

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 7월 2일 (02.07.2020)

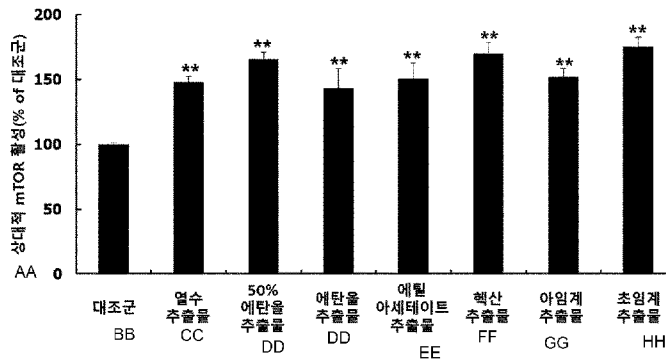


(10) 국제공개번호
WO 2020/139057 A2

- (51) 국제특허분류: A61K 36/79 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/018726
- (22) 국제출원일: 2019년 12월 30일 (30.12.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2018-0172731 2018년 12월 28일 (28.12.2018) KR
10-2019-0076670 2019년 6월 26일 (26.06.2019) KR
- (71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 03711 서울시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 황재관 (HWANG, Jae Kwan); 06544 서울시 서초구 신반포로 270, 136동 2501호, Seoul (KR). 김창희 (KIM, Changhee); 08775 서울시 관악구 신원로 26, 103동 203호, Seoul (KR). 유지희 (YOO, Ji Hee); 16876 경기도 용인시 수지구 죽전로 267, 704동 1002호, Gyeonggi-do (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, JO, 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 국내 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), 유

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING AND TREATING MUSCLE DISEASE OR IMPROVING MUSCLE FUNCTION, COMPRISING ILLICUM VERUM EXTRACT OR SHIKIMIC ACID

(54) 발명의 명칭: 팔각회향 추출물 또는 시킴산을 함유하는 근육 질환 예방 및 치료용 또는 근기능 개선용 조성물



AA ... Relative mTOR activity (% of control)
 BB ... Control
 CC ... Hot water extract
 DD ... Ethanol extract
 EE ... Ethyl acetate extract
 FF ... Hexane extract
 GG ... Subcritical extract
 HH ... Supercritical extract

(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing and treating a muscle disease or improving muscle function, comprising an Illicium verum extract and shikimic acid. The Illicium verum extract and shikimic acid according to the present invention have the effect of increasing activity of mTOR involved in muscle protein synthesis and reducing the mRNA expression of MuRF-1 and atrogin-1 involved in muscle protein degradation, and increase muscle mass and enhance muscle function, thereby being useful for preventing, treating, or alleviating various muscle diseases such as atony, muscular atrophy, muscular dystrophy, muscular degeneration, myasthenia, cachexia, and sarcopenia.

WO 2020/139057 A2

럼 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, 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:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 팔각회향 추출물 및 시킵산을 함유하는 근육 질환 예방 및 치료용 또는 근 기능 개선용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 팔각회향 추출물 및 시킵산은 근 단백질 합성에 관여하는 mTOR의 활성 증가 및 근 단백질 분해에 관여하는 MuRF-1 과 atrogen-1의 mRNA 발현을 감소시키는 효과가 있으며, 근육량을 증가시키고 및 근기능을 향상시켜, 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육 퇴화, 근무력증, 악액질(cachexia) 및 근육감소증(sarcopenia) 등의 각종 근육 질환 예방, 치료 또는 개선에 유용하게 이용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 팔각회향 추출물 또는 시킴산을 함유하는 근육 질환 예방 및 치료용 또는 근 기능 개선용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 팔각회향 추출물 또는 시킴산을 함유하는 근육 질환 예방 및 치료용 또는 근 기능 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 근위축(Muscle atrophy)이란 근육량의 점진적 감소에 의하여 발생하는 것으로, 근육의 약화 및 퇴행을 일컫는다(Cell, 119(7): 907-910, 2004). 근 위축은 비활동, 산화적 스트레스, 만성 염증에 의해 촉진되며 근육 기능과 운동 능력을 약화시킨다(Clinical Nutrition, 26(5): 524-534, 2007). 근 기능을 결정짓는 가장 중요한 요소는 근육량이며, 이는 단백질 합성과 분해의 균형에 의해 유지된다. 근 위축증은 단백질 분해가 합성보다 더 일어날 때 발생한다(The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 37(10): 1985-1996, 2005).
- [3] 근육 크기는 근육 내에서 일어나는 동화작용(anabolism)이나 이화작용(catabolism)을 유도하는 세포 내 신호전달 과정(signaling pathways)에 의해 조절되며 근 단백질의 분해보다 합성을 유도하는 신호전달 반응이 많이 일어날 경우 근 단백질 합성이 증가되는데, 이는 근 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).
- [4] 근 단백질 합성에 관여하는 인자들은 근 세포 내에서 phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt pathway의 자극을 기점으로 다운스트림 단백질(downstream proteins)을 인산화시킴으로써 단백질 합성을 유도한다. PI3K/Akt 신호전달에 의한 mammalian target of rapamycin (mTOR)의 활성화는 세포 내에서 다양한 성장 신호를 통합하는 중심 성장 신호전달 인자로 인정되고 있다. mTOR는 mRNA translation을 개시하는 두 인자, 4E-binding protein (4EBP1)과 phosphorylated 70-kDa ribosomal S6 kinase (p70S6K)를 활성화시킴으로써 근 단백질 합성을 유도하여 근육량 증가에 기여한다 (The Korea Journal of Sports Science, 20(3): 1551-1561, 2011; The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 43(9): 1267-1276, 2011). 반대로 전사 인자(transcription factor)인 forhead box (FoxO)가 세포질에서 핵 내로 이동하면 단백질 분해에 관여하는 E3 ubiquitin ligase인자 atrogen-1과 MuRF-1의 발현을 증가시킨다(Disease Models and Mechanisms, 6: 25-39, 2013). 이들의 발현량이 증가하면 근육 내의 단백질 분해가 촉진되어 근육량이 줄어들게 된다. 따라서 mTOR의 활성화 촉진과 atrogen-1과 MuRF-1 발현 억제는 근육 단백질의 양을 증가시켜 근육량을 증가시키게 된다.
- [5] 근육세포의 분화와 근육 형성은 다양한 근육 조절 인자(muscle regulatory

factors)에 의해 조절된다. 그 중, MyoD는 근육 특이 유전자의 발현을 개시하게 하고, 근육위성세포(muscle satellite cells)가 근원세포(myoblast)로 분화(differentiation)되는 것을 유도한다. MyoD의 활성화에 의한 myogenin 발현의 유도는 근원세포의 결합(fusion)에 가장 중요한 요소로, 근관세포(myotube)의 형성에 관여한다. 이와 같은 과정을 통해 형성된 근섬유는 다발을 이루어 최종적으로 근육을 형성하게 된다(Cellular and Molecular Life Sciences, 70: 4117-4130, 2013).

- [6] 팔각회향(*Illicium verum*)은 목련과 상록수의 열매를 말하는 것으로, 단단한 껍질로 싸인 꼬투리 여덟 개가 마치 별처럼 붙어있는 모양을 하고 있어 일반적으로 스타아니스(star anise)라고 불린다. 주로 건조한 후 분말형태로 만들어 향신료로 널리 사용되고 있으며, 향암(Journal of Medicinal Plants Research, 4(24): 2666-2673, 2016), 향산화(Food Chemistry, 104(1): 59-66, 2007), 향염(Journal of Ethnopharmacology, 144(1): 182-189, 2012) 등의 활성이 보고되어 있다.
- [7] 시킴산(Shikimic acid)은 팔각회향에 포함되어 있는 성분 중 하나로 알칼로이드, 플라보노이드, 리그닌 뿐만 아니라 아미노산의 생합성에 관여하는 중요한 생화학적 중간물질이다. 시킴산은 향혈전(Journal of Natural Medicine, 70(3): 492-501, 2016), 향균(Bioengineered, 4(4): 244-248, 2013), 신경보호(Journal of Molecular Neuroscience, 56(4): 956-965, 2015), 항바이러스(Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(17): 5391-5395, 2004) 등의 활성을 갖는 것으로 보고되어 있다.
- [8] 그러나, 본 발명의 이전에는 팔각회향 추출물 또는 시킴산의 근육 질환 예방 및 치료 또는 근 기능 개선에 관해서는 알려진 바 없었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명은 부작용 없이 근 단백질 합성에 관여하는 단백질 발현 증가 및 근 단백질 분해에 관여하는 단백질 발현 억제 활성을 가짐으로써 근육 질환의 예방 및 치료 또는 근 기능을 개선할 수 있는 기술을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [10] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

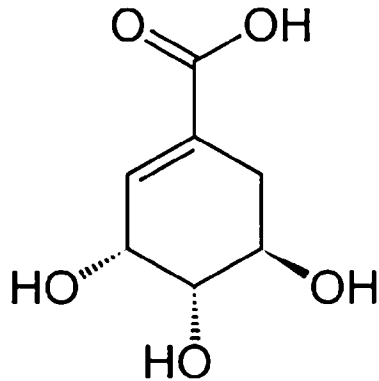
과제 해결 수단

- [11] 상기 과제를 해결하기 위한 수단으로서, 본 발명은 팔각회향(*Illicium verum*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [12] 다른 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 시킴산(shikimic acid) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물을

제공한다.

