



등록특허 10-2793449



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월10일

(11) 등록번호 10-2793449

(24) 등록일자 2025년04월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/01 (2006.01) A23L 33/18 (2016.01)

A61K 35/60 (2015.01) A61K 38/08 (2019.01)

A61K 38/10 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/012 (2013.01)

A23L 33/18 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2023-0173978

(22) 출원일자 2023년12월05일

심사청구일자 2023년12월05일

(56) 선행기술조사문헌

KR102184804 B1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

제주대학교 산학협력단

제주특별자치도 제주시 제주대학로 102 (아라일동, 제주대학교)

국립부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)

(72) 발명자

전유진

제주특별자치도 제주시 월산남2길 52번지 2동

현지민

제주특별자치도 제주시 돈내길 8, 이도센트레시티 804호 (이도일동)

유보미

부산광역시 남구 유엔로 246 102동 1105호

(74) 대리인

특허법인 태웅

전체 청구항 수 : 총 9 항

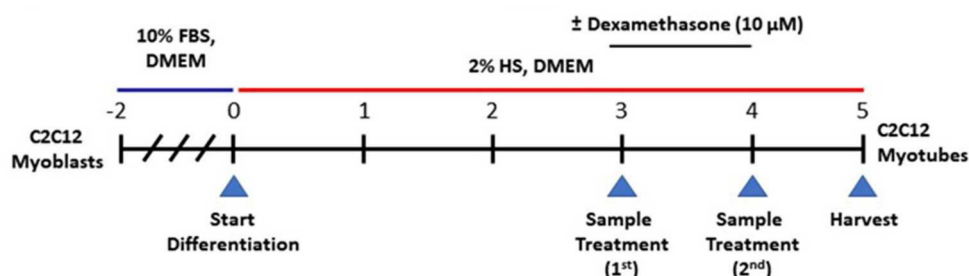
심사관 : 이동욱

(54) 발명의 명칭 광어 효소 가수분해물과 그 유효 펩타이드를 이용한 효소 가수분해물을 이용한 근력 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 광어 비가식부 효소 가수분해물과 그 유효 펩타이드를 이용한 근력 개선용 조성물을 개시한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 35/60 (2013.01)
A61K 38/08 (2021.08)
A61K 38/10 (2013.01)
A61P 21/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/316 (2013.01)
A23V 2250/543 (2013.01)
A23V 2300/28 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525014231
과제번호	202201283
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	해양수산부산물 바이오소재화 기술개발
연구과제명	광어가공부산물 유래 근력개선에 도움을 주는 건강기능식품 개별인정형 원료 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	제주대학교 산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2023.10.06

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

서열번호 1의 펩타이드 또는 서열번호 2의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 근력 개선용 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 조성물은 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 조성물은 약제학적 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16

서열번호 1의 펩타이드 또는 서열번호 2의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 노화로 인한 근감소증 개선용 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 조성물은 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 18

제16항에 있어서,

상기 조성물은 약제학적 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 19

서열번호 1의 펩타이드 또는 서열번호 2의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 근위축증 개선용 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 조성물은 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서,

상기 조성물은 약제학적 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 광어(*Paralichthys olivaceus*, Olive flounder) 효소 가수분해물과 그 유효 펩타이드를 이용한 효소 가수분해물을 이용한 근력 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

- [0003] 골근육(skeletal muscle)은 정상인의 체중의 약 40~50% 차지하는 우리 몸에서 가장 큰 조직이며, 운동과 호흡, 심장박동 등과 같은 필수적인 기능을 담당한다(Int J Biochem Cell Biol 37:1985-1996, 2005; Pharmacol Rev 61:373-393, 2009; Calcif Tissue Int 96:183-195, 2015). 이처럼 근육의 건강과 직결되는 기능 외에도 최근 사회 연결망의 발달로 심미적 요소를 강조하는 풍조 속에서 근육 증강에 관한 관심 또한 꾸준히 증가하고 있다(Int J Commun. 9:1588-1606, 2015).
- [0004] 일반적으로 50세 이상이 되면 해마다 1~2%씩 줄어들기 시작하여 80세가 되면 최대 근육량의 약 절반 정도로 그 양이 크게 감소하여 많은 노인들이 근감소증(sarcopenia) 또는 근위축증(muscle atrophy)을 겪게 되고, 이에 따른 신체기능의 감소, 장애 및 낙상 등으로 인한 삶의 질의 저하가 빈번히 일어나고 있다(Korean J Food and Nutr 4:133-139, 1991; J Nutr 127:990S-991S, 1997; Curr Aging Sci 1:182-191, 2008) 특히 세계적으로 평균 수명이 늘고 노인의 비율이 급증함에 따라 근감소증 및 근위축증은 중요한 노령질환으로 인식되고 있는 상황이다(Curr Opin Clin Nutr Metab Care 13:1-7, 2010).
- [0005] 인체의 근육량은 정상적으로 단백질의 합성과 분해가 균형을 이루어 일정하게 유지되지만, 단백질의 분해가 증가하거나 합성이 감소하는 상황이 발생하면 근위축 현상과 나아가 근감소증이 일어나게 된다. 암, 당뇨, 요독증, 만성 폐질환, 심부전 그리고 AIDS 등과 같은 만성 소모성 질환에서 흔히 관찰되지만, 패혈증이나 수술, 외상, 화상같은 급성 질환에서도 나타난다(Int J Biochem Cell Biol 37:2156-68, 2005).
- [0006] 근위축의 발생은 근섬유 단백질(myofibrillar protein)들의 분해를 촉진하는 Atrogin-1 및 Murf-1과 같은 단백질 분해효소 발현의 증가와 근육 관련 단백질 합성에 관여하는 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로의 억제가 관련된 것으로 보고되었다(*Am J Physiol Cell Physiol* 287:C834-843, 2004) 구체적으로 근위축 현상에서 마이오신(myosin)을 비롯한 근육 단백질을 분해하는 유비퀴틴-프로테아좀(ubiquitin-proteasome) 시스템이 활성화 되어 근육을 구성하는 단백질들의 분해가 가속화되고, 한편으로는 근육 관련 단백질 합성에 관여하는 PI3K-Akt-mTOR 신호전달 경로의 활성이 낮아지면서 근육단백질 합성의 억제가 함께 일어나는 것으로 확인되었다(*Proc Natl Acad Sci USA* 98:14440-14445, 2001; *J Biol Chem* 280: 2737-2744, 2005). 따라서 근위축을 효과적으로 저해하기 위해서는 단백질 분해경로에 관련되는 신호전달 경로를 억제할 뿐 아니라, 근육의 양적 증가와 근육세포의 활성화에 필수적인 단백질의 생합성에 관련된 신호전달 경로들을 상승조절(up-regulation)하는 것이 필요하다고 할 수 있다.
- [0007] 본 발명은 광어 비가식부 효소 가수분해물과 그 유효 펩타이드를 이용한 근력 개선, 노화에 따른 근감소증 개선 활성 등을 개시한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 광어 비가식부 효소 가수분해물과 그 유효 펩타이드를 이용한 근력 개선용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적이나 구체적인 목적은 이하에서 제시될 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명자들은 아래의 실시예에서 확인되는 바와 같이, 광어 비가식부 프로자임(Prozyme) 효소 가수분해물과 이로부터 확인된 2종의 유효 펩타이드(서열번호 1과 서열번호 2의 펩타이드)가 근력 개선시키고 동물모델에서 노화로 인한 근감소증을 개선시키며, 텍사메타손(Dexamethasone, Dex)으로 유도된 근위축증을 개선시킴을 확인함으로써 완성된 것이다.
- [0013] 본 발명은 이러한 실험 결과에 기초하여 제공되는 것으로, 일 측면에 있어서 본 발명은 광어 비가식부 프로자임(Prozyme) 효소 가수분해물, 서열번호 1의 펩타이드 또는 서열번호 2의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 근력 개선용 조성물로 파악할 수 있고, 다른 측면에 있어서는 광어 비가식부 프로자임(Prozyme) 효소 가수분해물, 서열번호 1의 펩타이드 또는 서열번호 2의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 노화로 인한 근감소증 개선용 조성물로 파악할 수 있으며, 또 다른 측면에 있어서는 광어 비가식부 프로자임(Prozyme) 효소 가수분해물, 서열번호 1의 펩타이드 또는 서열번호 2의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 근위축증 개선용 조성물로 파악할 수 있다.
- [0014] 본 명세서에서, 프로자임 효소는 아스페르길루스 오리제(*Aspergillus oryzae*)의 배양물이나 돼지의 췌장에서 얻

어지는 프로테아제로서 강한 엑소펩티다아제(exo peptidase) 및 엔도펩티다아제(endo peptidase) 활성을 가지고 있어 육류, 어류, 곡류 또는 1차 분해된 폴리펩타이드를 보다 작은 단위의 저분자량 펩타이드로 분해할 수 있는 효소를 말한다. 본 실시예에서는 상기 프로자임 효소로서 시판명 Prozyme 2000P((주)비전바이오캡, 성남, 대한민국)를 사용하였다.

