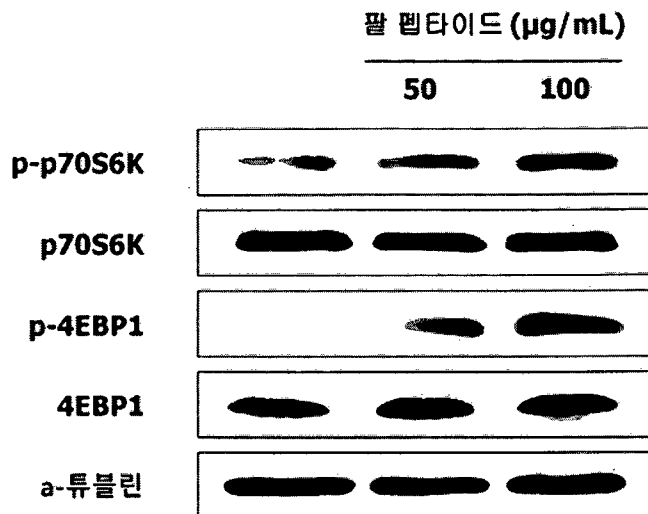
[도6]



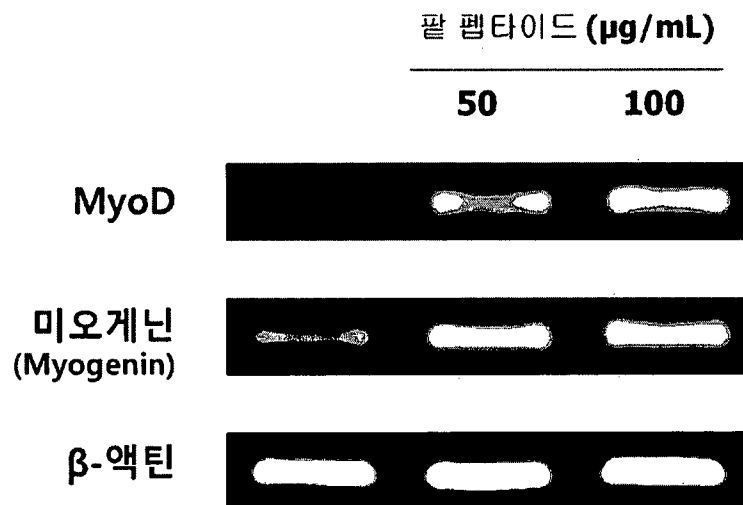
[도7]



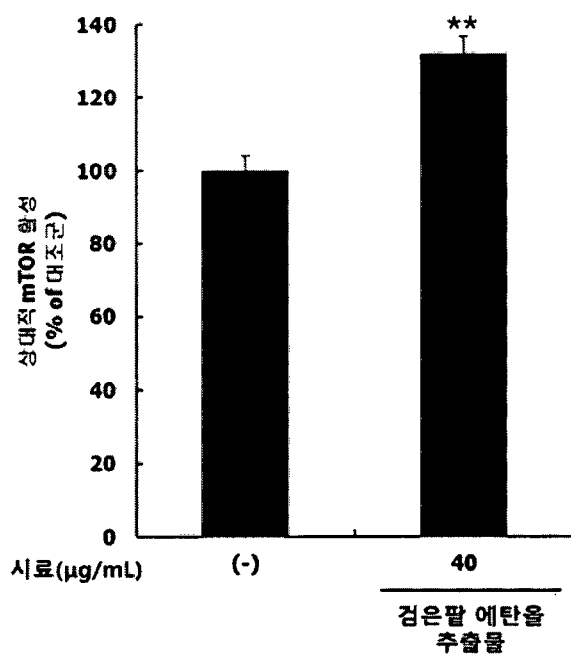
[도8]



