



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0022766
(43) 공개일자 2020년03월04일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/077 (2010.01) A23K 20/168 (2016.01)
A23L 33/10 (2016.01) A61K 31/4745 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 5/0658 (2013.01)
A23K 20/168 (2016.05)</p> <p>(21) 출원번호 10-2018-0098811
(22) 출원일자 2018년08월23일
심사청구일자 2019년04월17일</p> | <p>(71) 출원인
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)</p> <p>(72) 발명자
박성섭
대전광역시 유성구 과학로 125</p> <p>염태현
대전광역시 유성구 과학로 125</p> <p>(74) 대리인
제일특허법인(유)</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 11 항

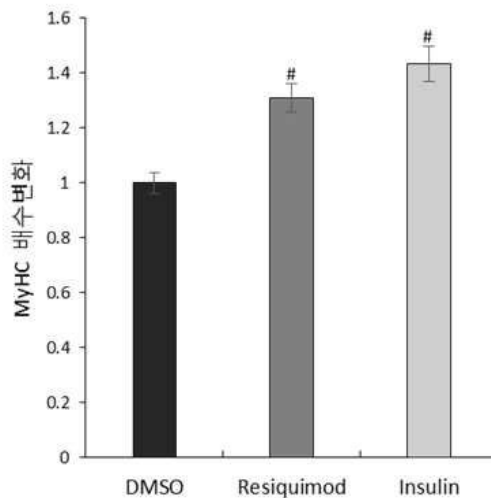
(54) 발명의 명칭 레지퀴모드 (resiquimod) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 근력약화 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 레지퀴모드 (resiquimod) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 근원세포의 분화 촉진용 조성물, 근력 약화 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 근력 약화 관련 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물, 근력강화용 조성물 및 근력 강화용 사료 또는 사료 첨가제에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 이용한 근원세포의 분화 촉진 방법, 분화된 근원세포의 제조방법 및 근력 약화 관련 질환의 치료방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

- A23L 33/10 (2016.08)
- A61K 31/4745 (2013.01)
- A61P 21/00 (2018.01)
- A23V 2002/00 (2013.01)
- A23V 2200/316 (2013.01)
- C12N 2501/999 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	KGM3141824
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	국가과학기술연구회
연구사업명	주요사업(2015-2018)
연구과제명	근골격계 노화 인자 발굴 및 제어기술 개발사업
기여율	1/1
주관기관	한국생명공학연구원
연구기간	2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

레지퀴모드 (resiquimod) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 근원세포 (myoblast)의 분화 촉진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 농도는 0.01 내지 20 μM 인 것인, 조성물.

청구항 3

레지퀴모드 (resiquimod) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제외 근원세포에 처리하는 단계를 포함하는 근원세포의 분화 촉진 방법.

청구항 4

레지퀴모드 (resiquimod) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제외 근원세포에 처리하여 근원세포를 분화시키는 단계를 포함하는 분화된 근원세포의 제조방법.

청구항 5

레지퀴모드 (resiquimod) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 근력 약화 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 근력 약화 관련 질환은 근감소증, 근위축증, 근육 퇴행 위축 (muscle dystrophy), 또는 심위축증인, 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 조성물은 근원세포에서 근세포로의 분화를 촉진하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 8

레지퀴모드 (resiquimod) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 근력 약화 관련 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 질환은 근감소증, 근위축증, 근육 퇴행 위축 (muscle dystrophy) 또는 심위축증인, 조성

물.

청구항 10

레지퀴모드 (resiquimod) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 근력강화용 조성물.

청구항 11

레지퀴모드 (resiquimod) 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 근력 강화용 사료 또는 사료 첨가제.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 레지퀴모드 (resiquimod) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 근원세포의 분화 촉진용 조성물, 근력 약화 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 근력 약화 관련 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물, 근력강화용 조성물 및 근력 강화용 사료 또는 사료 첨가제에 관한 것이다.
- [0002] 또한, 본 발명은 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 이용한 근원세포의 분화 촉진 방법, 분화된 근원세포의 제조방법 및 근력 약화 관련 질환의 치료방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0004] 근력의 약화를 유발하는 질환은 노화와 함께 진행되는 근감소증 (sarcopenia), 단백질 대사의 불균형이나 근육 사용 감소에서 유발되는 근위축증 (muscle atrophy), 기아, 소모성질환 (암 등), 노화와 함께 진행되는 심위축증 (acardiomyopathy) 등이 있다.
- [0005] 근감소증 (sarcopenia)은 노화가 진행되는 동안 근육량 (skletal muscle mass) 감소에 따른 근력의 저하를 일컫는다. 근감소증에서는 가장 큰 특징인 근육량의 감소뿐만 아니라, 근섬유의 종류 변화도 관찰된다. 나이가 들어 가면 타입 1과 타입 2가 비슷한 비율로 감소하는데 반해, 근감소증이 오면 타입 2의 근섬유 두께에는 큰 변화가 없지만 타입 1 근섬유 두께는 눈에 띄게 감소한다. 이러한 근감소증은 노인들 사이에서 일어나는 노쇠와 기능 장애를 유발한다고 보고되고 있다 (Roubenoff R., *Can. J. Appl. Physiol.* 26, 78-89, 2001).
- [0006] 근감소증은 다양한 요인에 의해 유발되나, 각각의 요인들에 대한 연구는 아직 미진하다. 성장 호르몬의 감소 또는 신경학적 변화 (neurological change), 생리활성 (physical activity)의 변화, 대사의 변화, 성호르몬의 양 또는 지방이나 카타볼릭 싸이토카인 (catabolic cytokines)의 증가와 단백질의 합성과 분화의 균형 변화에 의해 유도된다 (Roubenoff R. and Hughes V.A., *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 55, M716-M724, 2000). 근감소증의 가장 큰 특징인 근육량 감소의 원인으로는 위성 세포의 활성화 (satellite cell activation) 감소가 중요한 원인으로 손꼽힌다. 위성 세포란, 기저막 (basement membrane)과 근섬유의 근 (sarcolemma) 사이에 위치하고 있는 작은 단핵 세포이다. 이들은 부상 또는 운동과 같은 자극에 의해 활성화되어 근원세포 (myoblast)로 증식하며, 분화가 진행되면 다른 세포와 융합되어 다핵의 근섬유를 형성한다. 따라서 위성 세포의 활성이 감소함에 따라 손상된 근육을 재생하는 능력이나 분화 신호에 대한 반응이 떨어지게 되고 그 결과 근육 형성이 저하된다.
- [0007] 근위축증 (Muscle atrophy)은 영양결핍이나 장기간 근육을 사용하지 않은 경우에 유발되는데 정상적인 단백질의 합성과 분해의 균형이 붕괴되어 단백질이 분해됨으로서 나타나게 된다.
- [0008] 한편, 심위축증 (acardiomyopathy)은 기아, 소모성질환 (암 등), 또는 노쇠했을 때 유발되는데 심근섬유는 마르고 가늘어 지고 핵은 농축되어 대소부동이 된다. 따라서 근속 (muscle fascicle)도 용적이 줄고 심장 전체가 작아지며 심외막하의 지방조직은 뚜렷하게 감소하고 관상동맥은 굵어진다. 심근섬유의 핵 양단에 갈색의 색소로서