- [0015] 또 본 명세서에서, 광어 비가식부는 가식부인 광어육을 제외한 부위, 바람직하게는 가식부인 광어육을 제외하고 또한 내장 부위를 제외한 부위를 의미한다. 일반적으로 이러한 부위는 머리, 껍질, 뼈를 포함할 것이다.
- [0016] 또 본 명세서에서 "유효성분"이란 단독으로 목적하는 활성을 나타내거나 또는 그 자체는 활성이 없는 담체와 함께 활성을 나타낼 수 있는 성분을 의미한다.
- [0017] 또 본 명세서에서, "근력 개선"은 근력 강화, 근육 증가 및/또는 근육 감소 억제를 포함하는 의미이다.
- [0018] 또 본 명세서에서, "노화로 인한 근감소증 개선"은 노화로 인한 근력 감소 회복이나 노화로 인한 근육의 감소의 회복을 의미한다.
- [0019] 또 본 명세서에서, "근위축증 개선"은 영양 결핍, 활동 저하, 암, 당뇨 등의 질환 등이 원인이 되어 발생하는 근위축증의 예방, 치료, 증상의 경감을 포함하는 의미이다.
- [0020] 본 발명의 조성물은 그 유효성분을 구체적 용도, 제형, 제품 형태 등에 따라 의도하는 근력 개선 활성이나 근위축증 개선 활성, 노화로 인한 근감소증 개선 활성 등을 나타낼 수 있는 한 임의의 양(유효량)으로 포함할 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량 % 내지 15 중량 % 범위 내에서 결정될 것이다. 여기서 "유효량"이란 그 적용 대상인 포유동물 바람직하게는 사람에게 의료 전문가 등의 제언에 의한 투여 기간 동안 본 발명의 조성물이 투여될 때, 근력 개선 효과나 근위축증 질환의 개선 효과, 노화로 인한 근감소증 개선 효과 등 의도한 의학적·약리학적 효과를 나타낼 수 있는, 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분의 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 조성물은 유효성분 이외에, 근력 개선 기능의 상승·보장을 위하여 또는 항스트레스 활성, 피로 개선 활성 등 유사활성의 부가를 통한 복용이나 섭취의 편리성을 증진시키기 위하여, 당업계에서 이미 안전성이 검증되고 해당 활성을 갖는 것으로 공지된 임의의 화합물이나 천연 추출물을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 화합물 또는 추출물에는 각국 약전(한국에서는 「대한민국약전」), 각국 건강기능식품공전(한국에서는 식약처 고시인 「건강기능식품 기준 및 규격」임) 등의 공정서에 실려 있는 화합물 또는 추출물, 의약품의 제조·판매를 규율하는 각국의 법률(한국에서는 「약사법」임)에 따라 품목 허가를 받은 화합물 또는 추출물, 건강기능식품의 제조·판매를 규율하는 각국 법률(한국에서는 「건강기능식품에관한법률」)에 따라 기능성이 인정된 화합물 또는 추출물이 포함된다. 예컨대 한국 「건강기능식품에관한법률」에 따라 '근력 개선'으로 기능성을 인정받은 오미자 추출물, 강황 뿌리 추출물, 저분자 유청 단백질 가수분해물 등과 '피로 개선'으로 기능성을 인정받은 발효생성 아미노산 복합물, 헛개나무 과병 추출물, 홍경천 추출물 등과, '항스트레스'로 기능성을 인정받은 L-테아닌, 아쉬아간다 추출물, 유단백가수분해물, 돌의 잎 추출물 등이 이러한 화합물 또는 추출물에 해당할 것이다.
- [0022] 이러한 화합물 또는 천연 추출물은 본 발명의 조성물에 그 유효성분과 함께 하나 이상 포함될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 조성물은 구체적인 양태에 있어서, 식품 조성물로서 파악할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 식품 조성물은 어떠한 형태로도 제조될 수 있으며, 예컨대 차, 주스, 탄산음료, 이온음료 등의 음료류, 우유, 요구르트 등의 가공 유류, 껌류, 떡, 한과, 빵, 과자, 면 등의 식품류, 정제, 캡슐, 환, 과립, 액상, 분말, 편상, 페이스트상, 시럽, 젤, 젤리, 바 등의 건강기능식품 제제류 등으로 제조될 수 있다.
- [0025] 또 본 발명의 식품 조성물은 법률상·기능상의 구분에 있어서 제조·유통 시점의 시행 법규에 부합하는 한 임의의 제품 구분을 띌 수 있다. 예컨대 한국 「건강기능식품에관한법률」에 따른 건강기능식품이거나, 한국 「식품위생법」의 식품공전(식약처 고시 「식품의 기준 및 규격」)상 각 식품유형에 따른 과자류, 두류, 다류, 음료류, 특수용도식품 등일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 식품 조성물에는 그 유효성분 이외에 식품첨가물이 포함될 수 있다. 식품첨가물은 일반적으로 식품을 제조, 가공 또는 보존함에 있어 식품에 첨가되어 혼합되거나 침윤되는 물질로서 이해될 수 있는데, 식품과 함께 매일 그리고 장기간 섭취되므로 그 안전성이 보장되어야 한다. 식품의 제조·유통을 규율하는 각국 법률(한국에서는 「식품위생법」임)에 따른 식품첨가물공전에는 안전성이 보장된 식품첨가물이 성분 면에서 또는 기능 면에서 한정적으로 규정되어 있다. 한국 식품첨가물공전(식약처 고시 「식품첨가물 기준 및 규격」)에서는 식품첨가물이 성분 면에서 화학적 합성품, 천연 첨가물 및 혼합 제제류로 구분되어 규정되어 있는데, 이러한 식품첨가물

은 기능 면에 있어서는 감미제, 풍미제, 보존제, 유효제, 산미료, 점증제 등으로 구분된다.