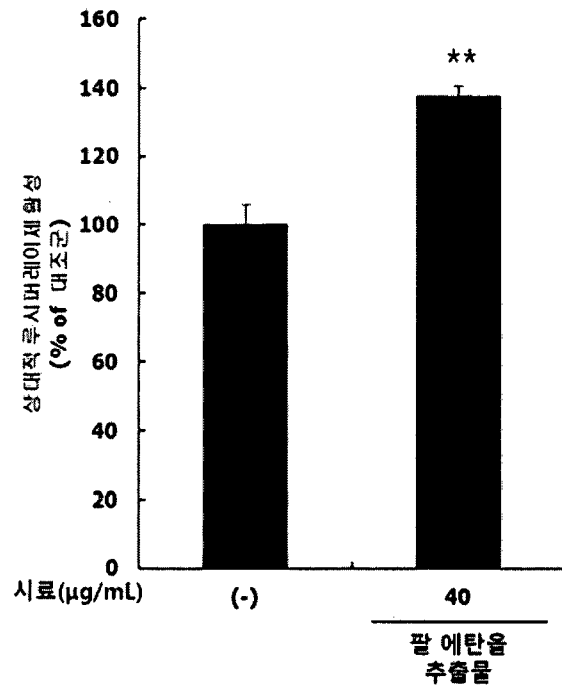
[도9]



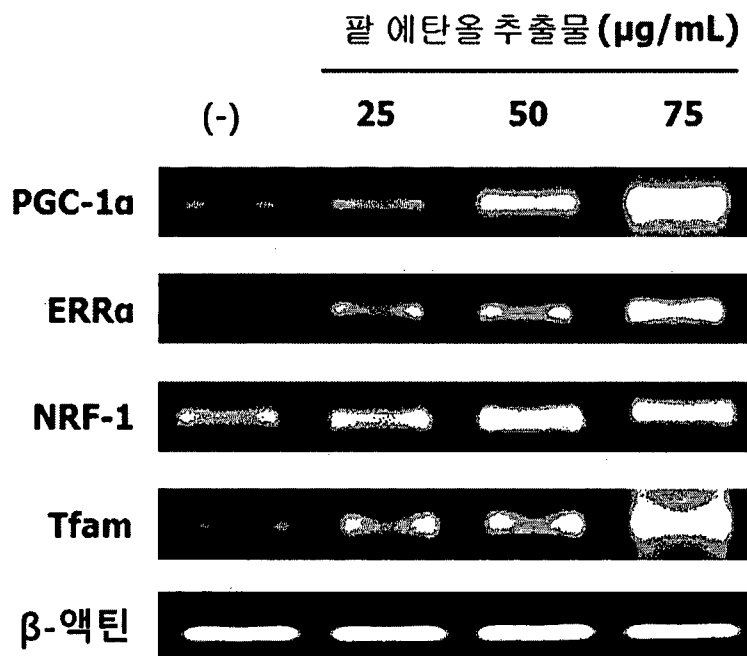
[도10]



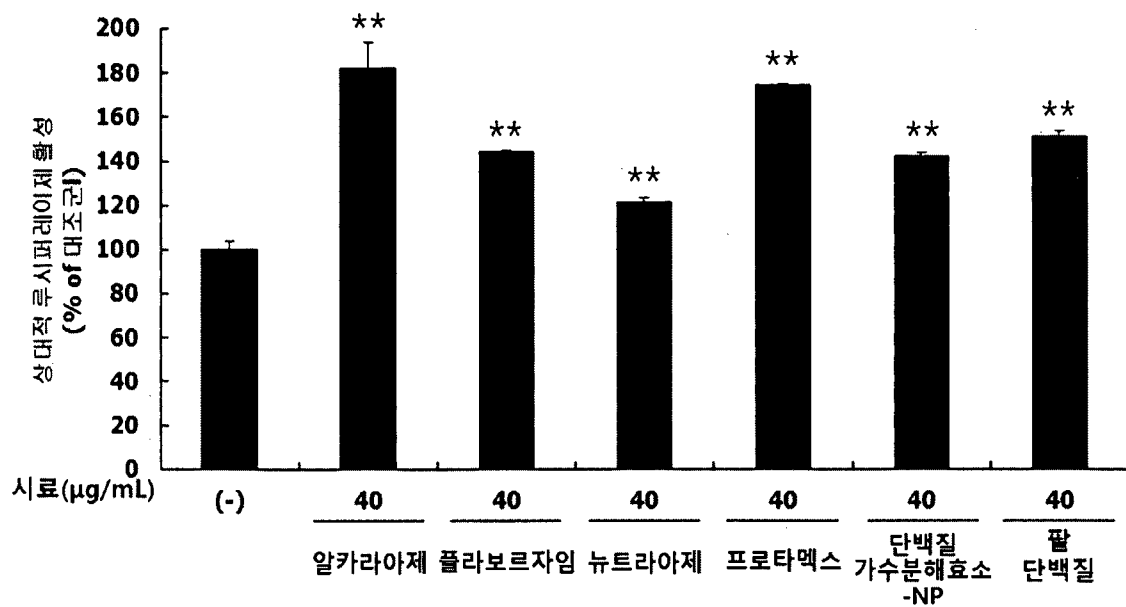
[도11]