소모성 색소 (리포푸스친)가 나타나고 지방조직의 감소와 함께 심장 전체가 갈색조를 나타낸다.

[0010] 근감소증과 같은 근력 약화 관련 질환의 치료방법으로는 크게 3 가지 방법이 알려져 왔다. 첫 번째는 운동이다. 운동은 단기적으로 골격근의 단백질 합성 능력을 증가시키며, 노인들의 근육의 힘이나 운동성을 증가시킨다고 보고되고 있다. 그러나 장기적 치료방법에 부적절하다 (Timothy J. Doherty, *J. Appl. Physiol.* 95, 1717-1727, 2003). 두 번째는 약물치료로서 테스토스테론 (Testosterone) 또는 아나볼릭 스테로이드 (anabolic steroid)의 사용이 가능하나 이는 여성에게는 남성화를 유도하며, 남성의 경우 전립선 증상 (prostate symptoms) 등 부작용을 나타낸다. 다른 승인된 처방법으로 DHEA (dehydroepiandrosterone)와 성장 호르몬이 있는데 SARMs (Selective Androgen Receptor Modulators)을 포함하는 부위에서 치료법으로 가능하다는 연구가 보고된 바 있다 (D.D. Thompson, *J. Musculoskelet Neuronal Interact* 7, 344-345, 2007). 또한 식이요법이 치료법으로 알려져 있지만 영양평가에 의하면 영양실조나, 현대 식습관은 적당한 총체질량 (total body mass)을 유지하기 위해 부적절하다.

[0011] 최근에는 위성 세포를 분리하여 체외에서 분화시킨 후 체내에 도입시키는 줄기세포치료법 (stem cell therapy) 과 직접 체내의 위성 세포를 활성화하여 근육 분화 (myogenesis)를 촉진시켜 근육을 유지하거나 강화시키는 방법이 근감소증과 같은 근력약화를 치료할 수 있는 방법으로 대두되고 있다 (Shihuan Kuang, and Michael A. Rudnicki, *Trends in Molecular Medicine* 14, 82-31, 2008). 따라서 근력약화 관련 질환을 치료하기 위해 보다 근본적이며 부작용이 없는 치료방법으로 근원세포를 분화하는 방법이 요구되며, 이에 따라 근원세포의 분화를 촉진할 수 있는 물질의 개발이 필요한 실정이다.

[0013] 이에, 본 발명자들은 근원세포의 분화를 촉진함으로써 근육량을 증가시키고, 근육기능을 효과적으로 회복시키는 근력 약화 관련 질환 치료제를 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 조성물이 근원세포의 분화를 촉진하여 근력약화 관련 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 하나의 목적은 근원세포 (myoblast)의 분화 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 근원세포의 분화 촉진 방법을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 분화된 근원세포의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 근력 약화 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적은 근력 약화 관련 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 또 다른 목적은 근력강화용 조성물을 제공하는 것이다.

[0021] 본 발명의 또 다른 목적은 근력 강화용 사료 또는 사료 첨가제를 제공하는 것이다.

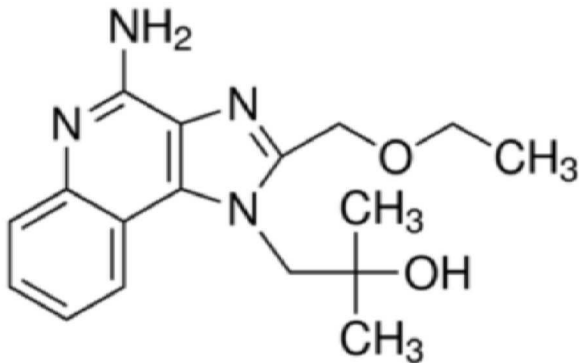
과제의 해결 수단

[0022] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0024] 상기의 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일구현예는 레지퀴모드 (resiquimod) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 근원세포 (myoblast)의 분화 촉진용 조성물에 관한 것이다.

[0026] 본 발명에서, "레지퀴모드"는 IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)의 명칭이 1-[4-amino-2-(ethoxymethyl)imidazo[4,5-c]quinolin-1-yl]-2-methylpropan-2-ol 인 화합물을 말하며, 근원세포의 분화촉진 효과가 있는 한 이의 유도체 역시 본 발명의 범주에 포함된다. 그 예로, 본 발명의 실시예에서 사용한 레지퀴모드는 화학식은 $C_{17}H_{22}N_4O_2$ 이고 분자량이 314.382 인 화합물이나, 이에 제한되지 않는다. 일반적으로 레지퀴모드는 Toll-유사 수용체(Toll-like receptor) 효능제(agonist)로서 항바이러스 및 항종양에 활성을 가지고, TNF- α , IL-6, IFN- α 와 같은 사이토카인 분비를 증가시켜 면역조절 효과를 보이는 것으로 알려져 있으나 근원세포 분화와의 연관성에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다. 본 발명자들은 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 근원세포 분화 용도가 있음을 최초로 규명하여 본 발명을 완성하였으며, 레지퀴모드의 구조는 하기 화학식 1에 나타난 바와 같다.