[13] [화학식 1]

[14]



발명의 효과

[15] 본 발명에 따른 팔각회향(*Illicium verum*) 추출물 또는 시킴산(shikimic acid)은 근 단백질 합성에 관여하는 mTOR의 활성 증가, 근 단백질 분해에 관여하는 MuRF-1과 atrogen-1의 mRNA 발현 감소, 근육량 증가 및 근기능 향상에 우수한 효과가 있다. 또한, 본 발명은 천연물이므로 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있어, 의약품, 식품 또는 화장품 소재로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[16] 도 1은 L6 근육세포에서, 팔각회향 추출물의 처리에 따른 mTOR의 활성을 측정한 결과이다.

[17] 도 2는 L6 근육세포에서, 팔각회향 열수 추출물, 50% 에탄올 추출물 및 에탄올 추출물의 처리에 따른 p-mTOR의 단백질 발현량을 측정한 결과이다.

[18] 도 3은 L6 근육세포에서, 팔각회향 열수 추출물, 50% 에탄올 추출물 및 에탄올 추출물의 처리에 따른 atrogen-1과 MuRF-1의 mRNA 발현량을 측정한 결과이다.

[19] 도 4는 L6 근육세포에서, 팔각회향 열수 추출물의 처리에 따른 미오디(MyoD), 미오게닌(myogenin) 및 MRF4의 mRNA 발현량을 측정한 결과이다.

[20] 도 5는 근위축 유도 쥐에서, 팔각회향 열수 추출물 처리에 따른 근력 향상 효과를 확인한 결과이다.

[21] 도 6은 근위축 유도 쥐에서, 팔각회향 열수 추출물 처리에 따른 전경골근 무게 증가 효과를 확인한 결과이다.

[22] 도 7은 L6 근육세포에서, 시킴산 처리에 따른 mTOR의 활성을 측정한 결과이다.

[23] 도 8은 L6 근육세포에서, 시킴산 처리에 따른 atrogen-1 및 MuRF1의 mRNA 발현량을 측정한 결과이다.

[24] 도 9는 L6 근육세포에서, 시킴산 처리에 따른 미오디(MyoD), 미오게닌(myogenin) 및 MRF4의 mRNA 발현량을 측정한 결과이다.

[25] 도 10은 근위축 유도 쥐에서, 시킴산 처리에 따른 근력 향상 효과를 확인한 결과이다.

[26] 도 11은 근위축 유도 쥐에서, 시킵산 처리에 따른 전경골근 무게 증가 효과를 확인한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[27] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[28] 본 발명은 팔각회향(*Illicium verum*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 및 치료용 또는 근 기능 개선용 조성물을 제공한다.

[29] 또한, 본 발명은 시킵산(shikimic acid) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 및 치료용 또는 근 기능 개선용 조성물을 제공한다.

[30] 본 발명자들은 근 기능을 개선시키는 천연물질을 개발하고자 노력한 결과, 팔각회향 추출물 또는 이의 활성성분 시킵산이 근 기능에 관여하는 유전자의 발현 및 활성을 증가시킴으로써 근육 질환을 예방 또는 치료하는 효과가 있음을 규명하였다.

[31] 본 발명의 조성물은 팔각회향 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있다.

[32] 본 발명의 조성물에서 이용되는 '팔각회향'은 붓순나무과(*Illiciaceae*)에 속하며, 이의 아종, 변종을 포함함은 물론이다. 또한, 본 발명의 팔각회향은 당업계에서 자명하고 본 발명의 예방 및 치료 목적과 동일 또는 유사한 용도로 사용할 수 있는 동속생약을 포함한다.

[33] 본 명세서에서, '추출물'은 어떤 물질을 용매에 녹여 그 활성성분 또는 특성 성분을 분리한 것을 의미한다. 구체적으로 식물에 추출용매를 가하여 추출한 추출물 및 추출용매로 추출하여 제조한 추출물에 분획용매를 가하여 분획한 분획물을 포함한다. 따라서, 본 발명의 팔각회향 추출물은 팔각회향에 용매를 가하여 추출한 추출물과 이에 다시 분획용매를 가하여 분획한 분획물을 모두 포함하는 의미이다.

[34] 상기 팔각회향 추출물은 팔각회향을 물, 탄소수 1 내지 6의 유기용매 또는 이들의 혼합물, 아세톤, 에테르, 벤젠, 클로로포름, 에틸아세테이트, 메틸렌 클로라이드, 헥산, 시클로헥산, 석유에테르, 아임계 유체 및 초임계 유체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 용매로 추출한 것일 수 있다.

[35] 상기 유기용매는, 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 적어도 어느 하나의 용매를 포함할 수 있다.

[36]

[37] 본 발명은, 상기 팔각회향 추출물의 추출방법 및 상기 추출방법으로부터 추출된 팔각회향 추출물을 포함할 수 있다.

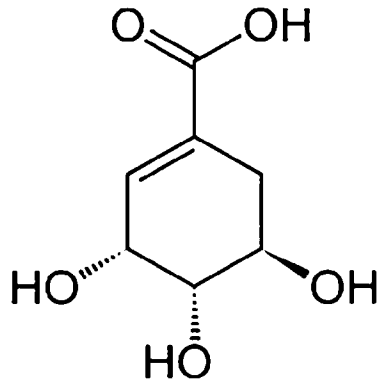
[38] 또한, 본 발명의 조성물은 유효성분으로 시킵산을 포함할 수 있다.

[39] 상기 "시킵산"은 천연물로부터 추출 및 정제되거나, 합성된 화합물로서, 하기

화학식 1로 표시된다.

[40] [화학식 1]

[41]



[42] 상기 시킴산은 팔각회향으로부터 유래한 것일 수 있다. 이때, 상기 팔각회향 추출물에 용매를 가하여 증분리하는 방법으로 제조될 수 있다.

[43] 본 발명의 시킴산은 동일한 효능을 갖는 범위 내에서 수화물, 유도체 등을 포함할 수 있고, 이의 용매 화합물이나 입체 이성질체 또한 포함할 수 있다.

[44] 상기 시킴산의 수득방법은 특별히 한정되지 않으며, 공지된 제법을 사용하여 화학적으로 합성하거나 시판되는 것을 사용할 수 있다.

[45] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 팔각회향 추출물은 100 MPa 이상의 초고압 조건 하에서 팔각회향을 추출하여 수득할 수 있다.

[46] 본 명세서에서, '근'은 심줄, 근육, 건을 포괄적으로 지칭하고, '근 기능'은 근육의 수축에 의해 힘을 발휘하는 능력을 의미하며, 근육이 저항을 이겨내기 위하여 최대한으로 수축력을 발휘할 수 있는 능력인 근력, 근육이 주어진 중량에 얼마나 오랫동안 또는 얼마나 여러 번 수축과 이완을 반복할 수 있는지를 나타내는 능력인 근지구력, 단시간 내에 강한 힘을 발휘하는 능력인 순발력을 포함한다. 이러한 근 기능은 간이 주관하며, 근육량에 비례한다. 용어 '근 기능 개선'은 근 기능을 더 좋게 향상시키는 것을 말한다.

[47] 본 발명의 일 구현예에서는, 본 발명에 따른 유효성분인 팔각회향 추출물 또는 시킴산이 근육세포에서 mTOR의 활성을 증가시키는 것으로부터 근육 단백질의 합성을 증가시키는 능력이 우수한 것을 확인하였다.

[48] 또한, 본 발명의 다른 구현예에서는, 본 발명에 따른 유효성분인 팔각회향 추출물 또는 시킴산이 근육세포에서 atrogen-1 및 MuRF-1의 mRNA 발현을 감소시키는 것으로부터 근 단백질의 분해를 억제하는 능력이 우수한 것을 확인하였다.

[49] 또한, 본 발명의 다른 구현예에서는, 본 발명에 따른 유효성분인 팔각회향 추출물 또는 시킴산이 근육세포에서 미오디(MyoD), 미오게닌(myogenin) 및 MRF4의 mRNA 발현을 증가시키는 것으로부터 근육의 분화를 촉진시키는 능력이 우수한 것을 확인하였다.