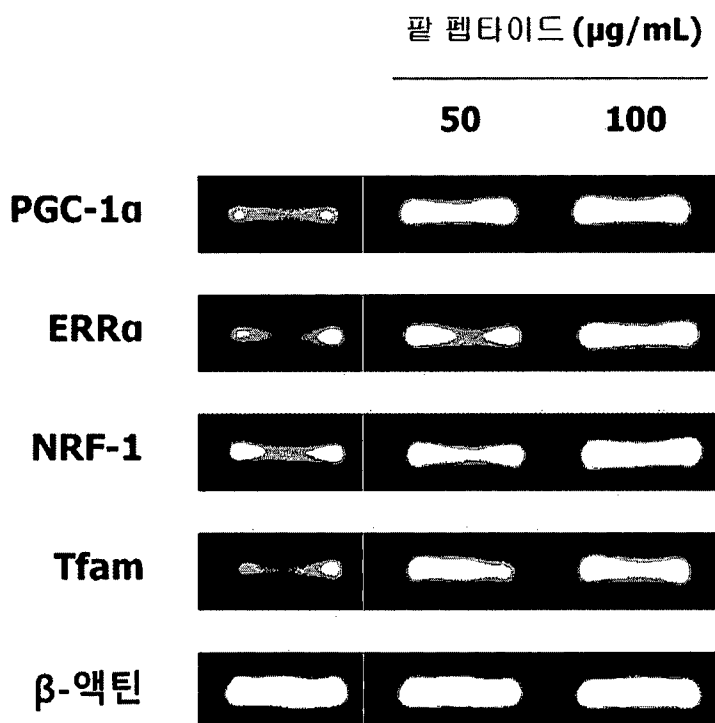
[도12]



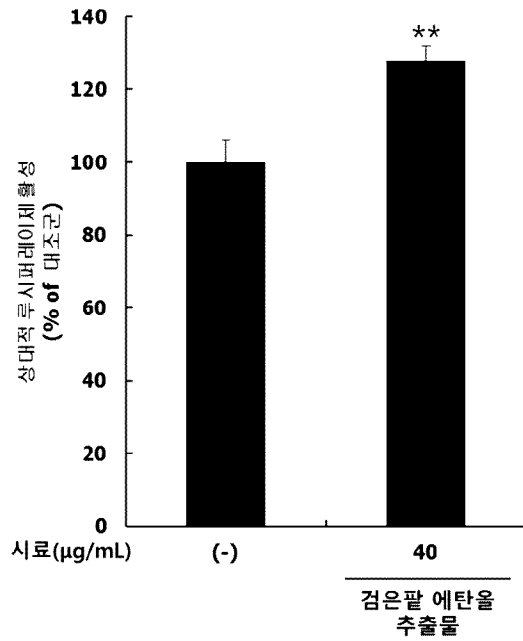
[도13]