[0028] [화학식 1]



[0029]

[0031] 본 발명에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용 가능한 염"이란, 화합물이 투여되는 유기체에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는 화합물의 제형을 의미한다. 상기 약학적 염은, 약학적으로 허용되는 음이온을 함유하는 무독성 산부가염을 형성하는 산, 예를 들어, 염산, 황산, 질산, 인산, 브롬화수소산, 요오드화수소산 등과 같은 무기산, 타타르산, 포름산, 시트르산, 아세트산, 트리클로로아세트산, 트리플로로아세트산, 글루콘산, 벤조산, 락트산, 푸마르산, 말레인산, 살리신산 등과 같은 유기 카본산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 벤젠설폰산, p-톨루엔설폰산 등과 같은 설폰산 등에 의해 형성된 산부가염이 포함될 수 있다. 예를 들어, 약학적으로 허용되는 카르복실산 염에는, 리튬, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 등에 의해 형성된 금속염 또는 알칼리 토금속 염, 라이신, 아르지닌, 구아니딘 등의 아미노산 염, 디시클로헥실아민, N-메틸-D-글루카민, 트리스(히드록시메틸) 메틸아민, 디에탄올아민, 콜린 및 트리에틸아민 등과 같은 유기염 등이 포함될 수 있다.

[0033] 본 발명에서 사용되는 용어, "근원세포 분화"란, 단핵인 근원세포 (myoblast)가 융합을 통해 다핵의 근관 (myotube)를 형성하는 과정을 말하며, 분화가 거의 끝나는 후기에는 마이오신 중쇄 (MyHC, Myosin Heavy Chain)의 발현이 증가한다. 근원세포 분화와 관련하여, 근육 전구체 세포에 해당하는 근원세포는 자기복제 (self-renewal) 하는 경우에는 주로 Pax7⁺ 마커를 나타내며, 증식하는 경우 Pax7⁺/MyoD⁺를 나타내는 것으로 알려져 있다. 또한, 근관을 형성하는 분화단계의 세포는 예컨대 Pax7⁻ MyoD⁺ MyoG⁺ 마커를 이용하여 구분할 수 있다. 상기 근관을 형성하는 분화 초기단계의 세포는 마이오신 D (MyoD)와 같은 근원성 전사인자 (myogenic transcription factor)의 발현이 증가할 수 있고, 중기에는 마이오신 G (MyoG)가 증가할 수 있다.

[0034] 상기 조성물은 혈청이 포함된 DMEM 분화용 배지일 수 있으나, 근원세포의 분화를 촉진할 수 있는 배지 또는 조성물이면 제한없이 포함될 수 있다. 상기 조성물에 있어서, 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 일례로 0.01 μ M 내지 20 μ M의 농도로 포함될 수 있고, 0.1 μ M 내지 20 μ M의 농도로 포함될 수 있으며, 또는 1 μ M 내지 20 μ M의 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 조성물은 세포배양 또는 분화에 필요한 부가적인 물질을 더욱 포함할 수 있다.

- [0035] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 분화용 배지 (DM)에 레지퀴모드를 1, 2, 5, 10 및 20 μM 의 농도별로 각각 처리한 후 세포 독성을 측정하였을 때, 레지퀴모드를 20 μM 로 처리한 경우에도 1.0 mM H_2O_2 를 처리한 값에 비하여 사멸 세포의 비율이 5 % 이내로 근세포 분화에 따른 독성이 매우 미미함을 확인하였는바 (도 4), 레지퀴모드는 세포에 미치는 독성이 거의 없이 분화를 촉진할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 일구현에는 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 근원세포에 처리하는 단계를 포함하는, 근원세포의 분화 촉진 방법에 관한 것이다. 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 상기에서 설명한 바와 같다. 구체적으로, 상기 근원세포의 분화 촉진 방법은 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 체외 또는 체내 근원세포에 처리하여 분화를 촉진할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 일구현에는 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 근원세포에 처리하여 근원세포를 분화시키는 단계를 포함하는 분화된 근원세포의 제조방법을 제공한다.
- [0040] 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 상기에서 설명한 바와 같다. 본 발명의 상기 제조방법은 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 체외 또는 체내 근원세포에 처리하여 근원세포를 분화시키는 단계를 포함하는 분화된 근원세포를 제조하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 레지퀴모드를 근원세포에 2 μM 의 농도로 처리한 후, 근원세포의 분화정도를 위상차 현미경 (Phase Contrast microscopy)으로 관찰한 결과, 음성 대조군 (DMSO)에 비해 분화가 촉진되어 근관이 다수 형성되는 것을 확인하였으며 (도 5), 면역세포화학법 및 웨스턴 블랏을 통해서도 근세포 분화 촉진 효과가 매우 높음을 확인하였다 (도 6 및 도 7).
- [0043] 따라서, 본 발명은 근관을 형성할 수 있으며 MYH3 단백질을 발현하는 분화된 근원세포를 체외 또는 체내에서 제조할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 일구현에는 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 근력 약화 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 농도는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0046] 본 발명에서 사용된 용어 "근력 약화"란 한 개 또는 그 이상의 근육의 힘이 감소된 상태를 의미한다. 상기 근력 약화는 어느 한 근육이나, 몸의 한쪽, 상지나 하지 등에 국한될 수도 있고, 전신에 걸쳐 나타날 수도 있다. 또한 근피로나 근육통을 포함하는 주관적인 근력 약화 증상은 이학적 검진을 통해 객관적인 방법으로 정량화될 수 있다.
- [0047] 본 발명에서 근력 약화 관련 질환이란 근력약화로 인해 발생할 수 있는 모든 질환을 의미하며, 구체적으로 체내 근세포 수가 감소하거나 위성세포 활성이 감소되어 근원세포의 분화능력이 감소 혹은 약화된 질환으로 근원세포 분화 촉진을 통해 예방, 개선 혹은 치료를 기대할 수 있는 질환을 말한다. 본 발명에서 근력 약화 질환은 예를 들어 근감소증, 근위축증, 근육 퇴행 위축(muscle dystrophy), 또는 심위축증을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0048] 따라서, 본 발명의 조성물은 근원세포의 분화 촉진을 통해 근감소증, 근위축증, 근육 퇴행 위축 (muscle dystrophy), 또는 심위축증의 예방 또는 치료용으로 사용될 수 있다.
- [0049] 구체적으로, 본 발명의 근감소증이란, 노화에 따른 점진적인 골격 근육량의 감소를 의미하는 것으로서, 직접적으로 근력의 저하를 유발하며 그 결과 각종신체기능의 감소 및 장애를 일으킬 수 있는 상태를 의미한다.
- [0050] 또한 근위축증은 사지의 근육이 거의 좌우대칭적으로 점점 위축되어 가는 것으로서, 척수에 있는 운동신경섬유 및 세포의 진행성 변성을 유발하여 근위축성 측삭경화증 (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)과 척수성 진행성 근위축증 (Spinal progressive muscular atrophy, SPMA)을 일으킬 수 있다.
- [0051] 근육 퇴행 위축 (muscle dystrophy)이란, 점진적인 근위축과 근쇠약이 나타나는 질환으로서, 병리학적으로 근육섬유의 괴사를 특징으로 하는 퇴행성 근육병증을 의미한다. 근세포막의 손상으로 근육섬유의 괴사와 퇴행과정을