[50] 또한, 본 발명의 다른 구현예에서는, 본 발명에 따른 유효성분인 팔각회향

- 추출물 또는 시킴산이 근위축 유도쥐에서 전경골근 무게 증가 및 근력을 향상시키는 것으로부터 근육을 증가시키는 능력이 우수한 것을 확인하였다.
- [51] 따라서, 이러한 측면에서 본 발명의 조성물은 근육 질환 예방 및 치료용 약학 조성물 일 수 있다.
- [52] 본 발명에서, "예방"은 조성물의 투여로 발병을 억제하거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [53] 본 발명에서, "개선" 또는 "치료"는 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [54] 본 발명의 조성물은, 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.
- [55] 본 발명에서 근육 소모 또는 퇴화로 인한 근육 질환은 이에 제한되는 것은 아니나, 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육 퇴화, 근무력증, 악액질(cachexia) 및 근육감소증(sarcopenia)을 포함하며, 이러한 질환으로 인해 근육의 자연적 회복이 어려운 다양한 질환의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 근육량 증대 효과가 있으며, 근육은 그 종류를 제한하지 않는다.
- [56] 본 발명의 약학 조성물은 시킴산 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 용어 "약제학적으로 허용 가능한"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 말하며, 상기 염으로는 약제학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하다.
- [57] 상기 약제학적으로 허용 가능한 염은 유기산 또는 무기산을 이용하여 형성된 산 부가염일 수 있으며, 상기 유기산은 예를 들면 포름산, 아세트산, 프로피온산, 락트산, 부티르산, 이소부티르산, 트리플루오로아세트산, 말산, 말레산, 말론산, 푸마르산, 숙신산, 숙신산 모노아미드, 글루탐산, 타르타르산, 옥살산, 시트르산, 글리콜산, 글루쿠론산, 아스코르브산, 벤조산, 프탈산, 살리실산, 안트라닐산, 디클로로아세트산, 아미노옥시 아세트산, 벤젠술포산, p-톨루엔술포산 또는 메탄술포산을 포함한다. 무기산은 예를 들면 염산, 브롬산, 황산, 인산, 질산, 탄산 또는 붕산을 포함한다. 산 부가염은 바람직하게는 염산염 또는 아세트산염 형태일 수 있으며, 보다 바람직하게는 염산염 형태일 수 있다.
- [58] 상기 언급된 산 부가염은 a) 시킴산을 직접 혼합하거나, b) 이를 용매 또는 함수 용매 중에 용해시키고 혼합시키거나, 또는 c) 시킴산을 용매 또는 수하 용매 중의 산에 위치시키고 이들을 혼합하는 일반적인 염 제조방법으로 제조된다.
- [59] 위와는 별도로 추가적으로 염이 가능한 형태는 가바염, 가바펜틴염, 프레가발린염, 니코틴산염, 아디페이트염, 헤미말론산염, 시스테인염, 아세틸시스테인염, 메티오닌염, 아르기닌염, 라이신염, 오르니틴염 또는

아스파르트산염 등이 있다.

- [60] 또한, 본 발명의 근육 질환 예방 및 치료용 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다.
- [61] 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).
- [62] 본 발명의 약학 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.
- [63] 본 발명의 약학 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, 봉해제 또는 계면활성제, 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [64] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 또는 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 약학 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), 텍스트로오스, 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 당의 정제를 수득할 수 있다.
- [65] 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 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.

- [66] 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 봉해제로 첨가할 수 있으며, 항응집제, 유허제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [67] 비경구적으로 투여하는 경우 본 발명의 약학 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 한정되지 않는 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% 텍스트로즈와 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.
- [68] 경피 투여제의 경우 연고제, 크림제, 로션제, 겔제, 외용액제, 파스타제, 리니먼트제, 에어로졸제 등의 형태가 포함된다. 상기에서 '경피 투여'는 약학 조성물을 국소적으로 피부에 투여하여 약학 조성물에 함유된 유효한 양의 활성성분이 피부 내로 전달되는 것을 의미한다.
- [69] 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.
- [70] 본 발명의 근육 질환 예방 및 치료용 약학 조성물은 팔각회향 추출물 또는 시킴산을 유효량으로 포함할 때 바람직한 근육 질환 예방 및 치료 효과를 제공할 수 있다. 본 명세서에서, '유효량'이라 함은 음성 대조군에 비해 그 이상의 반응을 나타내는 양을 말하며 바람직하게는 근 기능을 향상시키기에 충분한 양을 말한다. 본 발명의 약학 조성물에 팔각회향 추출물 또는 시킴산이 0.01 내지 99.99% 포함될 수 있으며, 잔량은 약학적으로 허용 가능한 담체가 차지할 수

있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 팔각회향 추출물 또는 시킴산의 유효량은 조성물이 제품화되는 형태 등에 따라 달라질 것이다.

- [71] 본 발명의 약학 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 약학 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 비경구 투여시는 팔각회향 추출물 또는 시킴산을 기준으로 하루에 체중 1 kg당 바람직하게 0.01 내지 50 mg, 더 바람직하게는 0.1 내지 30 mg의 양으로 투여되도록, 그리고 경구 투여시는 팔각회향 추출물 또는 시킴산을 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 팔각회향 추출물 또는 시킴산의 용량은 약학 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 상기 팔각회향 추출물 또는 시킴산을 근육 질환 예방 및 치료를 위한 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.
- [72] 본 발명의 근육 질환 예방 및 치료용 약학 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 또는 생물학적 반응조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [73] 본 발명의 근육 질환 예방 및 치료용 또는 근 기능 개선용 조성물은 팔각회향 추출물 또는 시킴산을 단독으로 함유할 수 있다. 추가적인 성분을 포함하게 되면 본 발명의 조성물의 근 기능 개선 효과가 더욱 증진될 수 있을 것이다. 상기 성분 추가 시에는 복합 사용에 따른 피부 안전성, 제형화의 용이성, 유효성분들의 안정성을 고려할 수 있다.
- [74] 다른 측면에서, 본 발명의 약학 조성물은 팔각회향 추출물 또는 시킴산을 유효성분으로 포함하는 외용제의 제형으로 제공할 수 있다.
- [75] 본 발명의 근육 질환 예방 및 치료용 약학 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.
- [76] 본 발명의 근육 질환 예방 및 치료용 약학 조성물이 피부 외용제로 제공될 경우,

이에 제한되는 것은 아니나, 연고, 패취, 젤, 크림 또는 분무제 등의 제형일 수 있다.

- [77] 다른 측면에서, 본 발명의 조성물은 근육 질환 예방 또는 근 기능 개선용 식품 조성물로 제조될 수 있다. 본 발명의 근육 질환 예방 및 근 기능 개선용이 식품 조성물인 경우, 근육 소모 또는 퇴화로 인한 근육 질환의 예방 또는 개선에 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.
- [78] 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.
- [79] 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, 마야말레이드 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 팔각회향 추출물을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 영양보조제로는 이에 한정되지 않지만 캡슐, 타블렛, 환 등에 팔각회향 추출물을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 건강기능식품으로는 이에 한정되지 않지만 예를 들면, 팔각회향 추출물 자체를 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용(건강음료)할 수 있도록 액상화, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 팔각회향 추출물을 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다. 또한, 팔각회향 추출물과 근육 질환 예방 및 근 기능 개선 효과가 있다고 알려진 공지의 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다.
- [80] 본 발명의 근육 질환 예방 및 근 기능 개선용 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 g이다.

- [81] 팔각회향 추출물 또는 시킵산은 근육 질환 예방 및 근 기능 개선용 식품 조성물의 유효성분으로 함유될 수 있는데, 그 양은 근육 질환 예방 및 근 기능 개선용 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 팔각회향 추출물과 함께 근육 질환 예방 및 근 기능 개선용 조성물에 효과가 있는 것으로 알려진 다른 활성 성분과 함께 혼합하여 제조될 수 있다.
- [82] 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.
- [83] 본 발명의 식품 조성물은 근육 질환 예방 또는 근 기능 개선을 목적으로 사료첨가제 또는 사료 조성물에 첨가할 수 있다.
- [84] 본 발명에서 용어, "사료첨가제"는 영양소 보충 및 체중감소 예방, 사료 내 섬유소의 소화 이용성 증진, 유질 개선, 번식장애 예방 및 수태율 향상, 하절기 고온 스트레스 예방 등 다양한 효과를 목적으로 사료에 첨가하는 물질을 포함한다. 본 발명의 사료첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당하며, 탄산수소나트륨, 벤토나이트(bentonite), 산화마그네슘, 복합광물질 등의 광물질제제, 아연, 구리, 코발트, 셀레늄 등의 미량 광물질인 미네랄제제, 케로틴, 비타민 A, D, E, 니코틴산, 비타민 B 복합체 등의 비타민제, 메티오닌, 라이신 등의 보호아미노산제, 지방산 칼슘염 등의 보호지방산제, 생균제(유산균제), 효모배양물, 곰팡이 발효물 등의 생균, 효모제 등이 추가로 포함될 수 있다.
- [85] 본 발명에서 용어 "사료"는, 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분으로, 본 발명에 따른 골 형성 촉진용 조성물을 유효성분으로 포함하는 사료는 당업계에 공지된 다양한 형태의 사료로 제조가능하며, 바람직하게는 농후 사료, 조사료 및/또는 특수사료가 포함될 수 있으나, 이로 한정되지 않는다.
- [86] 농후사료에는 밀, 귀리, 옥수수 등의 곡류를 포함하는 종자열매류, 곡물을 정제하고 얻는 부산물로서 쌀겨, 밀기울, 보릿겨 등을 포함하는 겨류, 콩, 유채, 깨, 아마인, 코코야자 등을 채유하고 얻는 부산물인 깻묵류와 고구마, 감자 등에서 녹말을 뺀 나머지만 녹말찌꺼기의 주성분인 잔존녹말질류 등의

찌꺼기류, 어분, 물고기찌꺼기, 어류에서 얻은 신선한 액상물을 농축시킨 것인 피시솔루블(fish soluble), 육분, 혈분, 우모분, 탈지분유, 우유에서 치즈, 탈지유에서 카제인을 제조할 때의 잔액인 웨이(whey)를 건조한 건조웨이 등의 동물질사료, 효모, 클로렐라, 해조류가 있으나 이에 제한되지 않는다.