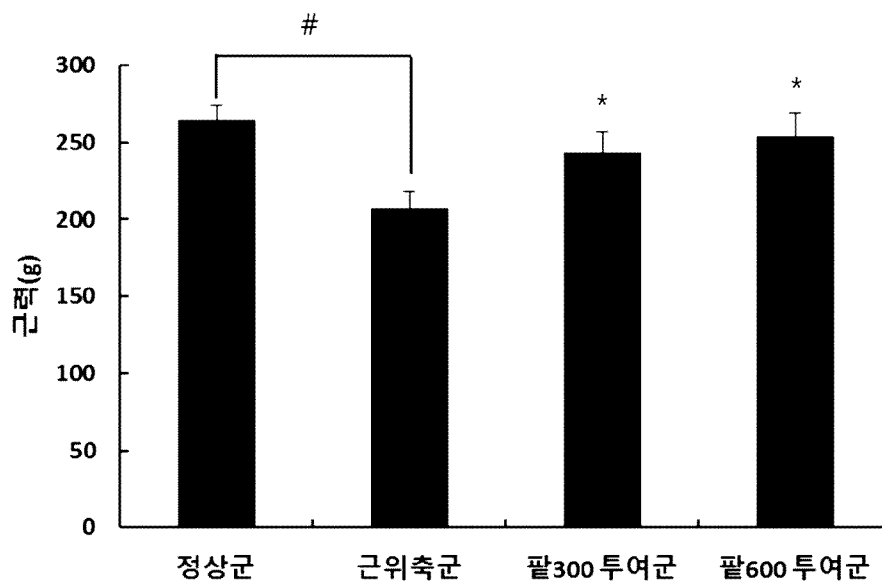
[도14]



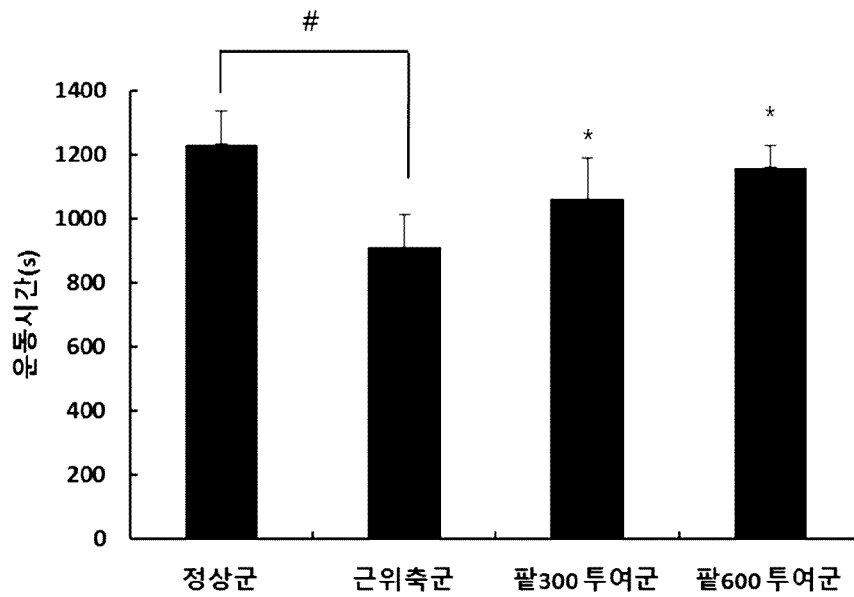
[도15]



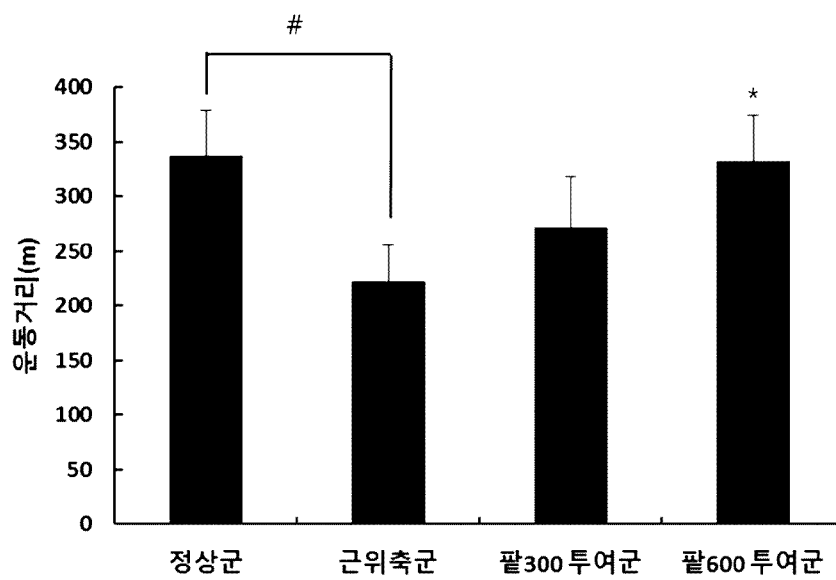
[도16]