거쳐 근력저하 및 위축이 발생하게 된다.

- [0052] 본 발명의 심위축증은 심장이 외부적이거나 내부적인 요인에 의해서 위축되어 가는 것으로서, 기아, 소모성질환, 노쇠했을때 심근섬유가 마르고 가늘어져 지방조직의 감소를 유발하는 심장의 갈색위축 증세를 일으킬 수 있다.
- [0053] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 상기 조성물의 투여에 의해 근육 약화 관련 질환의 발병을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0054] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 상기 조성물의 투여에 의해 근육 약화 관련질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0056] 본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위하여, 상기 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 벡스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0057] 본 발명의 약학적 조성물은 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 약학적 제형으로 제조될 수 있다. 제형의 제조에 있어서, 활성 성분을 담체와 함께 혼합 또는 희석하거나, 용기 형태의 담체 내에 봉입시키는 것이 바람직하다.
- [0058] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 일 예로 비경구용으로 제조할 수 있다. 비경구용 제형으로는 주사용, 도포용, 에어로졸 등의 스프레이 형일 수 있다.
- [0059] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0060] 주사형 제형으로 제제화하기 위해서는 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여용으로 제제할 수 있다.
- [0062] 본 발명의 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 약학적 조성물은 근력 약화 관련 질환이 발병한 개체 또는 발병 가능성이 있는 개체의 근력 강화가 필요한 부위에 직접 주입될 수 있으며, 체외 또는 체내 근원세포에 적용하여 분화된 근원세포를 제조한 후, 분화된 근원세포를 근력 약화 관련 질환이 발병한 개체 또는 발병 가능성이 있는 개체의 근력 강화가 필요한 부위에 주입할 수 있다.
- [0063] 또한, 상기 조성물에는 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 근력 약화 관련 질환의 예방 또는 치료에 방해가 되지 않는 한, 추가 성분 예를 들어, 근력 약화 관련 질환의 치료제로 알려져 있는 물질들이 포함될 수 있다.
- [0065] 구체적으로, 본 발명의 약학적 조성물은 근원세포의 분화를 촉진하는 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 레지퀴모드를 근원세포에 2 μ M의 농도로 처리한 후, 근원세포의 분화정도를 위상차 현미경 (Phase Contrast microscopy)으로 관찰한 결과, 음성 대조군 (DMSO)에 비해 분화가 촉진되어 근관이 다수 형성되는 것을 확인하였으며 (도 5), 면역세포화학법 및 웨스턴 블랏을 통해서도 근세포 분화 촉진 효과가 매우 높음을 확인하였다 (도 6 및 도 7). 이러한 결과를 통하여, 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 근원세포의 분화를 촉진하는데 효과적이며 근육 약화 관련 질환의 예방 및 치료에 유용할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0067] 본 발명의 또 다른 일구현에는 레지퀴모드 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 근력 약화 관련 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 근육 약화 관련 질환을 예방 또는 개

선하기 위하여 근육 약화 관련 질환의 발병 단계 이전 또는 발병 후, 질환 치료를 위한 약제와 동시에 또는 별개로서 사용될 수 있다. 레지퀴모드 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염 및 근육 약화 관련 질환은 상기에서 설명한 바와 같다.

- [0068] 구체적으로, 상기 식품 조성물은 근원세포의 분화를 촉진하는 것을 특징으로 한다.
- [0070] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"이란, 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0071] 또한, 본 발명의 식품 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 예컨대 15 중량% 이하, 또는 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0072] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스텍류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함 한다.
- [0073] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로스나 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.
- [0074] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.
- [0076] 본 발명의 또 다른 일구현에는, 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 근력강화용 조성물에 관한 것이다.
- [0077] 또한, 본 발명의 또 다른 일구현에는, 레지퀴모드 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 근력강화용 조성물에 관한 것이다.
- [0078] 본 발명의 용어, "근력강화"란 신체 수행의 강화, 최대 지구력의 강화, 근육량의 증가, 근육 회복의 강화, 근육 피로의 감소, 에너지 수지의 개선 또는 이들의 조합 효과를 말한다.
- [0079] 본 발명의 레지퀴모드 또는 이의 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염을 포함하는 근력강화용 조성물은 근원세포를 근육 세포로 분화시키는 능력을 통하여 근육량을 증가시켜 전체 근육량을 증가시킬 수 있으며, 최대 지구력이 강화되고, 이에 따라 신체 수행이 강화되고 근육 피로도 감소할 수 있다. 또한, 근육 세포가 빠르게 대체될 수 있기 때문에 근육의 손상에 대하여 빠르게 치유될 수 있다.
- [0080] 본 발명의 근력강화용 조성물은 투여를 위하여, 상기 레지퀴모드 또는 이의 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제는 상기 설명한 바와 같다.
- [0081] 또한, 본 발명의 근력강화용 조성물은 식품조성물 또는 식품첨가제 형태로 제조될 수 있으며, 특히 건강식품 조성물의 형태로 제조될 수 있다. 상기 식품조성물은 상기 설명한 바와 같다. 따라서, 본 발명의 근력 강화용 조성물은 노화에 의한 근육 감소뿐 아니라 일반인의 근육 생성, 근력 강화에 대한 보조제 등의 형태로 이용될 수 있다.