- [0027] 감미제는 식품에 적당한 단맛을 부여하기 위하여 사용되는 것으로, 천연의 것이거나 합성된 것 모두 본 발명의 조성물에 사용할 수 있다. 바람직하게는 천연 감미제를 사용하는 경우인데, 천연 감미제로서는 옥수수 시럽 고형물, 꿀, 수크로오스, 프룩토오스, 락토오스, 말토오스 등의 당 감미제를 들 수 있다.
- [0028] 풍미제는 맛이나 향을 좋게 하기 위하여 사용될 수 있는데, 천연의 것과 합성된 것 모두 사용될 수 있다. 바람직하게는 천연의 것을 사용하는 경우이다. 천연의 것을 사용할 경우에 풍미 이외에 영양 강화의 목적도 병행할 수 있다. 천연 풍미제로서는 사과, 레몬, 감귤, 포도, 딸기, 복숭아 등에서 얻어진 것이거나 녹차잎, 둥굴레, 대잎, 계피, 국화 잎, 자스민 등에서 얻어진 것일 수 있다. 또 인삼(홍삼), 죽순, 알로에 베라, 은행 등에서 얻어진 것을 사용할 수 있다. 천연 풍미제는 액상의 농축액이나 고형상의 추출물일 수 있다. 경우에 따라서 합성 풍미제가 사용될 수 있는데, 합성 풍미제는 에스테르, 알콜, 알데하이드, 테르펜 등이 이용될 수 있다.
- [0029] 보존제로서는 소듐 소르브산칼슘, 소르브산나트륨, 소르브산칼륨, 벤조산칼슘, 벤조산나트륨, 벤조산칼륨, EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산) 등이 사용될 수 있고, 또 유효제로서는 아카시아검, 카르복시메틸셀룰로스, 잔탄검, 펙틴 등을 들 수 있으며, 산미료로서는 연산, 말산, 푸마르산, 아디프산, 인산, 글루콘산, 타르타르산, 아스코르브산, 아세트산, 인산 등이 사용될 수 있다. 산미료는 맛을 증진시키는 목적 이외에 미생물의 증식을 억제할 목적으로 식품 조성물이 적정 산도로 되도록 첨가될 수 있다.
- [0030] 점증제로서는 현탁화 구현제, 침강제, 겔형성제, 팽화제 등이 사용될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 식품 조성물은 전술한 바의 식품첨가물 이외에, 기능성과 영양성을 보충, 보강할 목적으로 당업계에 공지되고 식품첨가물로서 안정성이 보장된 생리활성 물질이나 미네랄류를 포함할 수 있다.
- [0032] 그러한 생리활성 물질로서는 녹차 등에 포함된 카테킨류, 비타민 B1, 비타민 C, 비타민 E, 비타민 B12 등의 비타민류, 토코페롤, 디벤조일티아민 등을 들 수 있으며, 미네랄류로서는 구연산 칼슘 등의 칼슘 제제, 스테아린 산마그네슘 등의 마그네슘 제제, 구연산철 등의 철 제제, 염화 크롬, 요오드칼륨, 셀레늄, 게르마늄, 바나듐, 아연 등을 들 수 있다.
- [0033] 본 발명의 식품 조성물에는 전술한 바의 식품첨가물이 제품 유형에 따라 그 첨가 목적을 달성할 수 있는 적량으로 포함될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 식품 조성물에 포함될 수 있는 기타의 식품첨가물과 관련하여서는 각국 식품공전이나 식품첨가물 공전을 참조할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 조성물은 다른 구체적인 양태에 있어서는 약제학적 조성물로 파악될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 약제학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하여 당업계에 공지된 통상의 방법으로 투여 경로에 따라 경구용 제형 또는 비경구용 제형으로 제조될 수 있다. 여기서 투여 경로는 국소 경로, 경구 경로, 정맥 내 경로, 근육 내 경로, 및 점막 조직을 통한 직접 흡수를 포함하는 임의의 적절한 경로일 수 있으며, 두 가지 이상의 경로를 조합하여 사용할 수도 있다. 두 가지 이상 경로의 조합의 예는 투여 경로에 따른 두 가지 이상의 제형의 약물이 조합된 경우로서 예컨대 1차로 어느 한 약물은 정맥 내 경로로 투여하고 2차로 다른 약물은 국소 경로로 투여하는 경우이다.
- [0037] 약제학적으로 허용되는 담체는 투여 경로나 제형에 따라 당업계에 주지되어 있으며, 구체적으로는 「대한민국약전」을 포함한 각국의 약전을 참조할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 약제학적 조성물이 경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 현탁액, 웨이퍼 등의 제형으로 제조될 수 있다. 이때 적합한 담체의 예로서는 락토스, 글루코스, 슈크로스, 텍스트로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨 등의 당류, 옥수수 전분, 감자 전분, 밀 전분 등의 전분류, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 등의 셀룰로오스류, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 맥아, 젤라틴, 탈크, 폴리올, 식물성유, 에탄올, 그리세롤 등을 들 수 있다. 제제화할 경우 필요에 따라적절한 결합제, 윤활제, 붕해제, 착색제, 희석제 등을 포함시킬 수 있다. 적절한 결합제로서는 전분, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분페리스트, 젤라틴, 메틸셀룰로스, 소듐 카복시메틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 글루코스, 옥수수 감미제, 소듐 알지네이트, 폴리에틸렌 글리콜, 왁스 등을 들 수 있고, 윤활제로서는 올레산나트륨, 스테아르산나트륨, 스테아르산마그네슘, 벤조산나트륨, 초산나트륨, 염화나트륨, 실리카, 탈륨, 스테아르산, 그것의 마그네슘염과

칼슘염, 폴리테틸렌글리콜 등을 들 수 있으며, 봉해제로서는 전분, 메틸 셀룰로스, 아가(agar), 벤토나이트, 잔탄 검, 전분, 알긴산 또는 그것의 소듐 염 등을 들 수 있다. 또 희석제로서는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 소비톨, 셀룰로스, 글라이신 등을 들 수 있다.

[0039] 본 발명의 약제학적 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의 형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화할 경우 적합한 담체로서는 수성 등장 용액 또는 현탁액을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline)나 주사용 멸균수, 5% 텍스트로즈 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 경피 투여제로 제제화할 경우 연고제, 크림제, 로션제, 겔제, 외용액제, 파스타제, 리니먼트제, 에어로졸제 등의 형태로 제제화할 수 있다. 비강 흡입제의 경우 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 등의 적합한 추진제를 사용하여 에어로졸 스프레이 형태로 제제화할 수 있으며, 좌제로 제제화할 경우 그 담체로는 위텡솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 폴리테틸렌글리콜류, 카카오지, 라우린지, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르류, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트류, 소르비탄 지방산 에스테르류 등을 사용할 수 있다.

[0040] 약제학적 조성물의 구체적인 제제화와 관련하여서는 당업계에 공지되어 있으며, 예컨대 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)] 등을 참조할 수 있다. 상기 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주 된다.

[0041] 본 발명의 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 성별, 연령, 환자의 중증도, 투여 경로에 따라 1일 0.001mg/kg ~ 10g/kg 범위, 바람직하게는 0.001mg/kg ~ 1g/kg 범위일 수 있다. 투여는 1일 1회 또는 수회로 나누어 이루어질 수 있다. 이러한 투여량은 어떠한 측면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 아니 된다.

발명의 효과

[0043] 진술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 광어 비가식부 효소 가수분해물과 그 유효 펩타이드를 이용한 근력 개선용 조성물을 제공할 수 있다.

[0044] 본 발명의 조성물은 식품(특히 건강기능식품) 또는 약품으로 제품화될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 근육아세포의 근관세포로의 분화 방법에 대한 설명 및 시료에 의한 개선 효과를 측정한 방법에 대한 설명이다.

도 2는 근육아세포의 근관세포로의 분화능을 면역 형광염색 방법 및 면역블랏팅 방법으로 측정한 결과이다.

도 3 내지 도 8는 각각 노화로 인한 근감소증 동물모델 실험에서 실험조건에 대한 설명, 체중 등의 측정 결과, 약력 측정 결과, 지구력 측정 결과, 종아리 근육 등의 측정 결과 및 체성분 분석 결과 및 결과 및 종아리, 비복근, 가자미근 근육량 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 9 내지 도 11은 각각 텍사메타손 유도 근위축증 동물모델 실험의 프로토콜, 약력과 지구력 등의 측정 결과, 대퇴사두근 등의 근육량 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 12 내지 도 14는 각각 2종 펩타이드 처리에 의한 텍사메타손 유도 근관세포 위축 모델에서의 근관 위축 개선 효과 측정 결과, 2종 펩타이드 처리에 의한 단백질 신생합성 능력 측정 결과, 및 텍사메타손 유도 근위축 zebrafish 모델에서의 실험 프로토콜과 유영 활동성 개선 효과 측정 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0049] <실시예> 광어 비가식부 프로자임 효소 가수분해물의 제조 및 근력 감소, 근 손실 및 근 위축증 개선 활성

[0050] 1. 광어 비가식부 프로자임 효소 가수분해물의 제조

[0051] 광어 비가식부(내장과 가식부인 광어육을 제외한 나머지 머리, 껍질, 뼈 등)를 분쇄하고 이 분쇄물 100 kg (습중량)에 2 배 중량의 정제수를 가한 후 Prozyme 2000P 효소 (food-grade enzyme, ㈜비전바이오켐, 대한민국)를

기질량 1%(w/w)으로 첨가하여 55℃에서 4 시간 동안 pH 6.80~7.50 조건에서 가수분해를 진행하였다. 그 후 반응물에 4.0~4.5%의 구조토를 투입 교반하여 프리코트 필터프레스 여과 (10 μ m pore-sized)를 이용하여 여과하고 그 여과액을 효소 불활성화를 위해 95℃, 30분 가열한 뒤, 해당 효소 가수분해물을 30~32 brix %의 범위로 75℃의 온도에서 3시간 동안 감압 농축하였다. 농축물(“OFBP”)은 -20℃에서 냉동된 뒤 보관 및 운송되었고 이후 20℃의 상온에서 해동한 뒤 20 brix %로 희석하여 분무 건조(Inlet: 170℃, Outlet: 80℃)되었다. 분말은 냉장 보관하며 실험에 사용하였다.