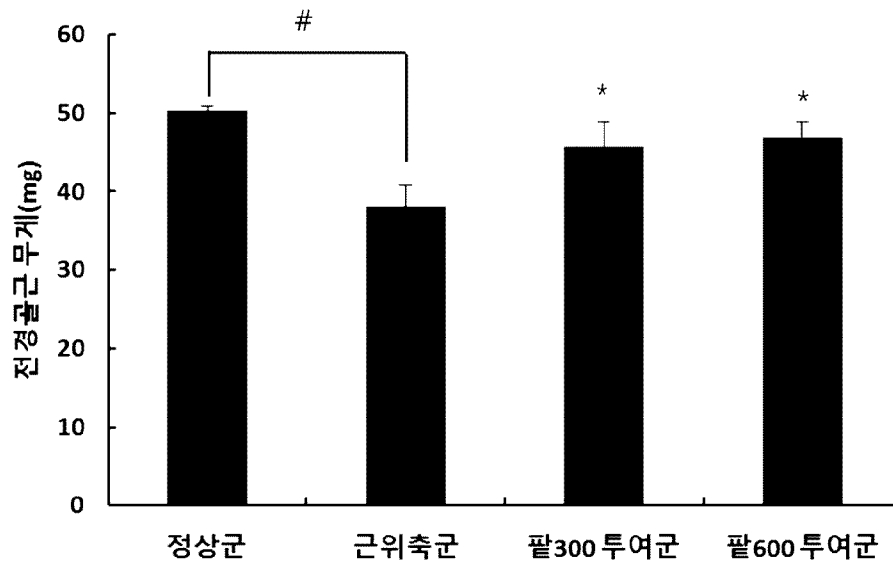
[도17a]



[도17b]



[도18]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/004701

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 36/48(2006.01)i, A23L 33/105(2016.01)i, A61K 8/97(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 36/48; A23L 1/03; A61K 35/78; A61K 36/00; A61K 36/296; A23L 2/38; A23L 1/30; C12P 21/06; A61K 36/258; A23L 33/105; A61K 8/97; A61Q 19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: red bean extract, red bean derived protein, muscle disease, hydrolase, hexane

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2002-0044535 A (KABUSHIKI KAISHA ENDOSEIAN) 15 June 2002 See abstract; claim 1; and pages 1, 3-4.	1-3,6-12,15-22
Y		4-5,13-14
Y	US 2008-0096243 A1 (CHO, Myong J. et al.) 24 April 2008 See abstract; claim 11; and paragraphs [0016]-[0017], [0029]-[0030].	4-5,13-14
A	JP 61-093124 A (HORIUCHI:KK et al.) 12 May 1986 See the entire document.	1-22
A	JP 2014-091686 A (IMURAYA GROUP CO., LTD. et al.) 19 May 2014 See the entire document.	1-22
A	KR 10-2007-0117151 A (HEBEI YILING MEDICINE RESEARCH INSTITUTE CO., LTD.) 12 December 2007 See the entire document.	1-22
PX	KR 10-2017-0002846 A (AMOREPACIFIC CORPORATION) 09 January 2017 See abstract; and claims 1-15.	1-3,6-12,15-22



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 SEPTEMBER 2017 (08.09.2017)

Date of mailing of the international search report

11 SEPTEMBER 2017 (11.09.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/004701

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	KIM, Chang-Hee et al., "Inhibitory Effect of Red Bean Extract on TNF- α -induced Muscle Atrophy in Skeletal Muscle Cells", JOURNAL OF THE KOREAN SOCIETY OF FOOD SCIENCE AND NUTRITION, abstract no. P09-385, October 2016, pages 491-492 See pages 491-492.	1-3,6-12,15-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/004701

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

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

1. ☒ Claims Nos.: **23-28**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 23-28 pertain to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/004701