- [0083] 본 발명의 또 다른 일구현에는, 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 근력 강화용 사료 또는 사료 첨가제에 관한 것이다.
- [0084] 본 발명에서, “사료”란, 동물의 생명을 유지하는데 필요한 유기 또는 무기 영양소를 공급하는 물질을 의미한다. 상기 사료는 가축 등의 동물이 필요로 하는 에너지, 단백질, 지질, 비타민, 광물질 등의 영양소를 포함하며, 곡물류, 근과류, 식품가공부산물류, 조류, 섬유질류, 유지류, 전분류, 박류, 곡물부산물류 등의 식물성 사료 또는 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질 등의 동물성 사료가 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0085] 본 발명에서, “사료 첨가제”란, 동물의 생산성 향상이나 건강을 증진시키기 위해 사료에 첨가되는 물질을 의미하며, 특별히 이에 제한되지 않으나 성장촉진, 질병 예방 등을 위한 아미노산제, 비타민제, 효소제, 향미제, 규산염제, 완충제, 추출제, 올리고당 등이 더욱 포함될 수 있다.
- [0086] 상기 본 발명의 근력 강화용 사료 또는 사료 첨가제에 포함되는 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일례로 0.001 내지 1 % (w/w), 0.005 내지 0.9 % (w/w), 또는 0.01 내지 0.5 % (w/w)일 수 있다.
- [0088] 본 발명의 또 다른 일구현에는, 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 근력 약화 관련 질환의 치료방법에 관한 것이다.
- [0089] 근력 약화 관련 질환에 대해서는 상기 설명한 바와 같다.
- [0090] 본 발명에서 용어, "개체"란 근력 약화 관련 질환이 이미 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하고 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 조성물을 개체에게 투여함으로써, 상기 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다. 상기 개체는 개, 소, 말, 토끼, 생쥐, 랫트, 닭 또는 인간을 포함하는 포유류 전체를 의미하나, 상기 예에 의해 본 발명의 포유류가 한정되는 것은 아니다. 상기 개체는 인간을 제외한 개체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0091] 본 발명 조성물의 개별적인 투약의 최적량 및 투약 간격은 치료되고 있는 병의 성질 및 정도, 투여 제형, 경로 및 부위, 그리고 치료되고 있는 특정 환자의 나이와 건강상태에 의해 결정될 것이고, 의사가 궁극적으로 사용될 적절한 투약을 결정할 것이라는 것은 당해 분야의 통상의 기술자가 알 수 있을 것이다. 이러한 투약은 적절할 정도로 자주 반복될 수 있다. 부작용이 생긴다면, 보통의 임상 진료에 따라서 투여량 및 빈도를 변경하거나 또는 감소시킬 수 있다.
- [0092] 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

발명의 효과

- [0094] 본 발명에 따른 레지퀴모드 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 근원세포의 분화를 촉진하여 근관을 형성할 수 있으므로 근육 약화를 방지할 뿐만 아니라, 효과적으로 근육 기능을 개선할 수 있다. 따라서 이를 포함하는 약학적 조성물은 근육 약화 관련 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0096] 도 1은 레지퀴모드를 처리하였을 때 음성 대조군인 DMSO에 비해 마이오신 중쇄 (MyHC) 단백질의 배수변화 값이 높은 것을 In-Cell ELISA 분석을 통해 확인한 그래프이다.
- 도 2는 레지퀴모드를 C2C12 세포에 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 및 20 μ M의 농도로 각각 처리한 후 농도별 근세포 분화촉진 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 레지퀴모드를 분비형 루시퍼라아제 근원세포에 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 및 20 μ M의 농도로 각각 처

리한 후 농도별 루시페라아제 활성을 나타낸 그래프이다.

도 4는 레지퀴모드의 근세포 분화에 따른 독성을 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 레지퀴모드를 처리한 일차근원세포의 분화를 위상차현미경으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 레지퀴모드를 처리한 근원세포주 C2C12의 분화를 면역세포화학법으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 레지퀴모드를 처리한 근원세포주 C2C12에서의 마이오신 중쇄 (MyHC)의 발현을 웨스턴 블랏 (western blot)으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0097] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.

[0099] 실시예 1: 근원세포의 배양

[0101] 1-1. 일차 근원세포 분리 및 배양

[0102] 일차 근원세포를 분리하기 위하여 1 내지 5 일 된 생쥐를 70 % 에탄올로 세척한 후 CO₂를 사용하여 질식시켰다. 상기 실험쥐의 뒷다리 발목 윗부분과 무릎을 절단하여 1 X 인산완충용액 (phosphate-buffered saline, PBS)에 담그고, 멸균 상태의 핀셋으로 피부와 뼈를 제거하여 근육조직을 모았다. 모아진 근육조직을 1 X PBS로 3 번 세척한 후 잘게 조각을 내었다. 상기 조각난 근육조직에 1 ml 콜라게나제 (1.5 U/ml), 1 ml 디스파제 (dispase, 2.4 U/ml), 5 μl CaCl₂ (1 M)를 혼합한 효소용액을 첨가한 후 37 °C에서 30 분 동안 반응시켰다. 효소와 반응시킨 근육조직을 나일론 그물 (Nylon mesh, 80 μM)로 필터링하여 뼈 등을 걸러내고, 800 rpm에서 5 분 동안 원심 분리하여 세포를 수득하였다.

[0103] 상기에서 수득한 세포 (일차 근원세포)를 2 ml F10 배지 (Invitrogen)에 다시 풀어 100 mm 일반 배양용기로 옮긴 것을 P1이라 하였으며, 1 시간 간격으로 0.1 % 젤라틴이 코팅된 배양용기로 옮기는 과정을 P5까지 반복하였다. 상기 세포들은 37 °C에서 5 % CO₂가 포함된 배양기에서 배양하였으며, 2 일에 한 번씩 새로운 F10 배지로 교체해 주었다. 세포를 계대할 때는 0.005 % 트립신을 사용하여 세포를 배양용기에서 분리시켰고, 근원세포로 분화를 유도할 때에는 5 % 말 혈청 (horse serum)이 첨가된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen)을 사용하였다.

[0105] 1-2. 근원세포주 C2C12의 배양

[0106] C2C12는 C3H 종의 생쥐에서 얻은 근원세포주로서, 근세포 분화 연구에 널리 사용되고 있다.