2. 유효 펩타이드의 제조

상기 광어 비가식부 가수분해물에서 근력 개선 활성을 보이는 유효 펩타이드 아래 서열의 2종을 확인하고, 이들 2종 펩타이드를 펩톤사(대한민국)에 제조를 의뢰하여 준비하였다.

펩타이드 1: NH₂-QSGERGEVGPA-COOH (서열번호 1)

펩타이드 2: NH₂-GASGERGEVGPA-COOH (서열번호 2)

3. 광어 비가식부 프로자임 효소 가수분해물(OFBP)의 근력 감소, 근 손실 및 근위축증 개선 활성 실험

3.1 In vitro 세포실험

3.1.1. 실험 방법

(1) 근육아세포의 근관세포 분화 촉진능 평가

시험관 분석 방법으로써 사용된 쥐로부터 유래된 C2C12 근육아세포는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구매하였으며, 해당세포는 DMEM (10% FBS, 1% P/S) 조건의 배양액에서 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양되었다. C2C12 근육아세포로부터 근관세포 형태로 분화를 유도하기 위하여, 12 well-plate ((주)에스피엘, 대한민국)에 1x10⁵ cells/well의 양으로 세포를 옮겨 100%의 밀집도로 배양 하였다. 이후 48시간 추가배양을 진행한 후, DMEM (2% HS, 1% P/S) 분화유도 배양액으로 교체한 뒤 6일째 되는 날까지 매 2일간 새로운 DMEM (2% HS, 1% P/S) 배양액으로 교체하여 근관세포로 분화를 완료하였다 (도 1).

근관세포로 분화 유도 후 3일째 날에 다시 분화유도 배양액에 특정 농도의 OFBP와 근관 위축 유도 합성 glucocorticoids 약물인 dexamethasone을 10 μ M의 농도로 2일간 처리하여 근육위축에 대한 OFBP의 개선효과를 면역블랏팅 시험법과 면역 형광 염색 시험법으로 평가하였다.

이와 별도로 근관세포 형태의 분화 촉진능을 평가하기 위해서, C2C12 근육아세포 분화 유도 배양액에 특정 농도의 OFBP를 혼합하여 처리하여 6일간 배양하여 평가하였다. 근관이 형성된 세포는 Myotube Analyzer software (Noe, S., Corvelyn, M., Willems, S. et al. The Myotube Analyzer: how to assess myogenic features in muscle stem cells. Skeletal Muscle 12, 12 (2022))를 활용하여 근관 직경(Myofibril diameter), 근관 분포(Myofibril coverage), 총 세포핵 수(total nuclei) 요소를 체크하여 근관의 생성 정도를 평가하였다 (도 1).

(2) 면역블랏팅(Immunoblotting) 시험법

C2C12 세포는 OFBP의 지시된 농도로 48시간 동안 Dex (10 μ M)의 유/무에서 처리되었다. 세포는 미리 저온의 PBS로 세척되었고, radioimmunoprecipitation assay (RIPA) 버퍼 (Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 세포내 단백질을 용출하기 위하여 세포를 용해하였다. 이후 용출된 단백질의 정량을 위하여 BCA assay (Bio-Rad, USA)가 사용되었고, 정량된 단백질은 10% SDS-PAGE 전기영동 기법을 이용하여 분자량에 따라 분리되었다. 전기영동이 완료된 겔은 Nitrocellulose membrane (Amersham, USA)을 이용하여 트랜스퍼 되었고, 5%의 소 혈청 알부민 (BSA, Sigma-Aldrich)에서 1 시간 동안 membrane의 blocking에 사용되었다. 이것은 4° C에서 하룻밤 동안 1차 항체와 함께 반응되었다. 이후 PBST 세척을 10 분마다 3 번 반복하였으며 2차 항체 (Rabbit Anti-Goat IgG Antibody, HRP conjugate, Sigma-Aldrich, USA) (5% skimmed milk, 1:10,000)에 상온에서 1시간 반응되었다. 이후 해당 membrane의 PBST 세척을 10 분 마다 5번 반복하였으며 Immunoblot Chemiluminescent Reagent에 반응하는 단백질의 형광신호를 FUSION SOLO (Vilber Lourmat, Paris, France)를 사용하여 검출하였다.

(3) 면역 형광 염색(Immunofluorescent staining) 시험법

분화된 C2C12 근육세포는 투명한 바닥의 48 well-plates에서 처리 후, 세포는 4% Paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, USA)를 고정용액으로 사용하여 세포를 1시간 동안 고정하였다. 이어서, 4℃ 100% 메탄올 (Daejung,

Korea)을 사용하여 15초 동안 투과성을 증가시켰고, 5분마다 1X PBS+0.1% Tween 20 (PBST) (Sigma-Aldrich, USA)로 세 번 세척하였다. Blocking은 1% BSA (Sigma-Aldrich, USA)에 2.252%의 glycine (Daejung, Korea)이 포함된 상태에서 30분 동안 수행되었고, 이어서 MyH 1차 항체 (1% BSA, 1:500) (Santacruz Biotechnology, USA)로 실내 온도에서 1시간 동안 반응시켰다. PBST 세척을 다시 5분마다 3번 반복한 후 Alexa Fluor 647이 결합된 2차 항체 (1:1000) (Invitrogen, USA)는 glycine을 미포함한 조건으로 PBST의 1% BSA에 준비되었고, 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. PBST 세척을 다시 5분 간 3번 반복하였다. DAPI (300 nM in PBST) (Sigma-Aldrich, USA) 염색은 핵 염색을 위해 3분 동안 수행되었고, PBST로 3번 씩 3분 간 세척하였다. 마지막으로 PBS 1 mL을 첨가하여 현미경으로 관찰하였다. 근관 직경(Myofibril diameter), 근관 분포(Myofibril coverage), 총 세포핵 수(total nuclei)는 Myotube Analyzer software (Noë, S., Corvelyn, M., Willems, S. et al. The Myotube Analyzer: how to assess myogenic features in muscle stem cells. *Skeletal Muscle* 12, 12 (2022))를 사용하여 평가되었다. 모든 이미지는 Lionheart 자동 현미경 (Agilent, USA)으로 촬영되었다.

3.1.2. 실험 결과

(1) C2C12 근육아세포 분화 촉진능 평가

면역블랏팅 방법과 면역 형광염색방법으로 얻은 결과를 이미지 및/또는 그래프로 도 2에 나타내었다. 도 2을 참조하여 보면, OFBP는 농도 의존적으로 근육아세포를 근육세포(myocyte)로의 분화를 증가시켰으며 이는 근관 직경(myofibril diameter), 근관 분포(myotubes coverage)의 증가도를 통해 확인되었다. 또 전체 핵 수(total nuclei)를 농도 의존적으로 증가시켰음을 확인하였는데 이는 OFBP의 처리가 근육아세포의 증식을 유도하였음을 시사하는 결과이다. 또 근관세포의 분화에 관여하는 것으로 알려진 mTOR(Mammalian target of rapamycin)의 활성화된 형태인 p-mTOR의 발현도를 농도 의존적으로 증가시켰다. 본 연구에서 식약처로부터 지구력 향상에 도움을 주는 건강기능식품 원료로 인정받은 Maca는 기존에 보고된 근육아세포 분화 촉진 능을 바탕으로 본 실험에서 양성대조군으로 사용되었다 (Yi, D.; Yoshikawa, M.; Sugimoto, T.; Tomoo, K.; Okada, Y.; Hashimoto, T. Effects of Maca on Muscle Hypertrophy in C2C12 Skeletal Muscle Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 6825. <https://doi.org/10.3390/ijms23126825>).

3.2 노화로 인한 근감소증 동물모델 실험

3.2.1 실험 방법

본 실험을 위해, 13개월 된 C57BL/6J 수컷 마우스는 각각 한국기초과학지원연구원(KBSI) 노화동물 모델 센터 (광주, 한국)에서 구입하였다. 모든 노화 동물모델은 2주 동안 실험실 환경에 적응되었다. 실험 동물은 조명 12 시간, 온도 $22 \pm 5^{\circ}\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$ 의 조건에서 유지되었다. 모든 마우스 그룹은 음식과 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 유지하였다. 실험 동물에 적용된 케이지는 실험동물복지를 위하여 일주일에 한 번 교체되었다. 사용한 케이지는 세척후 알코올 소독과 UV 살균을 통하여 세균 감염을 예방 및 청결한 상태로 유지되었다.