- [87] 조사료에는 야초, 목초, 풋배기 등의 생초 사료, 사료용 순무, 사료용 비트, 순무의 일종인 루터베어거 등의 뿌리채소류, 생초, 풋배기작물, 곡실 등을 사일로에 채워 놓고 젖산발효시킨 저장사료인 사일리지(silage), 야초, 목초를 베어 건조시킨 건초, 종축용 작물의 짚, 콩과 식물의 나뭇잎이 있으며, 이에 제한되지 않는다. 특수사료에는 굴껍데기, 암염 등의 미네랄 사료, 요소나 그 유도체인 디우레이드이소부탄 등의 요소사료, 천연사료원료만을 배합했을 때 부족하기 쉬운 성분을 보충하거나, 사료의 저장성을 높이기 위해서 배합사료에 미량으로 첨가하는 물질인 사료첨가물, 식이보조제가 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [88] 본 발명에 따른 상기 사료 첨가제는 당업계에 공지된 다양한 사료 제조방법에 따라 적절한 유효 농도 범위에서 팔각회향 추출물 또는 시킴산을 첨가하여 제조 가능하다.
- [89] 본 발명에 따른 사료 첨가제는 근 기능 개선을 목적으로 하는 개체이면 제한 없이 적용가능하다. 예를 들면, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간동물, 조류 및 어류 등 어느 개체에도 적용이 가능하다.
- [90] 또 다른 측면에서, 본 발명의 근 기능 개선용 조성물은 또한 화장료 조성물일 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물은 팔각회향 추출물 또는 시킴산을 유효성분으로 함유하며 피부학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 기초 화장품 조성물(화장수, 크림, 에센스, 클렌징 폼 및 클렌징 워터와 같은 세안제, 팩, 보디오일), 색조 화장품 조성물(화운데이션, 립스틱, 마스크라, 메이크업 베이스), 두발 제품 조성물(샴푸, 린스, 헤어컨디셔너, 헤어젤) 및 비누 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [91] 상기 부형제로는 이에 한정되지는 않으나 예를 들어, 피부연화제, 피부 침투 증강제, 착색제, 방향제, 유희제, 농화제 및 용매를 포함할 수 있다. 또한, 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제 및 보습제 등을 추가로 포함할 수 있으며, 물성개선을 목적으로 점증제, 무기염류, 합성 고분자 물질 등을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 화장료 조성물로 세안제 및 비누를 제조하는 경우에는 통상의 세안제 및 비누 베이스에 팔각회향 추출물을 첨가하여 용이하게 제조할 수 있다. 크림을 제조하는 경우에는 일반적인 수중유적형(O/W)의 크림베이스에 팔각회향 추출물 또는 이의 염을 첨가하여 제조할 수 있다. 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등과 물성개선을 목적으로 한 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 추가로 첨가할 수 있다.
- [92] 본 발명의 화장료 조성물에 함유되는 팔각회향 추출물 또는 시킴산의 함량은 이에 한정되지 않지만 전체 조성물 총중량에 대하여 0.001 내지 10 중량%인 것이

바람직하고, 0.01 내지 5중량%인 것이 더욱 바람직하다.

[93] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 팔각회향 추출물 또는 상기 화학식 1로 표시되는 시킴산을 유효성분으로 함유하는 조성물을 개체에 투여 또는 복용시키는 단계를 포함하는 근육 질환 예방 또는 치료방법이 제공될 수 있다.

[94] 또한, 팔각회향 추출물 또는 상기 화학식 1로 표시되는 시킴산을 유효성분으로 함유하는 조성물의 근육 질환 예방 또는 치료 용도가 제공될 수 있다.

[95]

[96]

[97] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다.

[98] 단, 하기 실시 예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시 예에 한정되는 것은 아니다.

[99]

[100] [실시예 1] 팔각회향 추출물의 제조

[101] <1-1> 팔각회향 열수 추출물의 제조

[102] 건조된 팔각회향을 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 팔각회향 시료 10 g을 물 100 mL에 넣고 3시간 80°C에서 추출하였다. 추출된 시료는 와트만(Whatman) 1번 여과지로 감압여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거한 후 팔각회향 열수 추출물을 얻었다.

[103]

[104] <1-2> 팔각회향 50% 에탄올 추출물의 제조

[105] 건조된 팔각회향을 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 팔각회향 시료 10 g을 에탄올과 물을 중량비 50:50으로 혼합한 50% 에탄올 100 mL에 넣고 3시간 40°C에서 추출하였다. 추출된 시료는 와트만 1번 여과지로 감압여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거한 후 팔각회향 50% 에탄올 추출물을 얻었다.

[106]

[107] <1-3> 팔각회향 에탄올 추출물의 제조

[108] 건조된 팔각회향을 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 팔각회향 시료 10 g을 100% 에탄올 100 mL에 넣고 3시간 40°C에서 추출하였다. 추출된 시료는 와트만 1번 여과지로 감압여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거한 후 팔각회향 에탄올 추출물을 얻었다.

[109]

[110] <1-4> 팔각회향 에틸아세테이트 추출물의 제조

[111] 건조된 팔각회향을 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 팔각회향 시료 10 g을 에틸아세테이트 100 mL에 넣고 3시간 40°C에서 추출하였다. 추출된 시료는 와트만 1번 여과지로 감압여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거한 후 팔각회향 에틸아세테이트 추출물을 얻었다.

[112]

[113] <1-5> 팔각회향 헥산 추출물의 제조

[114] 건조된 팔각회향을 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 팔각회향 시료 10 g을 헥산 100 mL에 넣고 3시간 40°C에서 추출하였다. 추출된 시료는 와트만 1번 여과지로 감압여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거한 후 팔각회향 헥산 추출물을 얻었다.

[115]

[116] <1-6> 팔각회향 아임계 추출물의 제조

[117] 건조된 팔각회향을 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 팔각회향 50 g을 1 L 물과 함께 아임계 추출장치(Biovan, Gyeonggi, Korea)의 아임계수 반응기에 넣고 밀폐하였다. 밀폐 후, 반응기의 온도를 200°C로 상승시켰으며, 반응기의 온도가 200°C에 도달하면 가열을 중단하고, 상기 온도를 20분간 유지하여 추출을 하였다. 20분 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 팔각회향 아임계 추출물을 얻었다.

[118]

[119] <1-7> 팔각회향 초임계 추출물의 제조

[120] 건조된 팔각회향을 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 팔각회향 1 g을 시료 카트리지에 충전하고 초임계 유체 추출 장치(SFX 3560, Isco Inc., Lincoln, NE, USA)를 이용하여 추출하였다. 초임계 추출 조건은 추출 압력이 300 bar, 추출 온도는 50°C, 초임계 이산화탄소의 유속은 60 mL/min, 추출시간은 2시간으로 하였다. 초임계 유체 추출이 완료되면, 추출 장치의 압력을 낮춰 초임계 유체 상태를 해제하여 팔각회향 초임계 추출물을 얻었다.

[121]

[122] [실시예 2] 팔각회향 추출물의 mTOR 활성화 증가 효과

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

[124] L6 근육모세포(ATCC; Manassas, VA, USA)를 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Logan, UT, USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM; Hyclone)와 함께 6-웰 플레이트에 1×10^5 cell/well이 되도록 seeding 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 웰에 있는 배지를 제거하고 2% horse serum (HS; Hyclone)이 함유된 DMEM (Hyclone)로 교환하여 6일간 추가 배양하여 L6 세포를 근관세포(myotube)로 분화시켰다. 그런 다음, 상기 실시예 1에서 제조한 팔각회향 추출물을 각각 10 µg/mL씩 DMEM (Hyclone)에 녹인 후, 세포에

처리하고 12시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세포 용해 완충용액(cell lysis buffer)을 처리하여 세포를 용해시켰다. 수득한 세포 용해물 내 단백질을 브래드포드(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)를 이용하여 1 mg/mL 농도로 정량하였다. 항-mTOR 항체가 부착된 마이크로웰에 세포 용해물을 50 μ L씩 분주하여 37°C에서 2시간 동안 방치하였다. 세척 완충용액(Washing buffer)으로 총 4회 씻은 후, 확인용 항체(detection antibody)를 처리하고 37°C에서 1시간 방치했으며, 다시 세척 완충용액으로 총 4회 씻은 후, 겨자무 과산화효소(horseradish peroxidase)가 접합된 2차 항체를 넣고 37°C에서 30분 동안 방치하였다. 마지막으로 세척 완충용액으로 총 4회 씻은 후, TMB 기질을 각 웰에 넣고 37°C에서 10분 동안 방치하고 정지 완충용액(stop solution)을 가하여 TMB의 반응을 멈추었다. 2분 뒤, 450 nm의 파장으로 흡광도를 측정하여 팔각회향 추출물을 처리한 근관 세포 내 mTOR 수준을 측정하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[125]

[126] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 팔각회향 추출물을 처리함에 따라 L6 근육세포에서 mTOR의 활성이 유의적(** $p < 0.01$)으로 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[127] 이는 본 발명의 팔각회향 추출물이 근육세포 내에서 근 단백질 합성을 촉진시키는 능력이 우수하다는 것을 의미한다.