[0107] 상기 C2C12 세포는 일반적인 세포 배양용 배지와 분화용 배지에서 각각 배양하였다. 정상적인 세포 배양용 배지 (GM, growth media)로는 10 % 어린 소혈청 (fetal bovine serum)이 첨가된 DMEM을 사용하였으며, 분화용 배지 (DM, differentiation media)로는 2 % 말 혈청이 포함된 DMEM을 사용하였다.

[0109] 실시예 2: 근원세포(myoblast)의 분화촉진 유도

[0111] 2-1. In-Cell ELISA를 이용한 분화 촉진 탐색

[0112] 일차 근원세포 (Primary myoblast)에서 발현되는 마이오신 중쇄 (myosin heavy chain, MyHC)의 단백질 양을 비교하기 위하여 In-Cell ELISA 방법을 실시하였다.

[0113] 0.1 % 젤라틴으로 코팅되어 있는 96-웰 플레이트에 웰당 5 x 10³ 개의 일차 근원세포를 접종하였고, 24 시간 후에 5 % 말 혈청이 첨가된 DMEM으로 바꿔 분화를 유도하였다. 24 시간 마다 DMSO (5 %) 또는 처리 농도의 화합물

(chemicals), 또는 인슐린이 포함된 DMSO (5 %)를 첨가한 새로운 배지로 교체하였다. 분화 후 3 일째에 배지를 제거하고, 100 μ l 파라포름알데하이드 (paraformaldehyde, 3.7 %)를 상온에서 15 분 처리하여 세포를 고정시켰다. 인산완충용액 (1X PBS)으로 세척을 한 후, 0.1 % 사포닌, 3 % triton X-100, 0.009 % 소듐 아자이드 (sodium azide)가 포함된 100 μ l 투과용 버퍼 (permeabilization buffer)를 상온에서 15 분간 처리하여 세포막에 구멍을 뚫었다. 상기 세포를 다시 1X PBS로 세척한 후, 0.1 % 알부민 (bovine serum albumin)이 포함된 100 μ l 블로킹 버퍼 (blocking buffer)로 상온에서 1 시간 처리하였다. 상기 세포를 1X PBS로 3 번 세척한 후, 1 : 500으로 희석된 1 차 항체 (SC-20641, Santa Cruz Biotechnology) 100 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2 시간 반응시켰다. 반응시킨 세포를 다시 1X PBS로 3 번 세척한 후, 1 : 10,000으로 희석한 2 차 항체 (Goat anti-Rabbit IgG-HRP) 100 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1 시간 반응시켰다. 상기 세포를 1X PBS로 3 번 세척한 후, 50 μ l TMB 용액 (Gen Depot #T3551)을 첨가하여 20 분 동안 반응시켰고, 50 μ l 정지용액 (stop solution, Gen Depot #T3552)을 첨가하여 반응을 멈추게 하였다. 상기 세포의 MyHC 단백질 수준을 분석하기 위하여 485 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 결과를 분석하였다.

[0114] 특히, 분화과정은 구체적으로 일차 근원세포의 배양배지를 분화배지로 교체한 후 3 일 동안 매일 새 분화배지로 배지를 교환함으로써 근육세포로의 분화를 유도하였다. 3 일 후 In-Cell ELISA 실험을 통해 MyHC 단백질 수준을 비교하였다.

[0116] 그 결과, 2 μ M 레지퀴모드의 분화촉진 효과는 MYH 배수변화 (fold change) 값이 1.30 (n = 3)으로, DMSO 처리군 (음성 대조군)과 비교하였을 때 현저히 증가하였고, 0.6 μ g/ml 인슐린 처리군 (양성 대조군)과 유사한 수준으로 확인되었다 (도 1).

[0117] 이러한 In-Cell ELISA 분석 결과를 통하여 레지퀴모드가 약물 운반체인 DMSO보다 MYH 배수변화 값이 높아 분화를 촉진하며, 그 촉진 정도는 근육세포 분화 유도 약물로 이미 보고된 인슐린의 촉진 정도와 유사함을 확인할 수 있었다.

[0119] **2-2. 레지퀴모드의 농도에 따른 분화 유도 효과 확인**

[0120] 상기 2-1에서 레지퀴모드의 근원세포 분화 촉진 효과를 확인함에 따라, 레지퀴모드를 근원세포에 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 및 20 μ M의 농도로 각각 처리한 후 MyHC의 양을 측정하였다(n = 3).

[0121] 레지퀴모드처리 방법은 상기 2-1에 기재된 방식과 동일하게 처리하였다.

[0122] 그 결과, 레지퀴모드는 1 μ M 농도에서 급격한 분화촉진 증가효과를 보였으며 20 μ M까지 분화촉진 효과가 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (도 2).

[0124] **2-3. 분비형 루시페라아제 리포터 시스템(Secreted luciferase reporter system)을 이용한 케노디옥시콜산의 근원세포 분화 유도 효과 확인**

[0125] 레지퀴모드의 근원세포의 분화 촉진능을 평가하기 위해, 분비형 미오게닌 루시페라제 분석 시스템(secreted luciferase reporter assay)을 사용하였다.

[0126] 루시페라아제 효소가 안정적으로 발현할 수 있는 분비형 루시페라아제 C2C12(secreted luciferase C2C12) 근원세포를 96-웰 플레이트에 웰당 5 x 10³ 개를 접종하였고, 24 시간 후에 5 % 말 혈청이 첨가된 DMEM으로 바꿔 분화를 유도하였다. 24 시간 마다 DMSO (5 %) 또는 처리 농도의 화합물 (chemicals), 또는 인슐린이 포함된 DMSO (5 %)를 첨가한 새로운 배지로 교체하였다. 분화 2일차에 C2C12 세포의 분화과정에서 분비된 루시페라아제 (luciferase) 효소를 포함하는 배지를 수집 하여 새로운 96-웰 플레이트에 각각 50 μ l씩 분주한 뒤, 루시페라아제 기질(luciferase substrate)인 코엘렌테라진(coelenterazine) 5 μ l씩 넣어 반응시킨 후, 생성되는 빛을 루미노미터(luminometer)를 이용하여 측정하였다.