13개월 된 노화 유도 근감소증 마우스 모델 그룹에 대해 일정한 체중 ($39.0 \pm 1.1\text{g}$)의 마우스는 다음과 같은 5개 그룹으로 분배되었다: (1) 노화 대조군, (2) OFBP 50 mg/kg 그룹, (3) OFBP 100 mg/kg 그룹, (4) OFBP 150 mg/kg 그룹, (5) Oxymetholone (Oxy, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 50 mg/kg 그룹. 그룹이 구분되어진 직후 시료의 투여에 앞서 모든 그룹에 속한 마우스의 악력이 평가되었다. 투여가 시작되고 (1) 그룹은 생리식염수를 (2-5) 시료와 동일한 부피로 경구 투여받았다 (도 3). 그룹의 속한 노화 마우스는 OFBP와 Oxy는 일련의 농도 조건으로 5주, 42일 동안 하루에 한 번 경구 투여되었다. 동물을 희생하기 앞서, 모든 그룹 마우스의 악력은 악력 측정기 (Ugo Basile, Italy)를 사용하여 측정되었다.

마우스의 악력을 측정하기 위해 Ugo Basile사의 grip strength meter를 사용하였다. 마우스의 악력은 실험동물의 야행성을 고려하여 야간에 측정하였고, 초기 악력(Initial grip strength)과 최종 악력(End grip strength)은 5주 투여 개시 전, 5주 투여 완료 후 각각 측정하였다.

또한 지구력(Time to Exhaust) 평가는 트레드밀 (HAVARD apparatus, Spain)을 사용하여 다음 조건과 일정에 따라 평가되었다: 'Exploring (0cm/sec, 0 min); Pre run_1 (5cm/sec, 1 min); Pre run_2 (10cm/sec, 2 min); Running_1 (15cm/sec, 7min); Running_2 (25cm/sec, 10min); Running_3 (30cm/sec, 10 min); Running_4 (35cm/sec, ∞)'. 전기 충격 세기: 0.2, 경사율: 5', 측정요소: 달리기 시간, 달리기 거리, 충격 시간 및 충격 횟수. 모든 마우스는 'Running_4' 조건에서 전기 충격 격자로부터 5 cm 영역을 벗어나지 못하는 순간 달리기를 종료하고 트레드밀로부터 사육 케이지로 복귀시켰다.

- [0076] 또한 체성분 분석(Dual Energy X-ray, Absorptiometry(DEXA)은 *InAnalyzer DEXA* (MEDIKORS[®], 대한민국) 장비를 이용하여 실험 동물을 Isoflurane ((주)하나제약, 대한민국)을 이용해 호흡 마취한 뒤, 근육량(Lean mass, g), 지방량(Fat mass, g), 골 무기질 함량(BMC, g), 골밀도(BMD, g/cm²)을 측정하였다.
- [0077] 또한 종아리 근육 (calf muscle), 비복근(gastrocnemius muscle) 및 가자미근 (soleus muscles)의 두께는 동물 윤리에 따른 적절한 방법으로 해부하여 해당 조직을 적출한 뒤 촬영하였으며 이를 ImageJ software (NIH, USA)를 이용하여 측정하였으며 무게는 전자저울을 이용하여 측정한 뒤 기록되었다. 연구 프로토콜은 제주대학교 동물 실험 윤리 위원회의 승인을 얻은 후 규정 및 정책에 따라 수행되었다 (승인 번호: 2022-0005).
- [0078] **3.2.2 실험 결과**
- [0079] 도 4에서 시료(OFBP)의 투여는 그룹 간 체중에서 유의적 차이가 없는 것을 확인했으며 5주간 처치한 강제 수영에 의해서 그룹 간 동일한 폭으로 투여 전 대비 체중의 감소가 일어났으나 식이량에서는 마찬가지로 그룹 간 차이가 없음을 확인하였다.
- [0080] 도 5에 나타난 시기에 따른 시료 비투여군 노화 근감소증 마우스에서의 악력 측정 결과는 투여 기간에 따라 지속적으로 감소하는 것으로 나타났으며 시료(OFBP)의 농도 의존적인 투여 시 노화로 인한 악력 약화가 저해되는 것을 확인하였다.
- [0081] 도 6에 나타난 지구력 측정 결과, 시료(OFBP) 투여군에서 지칠 때까지의 시간 (Time to Exhaust (min))과 총 이동거리 (Distance (m))에서 시료 농도 의존적인 증가가 시료 비투여군에 비해 나타나는 것을 확인하였다.
- [0082] 도 7에 나타난 종아리 근육 (도 7(A 및 B)), 비복근 (도 7(C 및 D)), 가자미근 (도 7(C 및 E)), 각각의 두께 및 무게 측정 결과에서 시료(OFBP)의 농도 의존적 처리는 이들 주요 근육 조직의 유의적인 증가를 나타내었다.
- [0083] 도 8에 나타난 DEXA 체성분 측정 결과는 노화 마우스에서 시료(OFBP)의 정기적, 농도의존적 투여가 대표적 뼈 건강 지표인 골 무기질 함량(BMC), 골밀도(BMD)에서 큰 변화 없이 (도 8(A, B 및 C)), 전신 및 하지(Hindlimb) 근육량(Lean mass)을 증가시키고 반비례적으로 해당 부위의 지방량(Fat mass)을 감소시키는 것을 확인하였다 (도 8(D, E 및 F)).
- [0084] 이들 결과를 참조하여 보면, 노화로 인해 근감소증이 유도된 마우스에서 시료(OFBP)의 투여량에 비례하여 비투여군에 비해 악력, 지구력 및 근육량의 개선이 이루어졌음을 되었음을 알 수 있다.
- [0085] **3.3 덱사메타손 유도 근위축증 동물모델 실험**
- [0086] **3.2.1 실험 방법**
- [0087] 본 실험을 위해 3개월 된 수컷 C57BL/6J 마우스는 각각 크로넥스 (성남, 대한민국)에서 구입되었다. 실험동물은 2주 동안 실험실 환경에 적응시켰다. 실험 동물은 조명 12시간, 온도 22±5℃, 습도 55±5%의 조건에서 유지되었다. 모든 마우스 그룹은 음식과 물을 자유롭게 섭취할 수 있는 조건에서 유지되었다. 실험 동물 케이지는 일주일에 한 번 교체되었으며 알코올 소독과 UV 살균이 병행되어 추가 세균 감염을 예방하였다.
- [0088] Dex 유발 근육 위축 마우스 모델은 일정한 체중 (24.7±3.8 g)을 따라 6개의 하위 그룹으로 구분된 : (1) Control 그룹, (2) Dex-Blank 그룹, (3) Dex-OFBP 50 mg/kg 그룹, (4) Dex-OFBP 100 mg/kg 그룹, (5) Dex-OFBP 200 mg/kg 그룹, (6) Dex-Oxymetholone (Oxy) 50 mg/kg 그룹. Oxy 용량은 이전 연구를 기반으로 적용되었다 (Kim, Joo & Ku, Sae-Kwang & Han, Min & Kim, Ki & Kim, Sung & Gi Young, Kim & Hwang, Jinah & Kim, Byung & Kim, Cheol & Choi, Yung. (2015). The administration of Fructus Schisandrae attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy in mice. International journal of molecular medicine. 36. 10.3892/ijmm.2015.2200). Control 그룹을 제외한 모든 마우스는 2주 동안 등쪽 피하 경로로 Dex (1 mg/kg)이 주입되었다. OFBP 또는 Oxy는 생리식염수에 녹여져 5주 간 경구투여되었으며, Dex는 0.1% DMSO 생리식염수를 이용하여 용해되어 표시한 농도로 경구투여되었으며 (1), (2) 그룹에 대해서는 동일한 양의 생리식염수를 주입하였다 (도 9).
- [0089] 마우스의 악력을 측정하기 위해 Ugo Basile사의 grip strength meter를 사용하였다. 마우스의 악력은 실험동물의 야행성을 고려하여 야간에 측정하였고, 악력(grip strength)은 5주 투여 완료 후 측정하였다.
- [0090] 또한 지구력(Time to Exhaust) 평가는 트레드밀 (HAVARD apparatus, Spain)을 사용하여 다음 조건과 일정에 따라 평가되었다 : 'Exploring (0cm/sec, 0 min); Pre run_1 (5cm/sec, 1 min); Pre run_2 (10cm/sec, 2 min);

Running_1 (15cm/sec, 7min); Running_2 (25cm/sec, 10min); Running_3 (30cm/sec, 10 min); Running_4 (35cm/sec, ∞)'. 전기 충격 세기: 0.2, 경사율: 5', 측정요소: 달리기 시간, 달리기 거리, 충격 시간 및 충격 횟수. 모든 마우스는 'Running_4' 조건에서 전기 충격 격자로부터 5 cm 영역을 벗어나지 못하는 순간 달리기를 종료하고 트레드밀로부터 사육 케이지로 복귀시켰다.