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2002-0044535 A	15/06/2002	CN 1200622 C	11/05/2005
		CN 1357253 A	10/07/2002
		HK 1044690 A1	02/09/2005
		JP 2002-171948 A	18/06/2002
		JP 3437167 B2	18/08/2003
		KR 10-0672141 B1	19/01/2007
		US 2002-0068124 A1	06/06/2002
		US 6733816 B2	11/05/2004
US 2008-0096243 A1	24/04/2008	AU 2005-316310 A1	22/06/2006
		CN 101123885 A	13/02/2008
		EP 1838164 A1	03/10/2007
		JP 2008-537533 A	18/09/2008
		MX 2007-006946 A	25/06/2007
		US 2006-0134310 A1	22/06/2006
		US 7332192 B2	19/02/2008
		WO 2006-066170 A1	22/06/2006
JP 61-093124 A	12/05/1986	NONE	
JP 2014-091686 A	19/05/2014	JP 6031328 B2	24/11/2016
KR 10-2007-0117151 A	12/12/2007	KR 10-1182358 B1	11/09/2012
KR 10-2017-0002846 A	09/01/2017	WO 2017-003086 A1	05/01/2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 36/48(2006.01)i, A23L 33/105(2016.01)i, A61K 8/97(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 36/48; A23L 1/03; A61K 35/78; A61K 36/00; A61K 36/296; A23L 2/38; A23L 1/30; C12P 21/06; A61K 36/258; A23L 33/105; A61K 8/97; A61Q 19/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 팔 추출물, 팔 유래 단백질, 근육 질환, 가수분해 효소, 핵산

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2002-0044535 A (가부시끼가이샤 엔도세이안) 2002.06.15 요약; 청구항 1; 및 페이지 1, 3-4 참조.	1-3, 6-12, 15-22
Y		4-5, 13-14
Y	US 2008-0096243 A1 (CHO, MYONG J. 등) 2008.04.24 요약; 청구항 11; 및 문단 [0016]-[0017], [0029]-[0030] 참조.	4-5, 13-14
A	JP 61-093124 A (HORIUCHI:KK 등) 1986.05.12 전체 문헌 참조.	1-22
A	JP 2014-091686 A (IMURAYA GROUP CO., LTD. 등) 2014.05.19 전체 문헌 참조.	1-22
A	KR 10-2007-0117151 A (허베이 이링 메디슨 리서치 인스티튜트 코오폰레이션 리미티드) 2007.12.12 전체 문헌 참조.	1-22
PX	KR 10-2017-0002846 A ((주)아모레퍼시픽) 2017.01.09 요약; 및 청구항 1-15 참조.	1-3, 6-12, 15-22

☒ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 09월 08일 (08.09.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 09월 11일 (11.09.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

이경철

전화번호 +82-42-481-8611



C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	KIM, CHANGHEE 등, 'Inhibitory effect of red bean extract on TNF- α -induced muscle atrophy in skeletal muscle cells', 한국식품영양과학회 학술대회발표 초록집, 초록 번호 P09-385, 2016.10, 페이지 491-492 페이지 491-492 참조.	1-3, 6-12, 15-22

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

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

1. ☒ 청구항: 23-28
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 23-28은 치료에 의한 인체의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의
규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니
다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

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

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

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

이의신청에
관한 기재

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

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2017/004701

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2002-0044535 A	2002/06/15	CN 1200622 C CN 1357253 A HK 1044690 A1 JP 2002-171948 A JP 3437167 B2 KR 10-0672141 B1 US 2002-0068124 A1 US 6733816 B2	2005/05/11 2002/07/10 2005/09/02 2002/06/18 2003/08/18 2007/01/19 2002/06/06 2004/05/11
US 2008-0096243 A1	2008/04/24	AU 2005-316310 A1 CN 101123885 A EP 1838164 A1 JP 2008-537533 A MX 2007-006946 A US 2006-0134310 A1 US 7332192 B2 WO 2006-066170 A1	2006/06/22 2008/02/13 2007/10/03 2008/09/18 2007/06/25 2006/06/22 2008/02/19 2006/06/22
JP 61-093124 A	1986/05/12	없음	
JP 2014-091686 A	2014/05/19	JP 6031328 B2	2016/11/24
KR 10-2007-0117151 A	2007/12/12	KR 10-1182358 B1	2012/09/11
KR 10-2017-0002846 A	2017/01/09	WO 2017-003086 A1	2017/01/05