[128]

[129] [실시에 3] 팔각회향 열수 추출물, 50% 에탄올 추출물, 에탄올 추출물의 mTOR 단백질 발현량 증가 효과

[130]

근육세포인 L6 myoblast (ATCC)를 10% FBS (Hyclone)가 함유된 DMEM (Hyclone)와 함께 6-웰 플레이트에 1×10^5 cell/mL이 되도록 넣었다. 세포밀도가 약 80~85%가 되었을 때, 웰에 있는 배지를 제거하고 2% HS (Hyclone)이 함유된 DMEM (Hyclone)에 상기 실시예 1-1에서 제조한 팔각회향 열수 추출물(10 μ g/mL), 실시예 1-2에서 제조한 팔각회향 50% 에탄올 추출물(10 μ g/mL), 실시예 1-3에서 제조한 팔각회향 에탄올 추출물(10 μ g/mL)을 DMEM (Hyclone)에 녹인 후, 세포에 처리하여 myotube 분화를 유도하였다. 이 때, 시료 대신 0.01% DMSO를 처리한 군을 대조군으로 하였다. 이 과정을 2일간 6일 동안 진행하여 분화시킨 후, proteinase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 포함된 NP-40 완충용액(ELPIS-Biotech, Daejeon, Korea)으로 용해시켰다. 완충용액에 용해된 세포를 1.5 mL 튜브(tube)로 옮겨 13,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상등액만을 취하였다. 상등액을 브래드포드(Bradford, Bio-Rad Laboratories Inc.)를 이용하여 정량하였다. 정량된 단백질을 5분간 끓인 후 10% SDS-PAGE로 전기영동하여 분리하였으며, 분리된 단백질들을 니트로셀룰로스 막으로 전달하였다. p-mTOR 1차 항체(Cell signaling technology)를 2.5% bovine serum albumin (BSA)에 1:1000의 비율로 희석하여 니트로셀룰로스 막에 전달된

단백질과 20시간 동안 상온에서 반응시켰다. 1차 항체를 반응시킨 다음 Tris-buffer Saline Tween20 (TBST)을 이용하여 니트로셀룰로스 막을 10분간 3회 세척하였다. 세척 후, 1차 항체를 인지하는 horseradish peroxidase가 접합된 anti-rabbit 2차 항체(Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TA, USA)를 2.5% BSA에 1:5000이 되도록 희석하여 니트로셀룰로스 막과 2시간 동안 상온에서 반응시켰으며, TBST를 이용하여 10분씩 3회에 걸쳐 세척하였다. Protein band는 ECL western blotting detection reagents (Amersham, Tokyo, Japan)를 사용하여 발색하였으며, G;BOX EF imaging system (Syngene, Cambridge, UK)을 이용하여 발색된 protein band를 확인하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[131]

[132] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이 팔각회향 열수 추출물, 50% 에탄올 추출물, 에탄올 추출물의 처리에 의해 L6 근육세포에서 p-mTOR의 발현량이 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[133] 이는 본 발명의 팔각회향 열수 추출물, 50% 에탄올 추출물, 에탄올 추출물이 근육세포 내에서 근 단백질 합성을 촉진시키는 능력이 우수하다는 것을 의미한다.

[134]

[135] [실시에 4] 팔각회향 열수, 50% 에탄올 추출물, 에탄올 추출물의 atrogen-1과 MuRF-1의 mRNA 발현량 감소 효과

[136] 근육세포인 L6 myoblast (ATCC)를 10% FBS (Hyclone)가 함유된 DMEM (Hyclone)과 함께 6-웰 플레이트에 1×10^5 cell/mL이 되도록 넣었다. 세포밀도가 약 80~85%가 되었을 때, 웰에 있는 배지를 제거하고 2% HS (Hyclone)가 함유된 DMEM (Hyclone)을 세포에 처리하여 myotube 분화를 유도하였다. 2일에 한 번씩 새로운 배지로 교체하여 총 6일 동안 분화를 진행하였다. 분화 후, 50 ng/mL tumor necrosis factor alpha (TNF- α ; PeproTech, Rocky Hills, NJ, USA)가 함유된 DMEM (Hyclone)에 상기 실시예 1-1에서 제조한 팔각회향 열수 추출물(10 μ g/mL), 실시예 1-2에서 제조한 팔각회향 50% 에탄올 추출물(10 μ g/mL), 실시예 1-3에서 제조한 팔각회향 에탄올 추출물(10 μ g/mL)을 DMEM (Hyclone)에 녹인 후, 세포에 처리하였다. 6시간 후, TRIzol시약(Takara, Otsu, Japan)을 사용하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 총 RNA는 나노드랍(NanoDrop 1000; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)을 이용하여 정량하였다. 정량된 16 μ L의 RNA를 Reverse Transcriptase Premix (ELPIS-Biotech)와 PCR 기계(Gene Amp PCR System 2700; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 42°C, 55분 및 70°C, 15분의 조건에서 cDNA로 합성하였다. 16 μ L의 생성된 cDNA 중 1 μ L의 cDNA, 하기의 특정 프라이머(Bioneer, Daejeon, Korea) 그리고 PCR premix (ELPIS-Biotech)로 95°C에서 30초, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분을 30번 반복하여 PCR을 수행하였다.

[137]

- [138] Atrogin-1
- [139] Forward primer: 5'-GTTACTGCAACAAGGAGAATCTGTT-3'(서열번호 1)
- [140] Reverse primer: 5'-CCGTATGAGTCTTATGTTTTGCTGG-3'(서열번호 2)
- [141] MuRF-1
- [142] Forward primer: 5'-CCGGACGGAAATGCTATGGA-3'(서열번호 3)
- [143] Reverse primer: 5'-AGCCTGGAAGATGTCGTTGG-3'(서열번호 4)
- [144] *?*-Actin:
- [145] Forward primer: 5'-TGACAGGATGCAGAAGGAGATTAC-3'(서열번호 5)
- [146] Reverse primer: 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTC-3'(서열번호 6)
- [147]
- [148] PCR 결과 증폭된 cDNA를 1.5% agarose gel로 전기영동하여 분리하였으며, G;BOX EF imaging system (Syngene)을 이용하여 cDNA band를 확인하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [149]
- [150] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이 TNF- α 를 처리함에 따라 증가한 atrogin-1 및 MuRF-1의 mRNA 발현이 팔각회향 열수 추출물, 50% 에탄올 추출물, 에탄올 추출물의 처리에 의해 감소함을 알 수 있었다.
- [151] 이는 본 발명의 팔각회향 열수 추출물, 50% 에탄올 추출물, 에탄올 추출물이 근육세포 내에서 근 단백질 분해를 억제하는 능력이 우수하다는 것을 의미한다.
- [152]
- [153] [실시에 5] 팔각회향 열수 추출물의 MyoD, myogenin 및 MRF4의 mRNA 발현량 증가 효과
- [154] 근육세포인 L6 myoblast (ATCC)를 10% FBS (Hyclone)가 함유된 DMEM (Hyclone)과 함께 6-웰 플레이트에 1×10^5 cell/mL이 되도록 넣었다. 세포밀도가 약 80~85%가 되었을 때, 웰에 있는 배지를 제거하고 50 ng/mL TNF- α (PeproTech)와 2% HS (Hyclone)가 함유된 DMEM (Hyclone)에 상기 실시예 1-1에서 제조한 팔각회향 열수 추출물을 녹인 후, 세포에 처리하여 myotube 분화를 유도하였다. 2일에 한 번씩 새로운 배지로 교체하여 총 6일 동안 분화를 진행하였다. 이 때, TNF- α 가 함유되지 않고 2% HS (Hyclone)가 함유된 DMEM (Hyclone)를 세포한 균을 대조군으로 하였다. TRIzol시약(Takara)을 사용하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 총 RNA는 나노드랍(NanoDrop 1000; Thermo Fisher Scientific Inc.)을 이용하여 정량하였다. 정량된 16 μ L의 RNA를 Reverse Transcriptase Premix (ELPIS-Biotech)와 PCR 기계(Gene Amp PCR System 2700; Applied Biosystems)를 이용하여 42°C, 55분 및 70°C, 15분의 조건에서 cDNA로 합성하였다. 16 μ L의 생성된 cDNA 중 1 μ L의 cDNA, 하기의 특정 프라이머(Bioneer, Daejeon, Korea) 그리고 PCR premix (ELPIS-Biotech)로 95°C에서 30초, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분을 30번 반복하여 PCR을 수행하였다.
- [155]