[0091] 또한 종아리 근육 (calf muscle), 비복근(gastrocnemius muscle) 및 가자미근 (soleus muscles)의 두께는 동물 윤리에 따른 적절한 방법으로 해부하여 해당 조직을 적출한 뒤 촬영하였으며 이를 ImageJ software (NIH, USA)를 이용하여 측정하였으며 무게는 전자저울을 이용하여 측정한 뒤 기록되었다.

[0092] 3.3.2 실험 결과

[0093] 측정 결과, 2주간 텍사메타손 처치로 인해 식이량에는 변화가 없는 상태에서 유의적인 체중 감소가 나타났으며 (도 10 (A 및 B)), 시료(OFBP)의 농도의존적 처리는 텍사메타손에 의해 위축된 악력과 지구력을 유의적으로 회복시켰고 (도 10 (C 및 D)) 이는 혈청 내 근육 성장인자인 IGF-1의 회복에 관여함으로써 나타난 것임을 확인하였다 (도 10 (E)). 또한 시료 투여군에서는 유의적인 혈청 내 피로물질 생성량의 감소를 확인하였다 (도 10 (F, G, 및 H)).

[0094] 도 11에 나타난 다리근육을 구성하는 주요 근육조직인 대퇴사두근(quadriceps), 비복근(gastrocnemius) 및 가자미근(soleus)의 근육량 측정 결과 텍사메타손에 의한 근육량의 감소를 유의적으로 개선함을 확인하였으며 (도 11 (B, C 및 D)), 대퇴사두근(quadriceps), 비복근(gastrocnemius) 및 가자미근(soleus)의 두께 측정 결과 시료 투여군에서 이와 같은 개선이 관찰되었다 (도 11 (E, F 및 G)). 이들 결과를 참조하여 보면 텍사메타손으로 유도된 근위축 마우스 모델에서 실시예의 가수분해물은 투여 농도에 비례하여 악력, 지구력, 대퇴사두근 등의 근육량을 증가시킴을 알 수 있다.

[0095] 4. 2중 펩타이드의 근력, 근 손실 및 근 위축증 개선 활성 실험

[0096] 4.1 In vitro 세포실험

[0097] 4.1.1 실험 방법

[0098] 시험관 분석 방법으로써 사용된 쥐로부터 유래된 C2C12 근육아세포는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구매하였으며, 해당세포는 DMEM (10% FBS, 1% P/S) 조건의 배양액에서 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양되었다. C2C12 근육아세포로부터 근관세포 형태로 분화를 유도하기 위하여, 12 well-plate (SPL, 대한민국)에 1x10⁵ cells/well의 양으로 세포를 옮겨 100%의 밀집도로 배양하였다. 이후 48시간 추가배양을 진행한 후, DMEM (2% HS, 1% P/S) 분화유도 배양액으로 교체한 뒤 6일째 되는 날까지 매 2일간 새로운 DMEM (2% HS, 1% P/S) 배양액으로 교체하여 근관세포로 분화를 완료하였다 (도 1).

[0099] 근관세포로 분화 유도 후 3일째 날에 다시 분화유도 배양액에 특정 농도의 OFBP 또는 OFBP 유래 2중 펩타이드 (QSGERGEVGPA, GASGERGEVGPA) 또는 양성대조군 Maca를 각각 근관 위축 유도 합성 glucocorticoids 약물인 텍사메타손 (dexamethasone)을 10 μM의 농도로 2일간 처리하여 근육위축에 대한 OFBP 유래 2중 펩타이드의 개선효과를 면역블랏팅 시험법과 면역 형광 염색 시험법으로 평가하였다.

[0100] 이와 별도로 근관세포 형태의 분화 촉진능을 평가하기 위해서, C2C12 근육아세포 분화 유도 배양액에 특정 농도의 OFBP를 혼합하여 처리하여 6일간 배양하여 평가하였다. 근관이 형성된 세포는 Myotube Analyzer software (Noë, S., Corvelyn, M., Willems, S. et al. The Myotube Analyzer: how to assess myogenic features in muscle stem cells. Skeletal Muscle 12, 12 (2022))를 활용하여 근관 직경(Myofibril diameter), 근관 분포(Myofibril coverage), 총 세포핵 수(total nuclei), 분기점 수(branching points) 요소를 체크하여 근관의 생성 정도를 평가하였다.

[0101] 이와 별개로 근육아세포의 근관세포로의 분화 유도시 단백질 신생합성이 활발히 일어나게 되는데, 단백질 신생합성에 핵심적으로 관여하는 t-RNA가 신생 합성된 단백질에 부착되어있는 원리를 이용하여 t-RNA의 유사체인 10 μM의 Puromycin을 1시간 처리하여 단백질 신생합성도를 평가하는 표면반응분석법 (SUnSET; Surface Sensing of Translation) assay 실험을 진행하였다.

[0102] 4.1.2 실험 결과

[0103] 근관 위축을 유도하는 텍사메타손을 C2C12 근육아세포에 처리하고 시료에 의한 분화능을 면역블랏팅 방법과 면

역 형광염색방법으로 평가하여 그 결과를 도 14에 나타내었다. 도 14를 참조하여 보면, 시료(OFBP 유래 펩타이드 2종-QSGERGEVGPA, GASGERGEVGPA)가 농도 의존적으로 덱사메타손 처리로 감소한, 근육아세포의 근육세포(myocyte)로의 분화 정도를 개선시켰으며 이는 시료(OFBP 유래 펩타이드 2종-QSGERGEVGPA, GASGERGEVGPA) 처리 시 근관 직경(myofibril diameter)과 근관 분포(myotubes coverage), 분기점(Branching point) 수를 개선도, 덱사메타손 처리에 의한 전체 세포 핵 수(total nuclei) 감소의 개선효과를 통해 확인하였다.

[0104] 도 13에서 SuNSET assay 실험 결과 Puromycin 타겟 면역블랏팅시 관찰된 유의적인 증가 패턴은 OFBP와 OFBP 유래 펩타이드 2종-QSGERGEVGPA, GASGERGEVGPA 처리시 단백질 합성도의 유의적인 증가를 확인하였다.

[0105] 본 연구에서도 식약처로부터 지구력 향상에 도움을 주는 건강기능식품 원료로 인정받은 Maca는 기존에 보고된 근육아세포 분화 촉진 능을 바탕으로 양성대조군으로 사용되었다 (Yi, D.; Yoshikawa, M.; Sugimoto, T.; Tomoo, K.; Okada, Y.; Hashimoto, T. Effects of Maca on Muscle Hypertrophy in C2C12 Skeletal Muscle Cells. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 6825. <https://doi.org/10.3390/ijms23126825>).

[0106] 4.2 동물모델 실험

[0107] 4.2.1 실험 방법

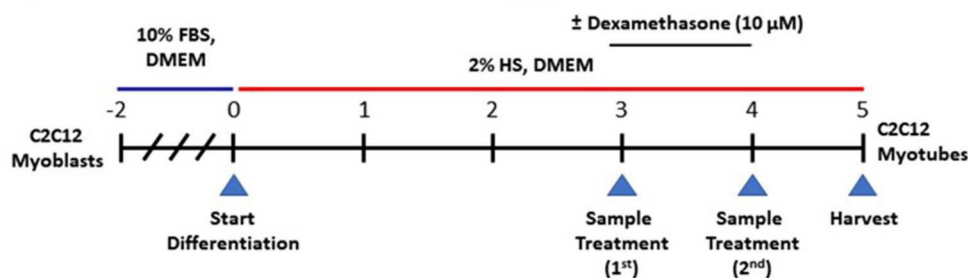
[0108] 덱사메타손(Dex)로 유발된 근위축증 zebrafish 모델은 일정한 그룹 체중 ($7.08 \pm 0.41g$)을 보이는 5개 그룹으로 나누었다: (1) Control 대조군, (2) Dex 유발 Blank 그룹, (3) 효소 처리물(OFBP) (3%) 처리 그룹, (4) QSGERGEVGPA (0.005%) 처리 그룹, (5) GASGERGEVGPA (0.005%) 처리 그룹 (도 14). 모든 그룹은 zebrafish를 위한 권장 전용 사료에 표기된 시료를 혼합하여 먹이로써 공급하였다. 근위축증 유발을 위해 zebrafish는 10일 간 Dex 자극처리를 통해 유도되었으며 시료가 포함된 식단은 Dex 노출 전 3일 전에 개시되었다. Zebrafish의 유영 활동을 통한 근위축증 유발 또는 개선평가를 위해 카메라로 15분간 촬영한 후 해당 영상을 Ethovision XT (Noldus, 네덜란드) 분석프로그램을 사용하여 분석하였으며 이때 어류의 유영능력과 관련된 행동 지표들인 총 유영 이동 거리(Total distance moved), 평균 유영 속도(Mean velocity), 유영 가속도(Acceleration), 유영 지속 시간(Time duration) 등을 동시 평가하였다 (도 14).