[0127] 레지퀴모드를 근원세포에 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 및 20 μ M의 농도로 각각 처리한 결과, 레지퀴모드는 1 μ M 농도에서 급격한 분화촉진 증가효과를 보였으며 20 μ M까지 분화촉진 효과가 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (도 3).

[0129] **실시예 3. 레지퀴모드의 근원세포에 대한 세포독성 측정**

[0131] 레지퀴모드의 세포독성을 측정하기 위해 배양된 세포에서 세포독성에 관한 연구에 주로 사용하는 MTT (Tetrazolium-based colorimetric) 시험법을 사용하였다.

[0132] 세포 배양용 배지 (GM)를 사용하여 96-웰 플레이트에 웰당 5×10^3 개의 일차 근원세포를 접종하였고, 24 시간 후 분화용 배지 (DM)에서 레지퀴모드를 농도별 (1, 2, 5, 10 및 20 μM)로 각각 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. 각각의 시료가 포함된 플레이트에 2~5 mg/ml MTT 용액을 넣고 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에 4시간 방치하였다. 그 다음, MTT 용액을 제거하고 DMSO를 분주한 뒤 빛을 차단한 상태에서 플레이트를 10 ~ 30분 동안 충분히 흔들어서 주었다. 그 다음, 플레이트 리더(plate reader)를 이용하여 500nm ~600nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 완전한 세포사멸을 위한 대조군으로서 1 mM H₂O₂를 처리하였다. 세포 생존시에 생성되는 MTT 포르마잔(formazan) 수치를 DMSO 처리 대조군에 대한 비율로 표시하였다.

[0133] 그 결과, 일차 근원세포 세포의 분화 배지 (DM)에서 측정된 레지퀴모드의 세포 독성은 처리된 모든 농도에서 사멸 세포의 비율이 5% 이내로 나타나, 근세포 분화에 따른 독성이 매우 미미함을 확인하였다 (도 4).

[0135] **실시예 4: 레지퀴모드의 근원세포 분화 촉진 효과 확인**

[0137] **4-1. 위상차현미경 (Phase contrast microscopy)**

[0138] 레지퀴모드에 의한 일차근원세포에서 다량의 근관 (myotube) 형성을 확인하기 위하여, 0.1 % 젤라틴이 코팅된 덮개 유리에서 일차근원 세포(primary myoblast)를 약물전달체인 DMSO 및 레지퀴모드를 각각 2 μM 씩 처리하면서 3 일 동안 분화시킨 후 위상차현미경으로 관찰하였다. 그 결과 DMSO 처리 대조군에 비해 레지퀴모드를 처리하였을 때 근관이 많이 형성되는 것으로 보아, 레지퀴모드의 근원세포 분화 촉진 효과를 확인할 수 있었다(도 5).

[0140] **4-2. 면역세포화학염색법 (Immunocytochemistry)**

[0141] DMSO (음성 대조군) 및 레지퀴모드를 각각 처리하면서 C2C12 세포주의 분화를 유도시킨 후, 3 일째 되는 날 근세포 분화 정도를 비교하기 위해 MyHC에 대한 항체로 염색하여 단백질 발현을 확인하였다.

[0142] 구체적으로, 0.1 % 젤라틴이 코팅된 덮개 유리에서 C2C12 세포를 3 일 동안 분화시켰다. 세포를 1X PBS로 세척한 후, 3.7 % 파라포름알데하이드 (paraformaldehyde)로 상온에서 15 분간 고정 시키고, 1X PBS로 3 번 세척한 후, 투과용 버퍼 (permeabilization buffer)를 넣고 상온에서 15 분간 반응시켰다. 다시 1X PBS로 3 번 세척한 후 1 % BSA가 들어있는 PBST (blocking buffer, 0.5 % Tween 20이 포함된 PBS)로 30 분간 반응시켜 불특정한 항체 결합을 억제하였다. MyHC에 대한 1 차 항체 (SC-20641, Santa Cruz Biotechnology)를 블로킹 버퍼 (blocking buffer)에 1 : 500으로 희석하여 첨가한 후, 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 1X PBS로 3 번 세척한 후 블로킹 버퍼 (blocking buffer)에 1 : 5000으로 희석한 2 차 항체 (Goat anti-Rabbit IgG-HRP)를 첨가하여 상온에서 1 시간 동안 반응 시킨 후, 1X PBS로 3 번 세척하였다. 덮개 유리를 슬라이드 유리에 올리고 형광현미경으로 사진을 찍어 결과를 분석하였다.

[0144] 그 결과, DMSO 처리군에 비해 레지퀴모드 2 μM 을 처리하였을 때 MyHC의 발현이 매우 높음을 확인할 수 있었다 (도 6).

[0146] **4-3. 웨스턴 블랏 (Western blot)**

[0147] 배양용 배지에 C2C12 세포를 분주하여 24 시간 배양한 후 분화 배지에 각각 DMSO 및 레지퀴모드를 각각 2 μM 씩

매일 처리하면서 분화를 유도하였다. 분화 유도 3 일째에 세포를 수득하여 1200 rpm에서 3 분간 원심분리하였다. 상기 세포에 100 μ l 라이시스 버퍼를 첨가한 후 초음파 분해 (sonication)시키고, 3000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 수용성 단백질을 얻었고, 4X 샘플버퍼 (sample buffer)를 첨가하여 끓는 물에서 5 분간 반응시켰다. 10 μ g의 단백질을 12 % SDS-PAGE 겔에 로딩하여 전개한 후 왓맨 멤브레인 (Watman membrane)으로 옮겼다. 상기 멤브레인을 5 % 탈지유 (skim milk)로 1 시간 동안 상온에서 블로킹해주고, TTBS (0.03 % Tween20, Tris 2.42 g, NaCl 9 g, pH 7.4, 1 L)로 5 분씩 5 번 세척하였다. 5 % 탈지유가 포함된 TTBS에 1 차 항체를 1 : 500으로 희석하여 첨가한 후 상온에서 2 시간 반응시킨 다음, 다시 TTBS로 5 분씩 5 번 세척하였다. 다시 5 % 탈지유가 포함된 TTBS에 2 차 항체를 1 : 5000으로 희석하여 첨가한 후 상온에서 2 시간 반응시키고 TTBS로 5 분씩 5 번 세척한 후 ECL (Enhanced Chemiluminescent solution, Pierce)을 첨가하였다. 이후, 상기 멤브레인을 X-ray 필름에 노출시켜 단백질의 양을 확인하였다.