[156] MyoD

[157] Forward primer: 5'-TGCCTCGGAGATAATACAGCC-3'(서열번호 7)

[158] Reverse primer: 5'-GGTGTAACAACCATACCCCACT-3'(서열번호 8)

[159] Myogenin

[160] Forward primer: 5'-AGAGAGCCCCCTTGTTAATGC-3'

[161] Reverse primer: 5'-GGCCACTCACTGTCTCTCAAA-3'

[162] MRF4

[163] Forward primer: 5'-CTTGAGGGTGCGGATTCCT-3'

[164] Reverse primer: 5'-GGGAGTTTGCGTTCCTCTGA-3'

[165] β -Actin:

[166] Forward primer: 5'-TGACAGGATGCAGAAGGAGATTAC-3'(서열번호 5)

[167] Reverse primer: 5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTC-3'(서열번호 6)

[168]

[169] PCR 결과 증폭된 cDNA를 1.5% agarose gel로 전기영동하여 분리하였으며, G;BOX EF imaging system (Syngene)을 이용하여 cDNA band를 확인하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[170]

[171] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이 TNF- α 를 처리함에 따라 유의적($##p < 0.01$)으로 감소한 MyoD, myogenin 및 MRF4의 mRNA 발현이 팔각회향 열수 추출물의 처리에 의해 유의적($*p < 0.05$, $**p < 0.01$)으로 증가함을 알 수 있었다.

[172] 이는 본 발명의 팔각회향 열수 추출물이 근육의 분화를 촉진시키는 능력이 우수하다는 것을 의미한다.

[173]

[174] [실시예 6] 동물모델에서 팔각회향 열수 추출물의 근 기능 및 근육량 증가 효과

[175] <6-1> 동물의 사육 및 근위축 유도

[176] 실험동물로 생후 8주된 수컷쥐(C57BL/6J; Narabiotech, Seoul, Korea)를 구입하여 실험을 진행하였다. 모든 동물의 사육은 연세실험동물연구센터(Yonsei Laboratory Animal Reaserch Center; YLARC, Seoul, Korea)에서 진행되었으며, 사육실 환경은 온도 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 10\%$ 로 유지시켰다. 7일간 적응시킨 후, 300 mg/kg 트리브로모메탄올(tribromoethanol, Sigma-Aldrich)을 복강 주사하여 마취를 유도하였다. 마취 후, 근위축군과 시료 투여군에 속한 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 상기 실시예 1-1에서 제조한 팔각회향 열수 추출물을 100 mg/kg 또는 200 mg/kg의 농도로 매일 경구투여하였다. 이 때, 정상군과 근위축군은 팔각회향 추출물 대신에 식염수로

경구투여를 실시하였다.

[177]

[178] <6-2> 팔각회향 열수 추출물의 근력 향상 효과 확인

[179] 경구 투여 기간이 끝나고, 근력측정기(Panlab, Barcelona, Spain)를 이용하여 쥐의 근력을 측정하였다. 쥐가 근력측정기의 막대를 놓을 때까지 일정한 힘으로 쥐의 꼬리를 당겼으며, 한 마리당 총 5회 연속 테스트를 실시하였다.

[180]

[181] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이 정상군에 비해 근위축군에서 근력이 유의적($\#p < 0.01$)으로 감소하였으나, 팔각회향 열수 추출물을 처리함에 따라 근력이 유의적($**p < 0.01$)으로 증가한 것을 확인하였다.

[182] 이는 본 발명의 팔각회향 열수 추출물이 근위축으로 인해 감소한 근력을 증가시키는 효과가 우수하다는 것을 의미한다.

[183]

[184] <6-3> 팔각회향 열수 추출물의 근육 무게 증가 효과

[185] 근력 측정이 끝난 후, 실험동물에 300 mg/kg 트리브로모메탄올(Sigma-Aldrich)을 복강 주사하여 마취 후 심체혈을 통해 희생을 하였다. 심장박동이 멈춘 것을 확인한 뒤, 오른쪽 뒷다리에서 전경골근(tibialis anterior muscle)을 적출하여 무게를 측정하였다.

[186]

[187] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이 정상군에 비해 근위축군의 전경골근 무게가 유의적($\#p < 0.01$)으로 감소하였으나, 팔각회향 열수 추출물을 처리함에 전경골근 무게가 유의적($*p < 0.05$, $**p < 0.01$)으로 증가한 것을 확인하였다.

[188] 이는 본 발명의 팔각회향 열수 추출물이 근위축으로 인해 감소한 근육의 무게를 증가시키는 효과가 우수하다는 것을 의미한다.

[189]

[190] [실시에 7] 동물모델에서 팔각회향 에탄올 추출물의 근 기능 및 근육량 증가 효과

[191] 상기 실시예 6-1과 동일한 방법으로 근위축을 유도한 다음 상기 실시예 1-3에서 제조한 팔각회향 에탄올 추출물을 200 mg/kg의 농도로 매일 경구투여하였다. 다음, 상기 실시예 6-2와 실시예 6-3과 동일한 방법으로 근력과 근육 무게를 측정한 결과, 팔각회향 에탄올 추출물 투여군은 근위축군에 비하여 근력과 근육 무게가 각각 14.38%($**p < 0.01$)와 18.66%($**p < 0.01$) 증가하였다. 이는 본 발명의 팔각회향 에탄올 추출물이 근위축으로 인해 감소한 근력과 근육의 무게를 증가시키는 효과가 우수하다는 것을 의미한다.

[192]

[193] [실시에 8] 동물모델에서 팔각회향 초임계 추출물의 근 기능 및 근육량 증가 효과

[194] 상기 실시예 6-1과 동일한 방법으로 근위축을 유도한 다음 상기 실시예 1-7에서

제조한 팔각회향 초임계 추출물을 200 mg/kg의 농도로 매일 경구투여하였다. 다음, 상기 실시예 6-2와 실시예 6-3과 동일한 방법으로 근력과 근육 무게를 측정한 결과, 팔각회향 초임계 추출물 투여군은 근위축군에 비하여 근력과 근육 무게가 각각 18.70%(* $p < 0.01$)와 22.95%(* $p < 0.01$) 증가하였다. 이는 본 발명의 팔각회향 초임계 추출물이 근위축으로 인해 감소한 근력과 근육의 무게를 증가시키는 효과가 우수하다는 것을 의미한다.

[195]

[196] [실시예 9] 시킴산의 mTOR 활성화 증가 효과

[197] 시킴산을 5 μM 및 10 μM 의 농도로 세포에 처리하였다는 점을 제외하고, 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 실험을 진행하였다.

[198]

[199] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이 시킴산을 처리함에 따라 L6 근육세포에서 mTOR의 활성이 유의적(* $p < 0.01$)으로 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[200] 이는 본 발명의 시킴산이 근육세포 내에서 근 단백질 합성을 촉진시키는 능력이 우수하다는 것을 의미한다.

[201]

[202] [실시예 10] 시킴산의 atrogen-1과 MuRF-1의 mRNA 발현량 감소 효과

[203] 시킴산을 20 μM 및 40 μM 의 농도로 세포에 처리하였다는 점을 제외하고, 상기 실시예 4와 동일한 방법으로 실험을 진행하였다.

[204]

[205] 그 결과, 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이 TNF- α 를 처리함에 따라 유의적(* $p < 0.01$)으로 증가한 atrogen-1 및 MuRF-1의 mRNA 발현이 시킴산의 처리에 의해 유의적(* $p < 0.01$)으로 감소함을 알 수 있었다.

[206] 이는 본 발명의 시킴산이 근육세포 내에서 근 단백질 분해를 억제하는 능력이 우수하다는 것을 의미한다.

[207]

[208] [실시예 11] 시킴산의 MyoD, myogenin 및 MRF4의 mRNA 발현량 증가 효과

[209] 시킴산을 20 μM 및 40 μM 의 농도로 세포에 처리하였다는 점을 제외하고, 상기 실시예 5와 동일한 방법으로 실험을 진행하였다.

[210]

[211] 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이 TNF- α 를 처리함에 따라 유의적(* $p < 0.01$)으로 감소한 MyoD, myogenin 및 MRF4의 mRNA 발현이 시킴산의 처리에 의해 유의적(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)으로 증가함을 알 수 있었다.

[212] 이는 본 발명의 시킴산이 근육의 분화를 촉진시키는 능력이 우수하다는 것을 의미한다.