[0109] 4.2.2 실험 결과

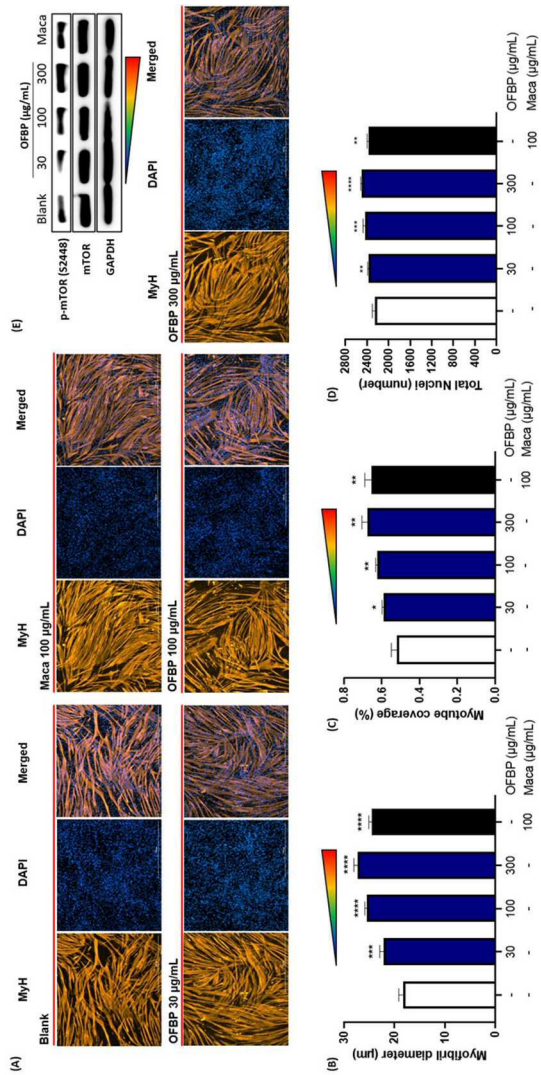
[0110] 유영 속도(Mean velocity), 총 유영 이동 거리(Total distance moved), 유영 가속도(Acceleration), 유영 지속 시간(Time duration)은 도 14에서 확인되는 바와 같이 Dex 유발 Blank 그룹에서 대조군보다 유의적으로 감소하였고 시료 투여군(OFBP 및 2종 펩타이드 투여군)에서 유의적으로 유영 및 탐색능력의 회복을 나타냈다.