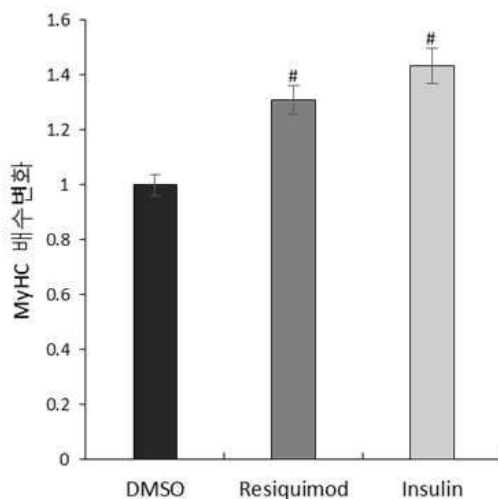
[0149] 상기 실험결과, 레지퀴모드를 처리하였을 때, 대조군인 DMSO 처리군에 비하여 동량의 단백질에 포함된 MyHC 단백질의 양이 매우 증가하였음을 확인하였다 (도 7).

[0151] 상기와 같은 실험결과를 통하여 레지퀴모드에 의한 근세포 분화촉진 효과가 매우 높음을 알 수 있었으며, 이를 이용하여 근력 약화관련 질환의 예방 또는 치료효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

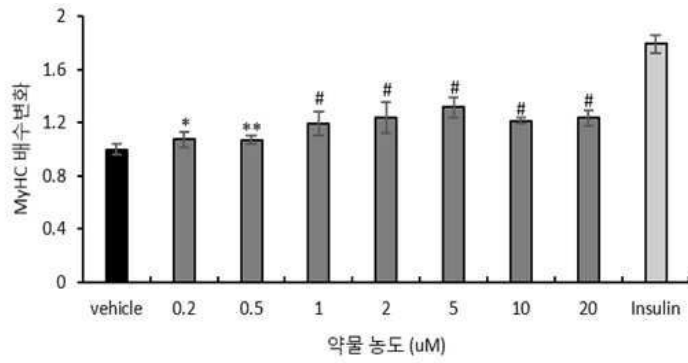
[0153] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

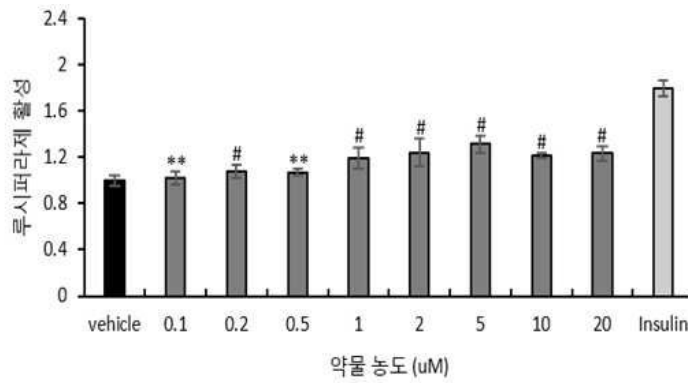
도면1



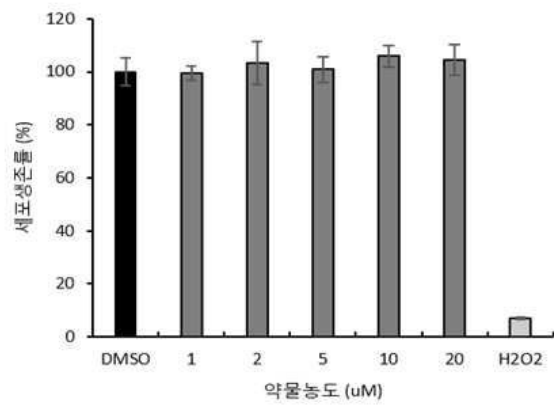
도면2



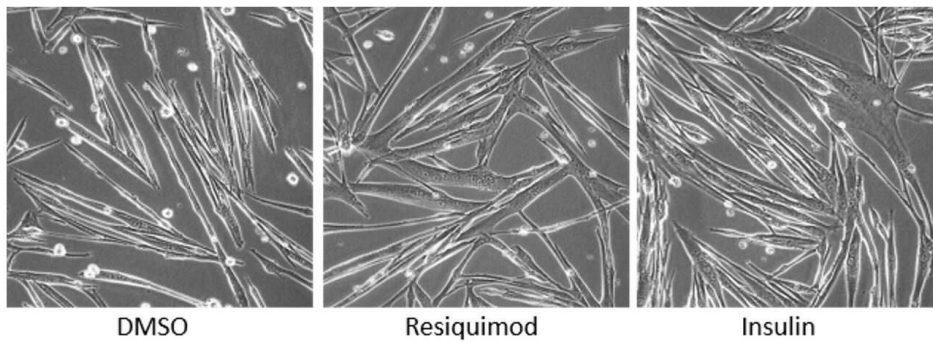
도면3



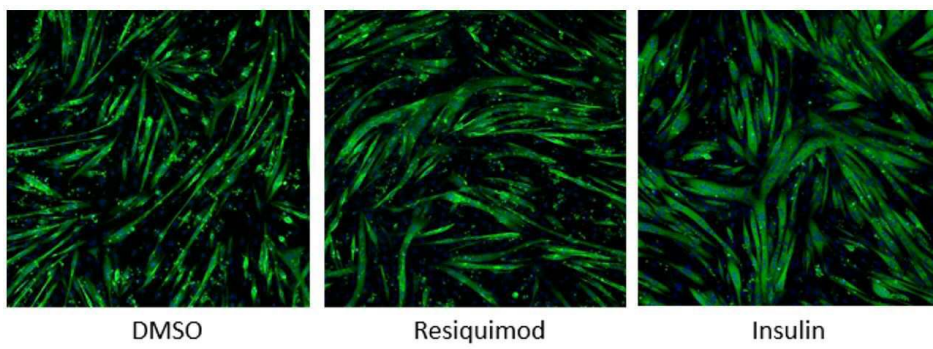
도면4



도면5



도면6



도면7