[213]

[214] [실시예 12] 동물모델에서 시킴산의 근 기능 및 근육량 증가 효과

[215] <12-1> 동물의 사육 및 근위축 유도

- [216] 상기 실시예 6-1과 동일한 방법으로 동물을 사육하고 근위축을 유도하였다. 이때, 팔각회향 열수 추출물 대신 시킴산 50 mg/kg 및 100 mg/kg을 실험동물에 투여하였다.
- [217]
- [218] <12-2> 시킴산의 근력 향상 효과 확인
- [219] 경구 투여 기간이 끝나고, 상기 실시예 6-2과 동일한 방법으로 실험을 진행하여 시킴산의 근력 향상 효과를 확인하였다.
- [220]
- [221] 그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이 정상군에 비해 근위축군에서 근력이 유의적($\#p < 0.01$)으로 감소하였으나, 시킴산을 처리함에 따라 근력이 유의적($**p < 0.01$)으로 증가한 것을 확인하였다.
- [222] 이는 본 발명의 시킴산이 근위축으로 인해 감소한 근력을 증가시키는 효과가 우수하다는 것을 의미한다.
- [223]
- [224] <12-3> 시킴산의 근육 무게 증가 효과 확인
- [225] 근력 측정이 끝난 후, 상기 실시예 6-3과 동일한 방법으로 실험을 진행하여 시킴산의 근육 무게 증가 효과를 확인하였다.
- [226]
- [227] 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이 정상군에 비해 근위축군의 전경골근 무게가 유의적($\#p < 0.01$)으로 감소하였으나, 시킴산을 처리함에 따라 전경골근 무게가 유의적($*p < 0.05$, $**p < 0.01$)으로 증가한 것을 확인하였다.
- [228] 이는 본 발명의 시킴산이 근위축으로 인해 감소한 근육의 무게를 증가시키는 효과가 우수하다는 것을 의미한다.
- [229]
- [230] 이하, 본 발명의 팔각회향 추출물 및 시킴산을 유효성분으로 함유하는 의약품, 식품 또는 화장품의 제조예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다. 상기 근육 질환 예방 및 치료 또는 근 기능 개선 효과가 우수한 팔각회향 추출물을 가지고 하기와 같은 조성성분 및 조성비에 따라 제조예 1 내지 3의 의약품, 식품 또는 화장품 조성물을 통상적인 방법에 따라서 제조하였다.
- [231]
- [232] [제조예 1] 의약품
- [233] <1-1> 산제
- [234] 팔각회향 추출물 또는 시킴산 50 mg, 결정셀룰로오즈 2 g을 혼합한 후 통상의 산제 제조방법에 따라서 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.
- [235]
- [236] <1-2> 정제
- [237] 팔각회향 추출물 또는 시킴산 50 mg, 결정셀룰로오즈 400 mg, 스테아린산

마그네슘 5 mg을 혼합한 후 통상의 정제 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[238]

[239] <1-3> 캡슐제

[240] 팔각회향 추출물 및 시킴산 30 mg, 유청단백질 100 mg, 결정 셀룰로오즈 400 mg, 스테아린산 마그네슘 6 mg을 혼합한 후 통상의 캡슐제 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[241]

[242] [제조예 2] 식품

[243] <2-1> 건강식품의 제조

[244] 팔각회향 추출물 또는 시킴산 1000 mg, 비타민 A 아세테이트 70 ug, 비타민 E 1.0 mg, 비타민 B1 0.13 mg, 비타민 B2 0.15 mg, 비타민 B6 0.5 mg, 비타민 B12 0.2 ug, 비타민 C 10 mg, 비오틴 10 ug, 니코틴산아미드 1.7 mg, 엽산 50 ug, 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.

[245]

[246] <2-2> 건강음료의 제조

[247] 팔각회향 추출물 또는 시킴산 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 85°C에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 L용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 건강음료 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[248]

[249] <2-3> 츄잉껌

[250] 껌 베이스 20 중량%, 설탕 76.9 중량%, 향료 1 중량% 및 물 2 중량% 와 팔각회향 추출물 또는 시킴산 0.1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 츄잉껌을 제조하였다.

[251]

[252] <2-4> 캔디

[253] 설탕 60 중량%, 물엿 39.8 중량% 및 향료 0.1 중량%와 팔각회향 추출물 또는 시킴산 0.1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 캔디를 제조하였다.

[254]

[255] <2-5> 비스킷

[256] 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%, 압모늄 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 20.6998 중량%, 전지분유 1.16 중량%, 대용분유 0.29 중량%, 제1인산칼슘 0.03 중량%, 살포염 0.29 중량% 및 분무유 7.27 중량%와 팔각회향 추출물 또는 시킴산 1.0001 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 비스킷을 제조하였다.

[257]

[258] [제조예 3] 화장품

[259] <3-1> 영양화장수(밀크로션)

[260] 팔각회향 추출물 또는 시킴산을 하기 표 1의 영양화장수 제형 비율대로 하여 통상적인 방법에 따라 영양화장수를 제조하였다.

[261] [표1]

배합성분	제조예3-1(중량%)
팔각회향 추출물 또는 시킴산	2.0
스쿠알란	5.0
밀납	4.0
폴리솔베이트 60	1.5
솔비탄세스퀴올레이트	1.5
유동파라핀	0.5
카프릴릭/카프릭트리글리세라이드	5.0
글리세린	3.0
부틸렌글리콜	3.0
프로필렌글리콜	3.0
카르복시비닐폴리머	0.1
트리에탄올아민	0.2
방부제, 색소, 향료	적량
정제수	to 100

[262]

[263] <3-2> 유연화장수(스킨로션)

[264] 팔각회향 추출물 또는 시킴산을 하기 표 2의 유연화장수 제형 비율대로 하여 통상적인 방법에 따라 유연화장수를 제조하였다.

[265] [표2]

배합성분	제조예3-2(중량%)
팔각회향 추출물 또는 시킵산	2.0
글리세린	3.0
부틸렌글리콜	2.0
프로필렌글리콜	2.0
카르복시비닐폴리머	0.1
PEG 12 노닐페닐에테르	0.2
폴리솔베이트 80	0.4
에탄올	10.0
트리에탄올아민	0.1
방부제, 색소, 향료	적량
정제수	to 100

[266]

[267] <3-3> 영양크림

[268] 팔각회향 추출물 또는 시킵산을 하기 표 3의 영양크림 제형 비율대로 하여 통상적인 방법에 따라 영양크림을 제조하였다.

[269] [표3]

배합성분	제조예3-3(중량%)
팔각회향 추출물 또는 시킴산	2.0
폴리솔베이트 60	1.5
솔비탄세스퀴올레이트	0.5
PEG60 경화피마자유	2.0
유동파라핀	10
스쿠알란	5.0
카프릴릭/카프릭트리글리세라이드	5.0
글리세린	5.0
부틸렌글리콜	3.0
프로필렌글리콜	3.0
트리에탄올아민	0.2
방부제	적량
색소	적량
향료	적량
정제수	to 100

[270]

[271] <3-4> 마사지크림

[272] 팔각회향 추출물 또는 시킴산을 하기 표 4의 마사지크림 제형 비율대로 하여 통상적인 방법에 따라 마사지크림을 제조하였다.

[273] [표4]

배합성분	제조예3-4(중량%)
팔각회향 추출물 또는 시킴산	1.0
밀납	10.0
폴리솔베이트 60	1.5
PEG 60 경화피마자유	2.0
솔비탄세스퀴올레이트	0.8
유동과라핀	40.0
스쿠알란	5.0
카프릴릭/카프릭트리글리세라이드	4.0
글리세린	5.0
부틸렌글리콜	3.0
프로필렌글리콜	3.0
트리에탄올아민	0.2
방부제, 색소, 향료	적량
정제수	to 100

[274]

[275] <3-5> 팩

[276] 팔각회향 추출물 또는 시킴산을 하기 표 5의 팩 제형 비율대로 하여 통상적인 방법에 따라 팩을 제조하였다.

[277] [표5]

배합성분	제조예3-5(중량%)
팔각회향 추출물 또는 시킵산	1.0
폴리비닐알콜	13.0
소듐카르복시메틸셀룰로오스	0.2
글리세린	5.0
알란토인	0.1
에탄올	6.0
PEG 12 노닐페닐에테르	0.3
폴리솔베이트 60	0.3
방부제, 색소, 향료	적량
정제수	to 100

[278]

[279] <3-6> 젤

[280] 팔각회향 추출물 또는 시킵산을 하기 표 6의 젤 제형 비율대로 하여 통상적인 방법에 따라 젤을 제조하였다.