도면

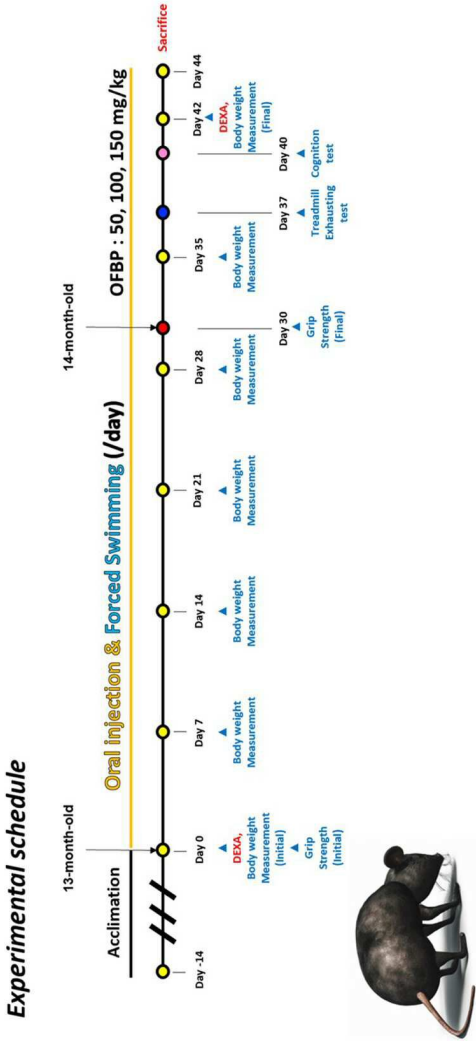
도면1



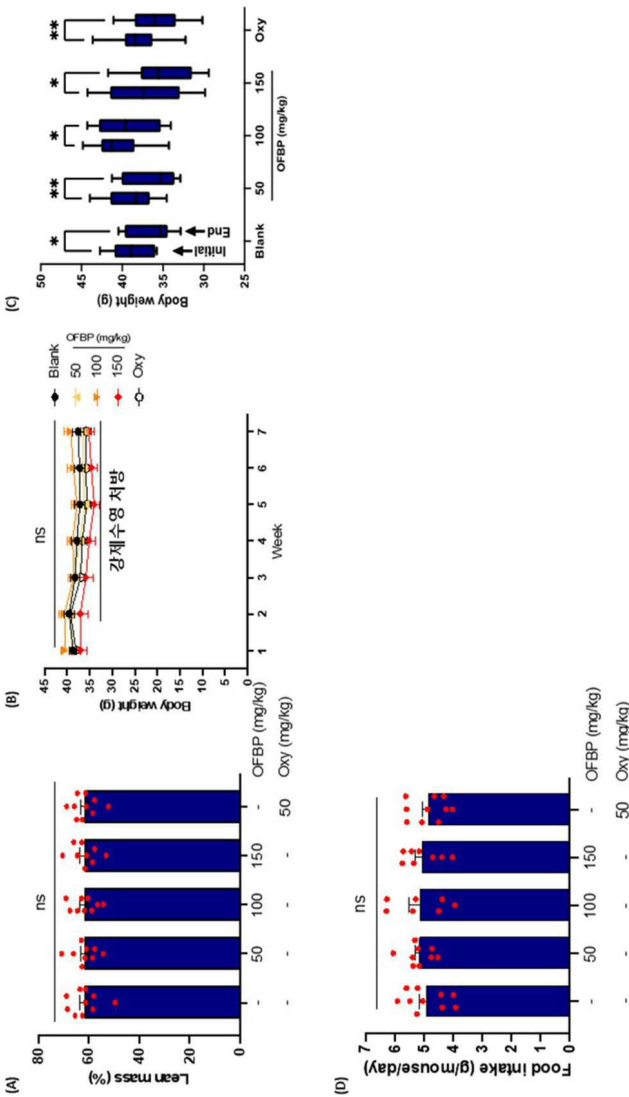
도면2



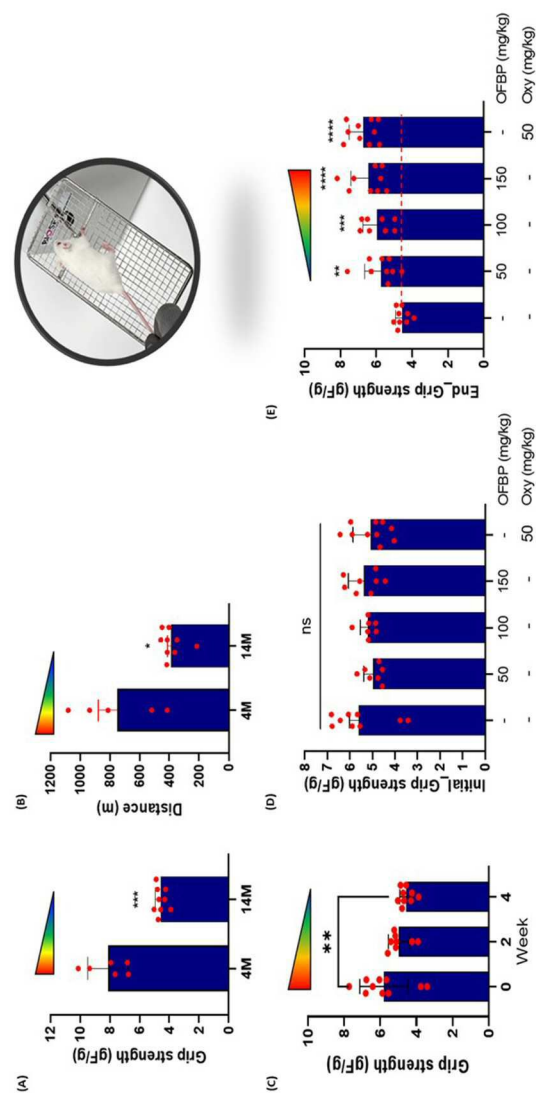
도면3



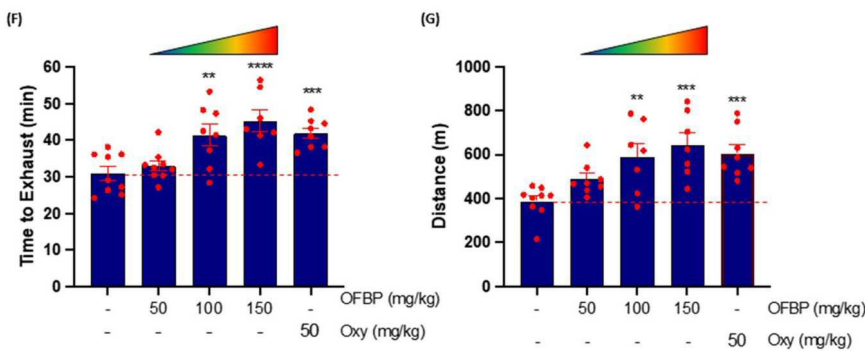
도면4



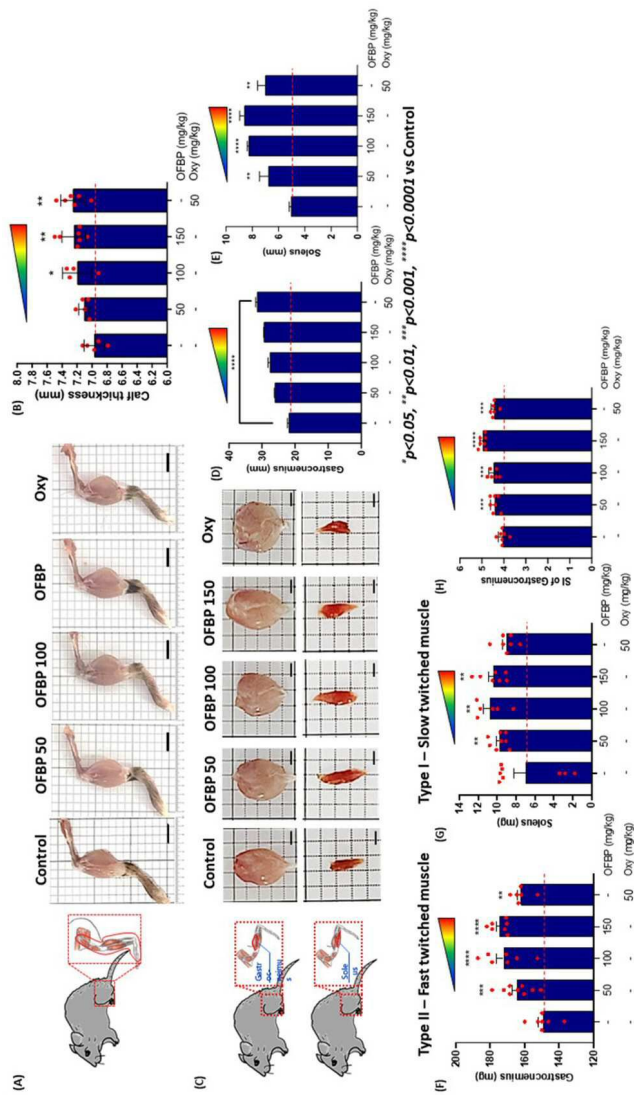
도면5



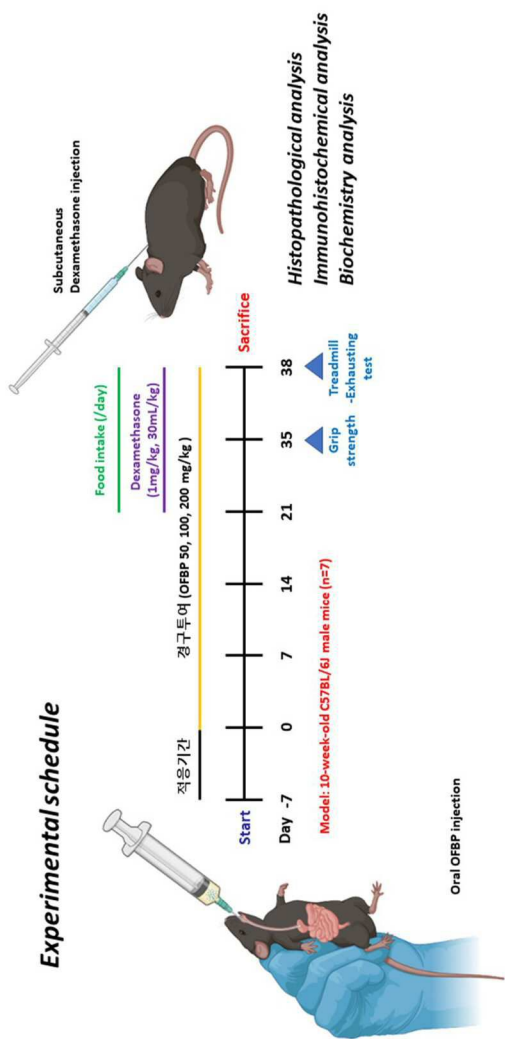
도면6



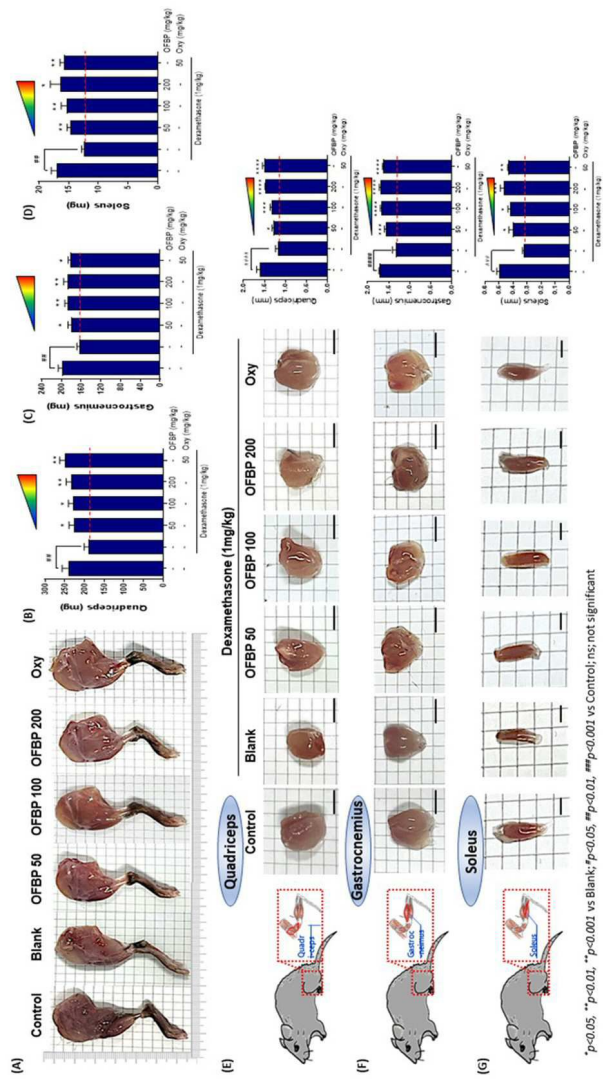
도면7



도면9



도면11



도면14