[281] [표6]

배합성분	제조예3-6(중량%)
팔각회향 추출물 또는 시킵산	0.5
에틸렌디아민초산나트륨	0.05
글리세린	5.0
카르복시비닐폴리머	0.3
에탄올	5.0
PEG 60 경화피마자유	0.5
트리에탄올아민	0.3
방부제, 색소, 향료	적량
정제수	to 100

[282]

산업상 이용가능성

[283] 본 발명은 팔각회향 추출물 및 시킵산을 함유하는 근육 질환 예방 및 치료용 또는 근 기능 개선용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 팔각회향 추출물 및

시킴산은 근 단백질 합성에 관여하는 mTOR의 활성 증가 및 근 단백질 분해에 관여하는 MuRF-1과 atrogin-1의 mRNA 발현을 감소시키는 효과가 있으며, 근육량을 증가시키고 및 근기능을 향상시켜, 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육 퇴화, 근무력증, 약액질(cachexia) 및 근육감소증(sarcopenia) 등의 각종 근육 질환 예방, 치료 또는 개선에 유용하게 이용될 수 있으므로 산업상 이용가능성이 있다.

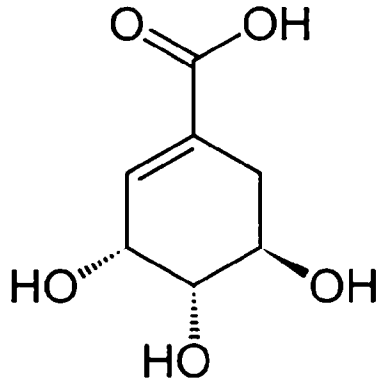
서열목록 Free Text

- [284] 서열번호 1은 Atrogin-1의 Forward primer이며, 다음과 같다.
5'-GTTACTGCAACAAGGAGAATCTGTT-3'(서열번호 1) 서열 번호 2는, Atrogin-1의 Reverse primer이며
5'-CCGTATGAGTCTTATGTTTTGCTGG-3'(서열번호 2)와 같다.
- [285] 서열번호 3은 MuRF-1의 Forward primer이며
5'-CCGGACGGAAATGCTATGGA-3'(서열번호 3)와 같고, 서열번호 4는 MuRF-1의 Reverse primer이며 5'-AGCCTGGAAGATGTCGTTGG-3'(서열번호 4)와 같다.
- [286] 서열번호 5는 β -Actin의 Forward primer이며
5'-TGACAGGATGCAGAAGGAGATTAC-3'(서열번호 5)와 같고, 서열번호 6은 β -Actin의 Reverse primer이며 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTC-3'(서열번호 6)와 같다.
- [287] 다음은, MyoD의 Forward primer서열이며,
5'-TGCCTCGGAGATAATACAGCC-3'와 같고, MyoD의 Reverse primer서열은 5'-GGTGTAACAACCATAACCCCACT-3'과 같다.
- [288] Myogenin의 Forward primer서열은 5'-AGAGAGCCCCCTTGTTAATGC-3'와 같으며, Reverse primer서열은 5'-GGCCACTCACTGTCTCTCAA-3'와 같다.
- [289] MRF4의 Forward primer서열은 5'-CTTGAGGGTGCGGATTCCT-3'와 같고, Reverse primer서열은 5'-GGGAGTTTGCGTTCCTCTGA-3'와 같다.

청구범위

[청구항 1] 팔각회향 추출물 또는 하기 화학식 1로 표시되는 시킴산을 유효성분으로 함유하는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물:

[화학식 1]



[청구항 2] 제 1 항에 있어서,
화학식 1로 표시되는 시킴산은 팔각회향 추출물로부터 분리된 것을 특징으로 하는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

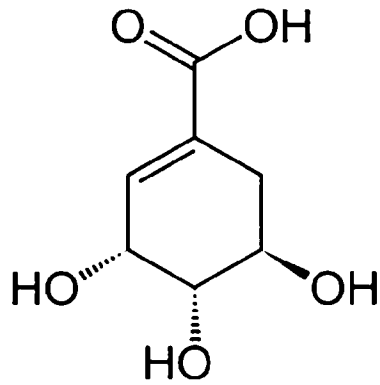
[청구항 3] 제 1 항에 있어서,
팔각회향 추출물은 물, 탄소수 1 내지 6의 유기용매, 아임계 유체 및 초임계 유체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 용매로 팔각회향을 추출하여 수득한 것을 특징으로 하는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 4] 제 3 항에 있어서,
상기 유기용매는,
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 이상의 적어도 어느 하나의 용매인 근육 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 5] 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 근육 질환은, 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육 퇴화, 근무력증, 약액질(cachexia) 및 근육감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 질병을 예방 또는 치료하는 것을 특징으로 하는 근육 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

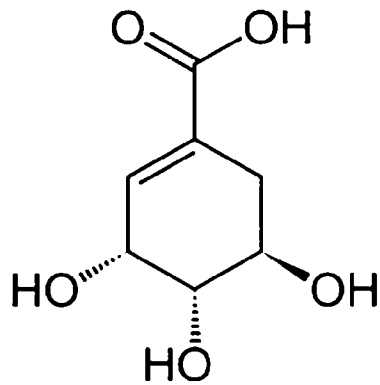
[청구항 6] 팔각회향 추출물 또는 하기 화학식 1로 표시되는 시킴산을 유효성분으로 함유하는 근육 질환 예방 또는 근 기능 개선용 식품 조성물:

[화학식 1]



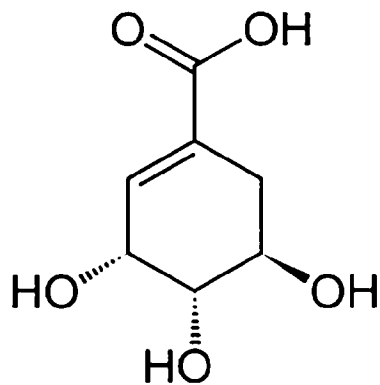
[청구항 7] 팔각회향 추출물 또는 하기 화학식 1로 표시되는 시킴산을 유효성분으로 함유하는 근 기능 개선용 화장료 조성물:

[화학식 1]



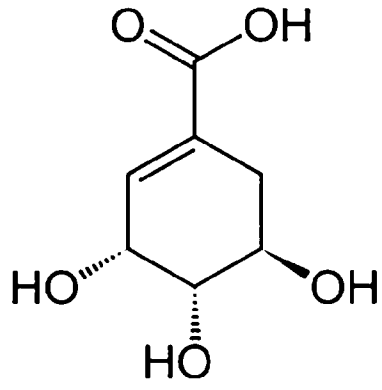
[청구항 8] 팔각회향 추출물 또는 하기 화학식 1로 표시되는 시킴산을 유효성분으로 함유하는 조성물을 개체에 투여 또는 복용시키는 단계를 포함하는 근육 질환 예방 또는 치료방법:

[화학식 1]

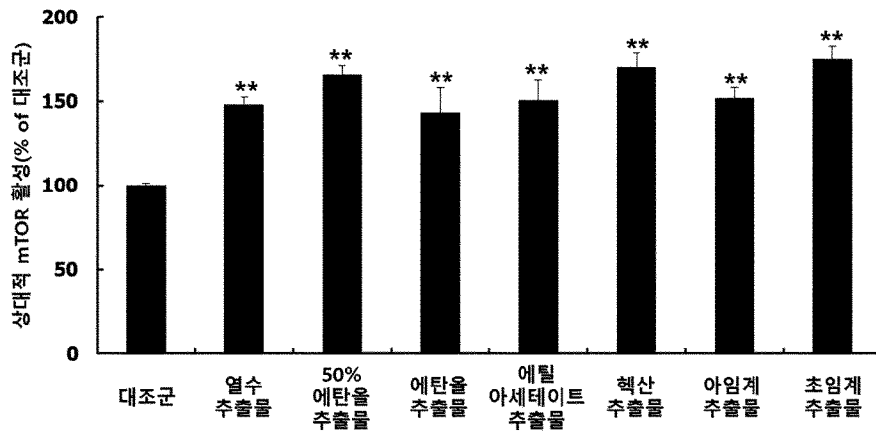


[청구항 9] 팔각회향 추출물 또는 하기 화학식 1로 표시되는 시킴산을 유효성분으로 함유하는 조성물의 근육 질환 예방 또는 치료 용도:

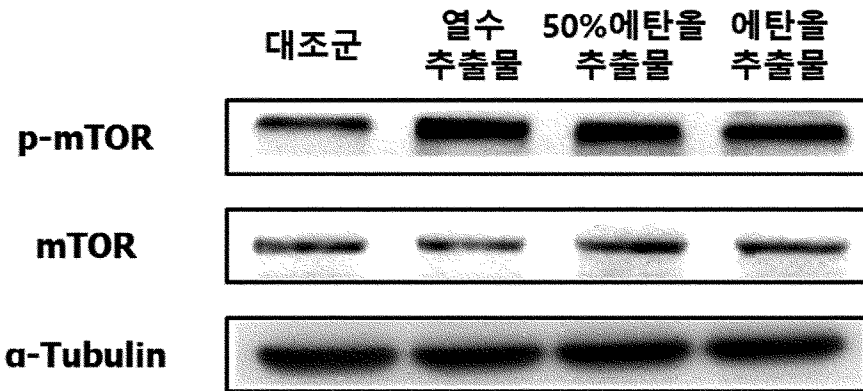
[화학식 1]



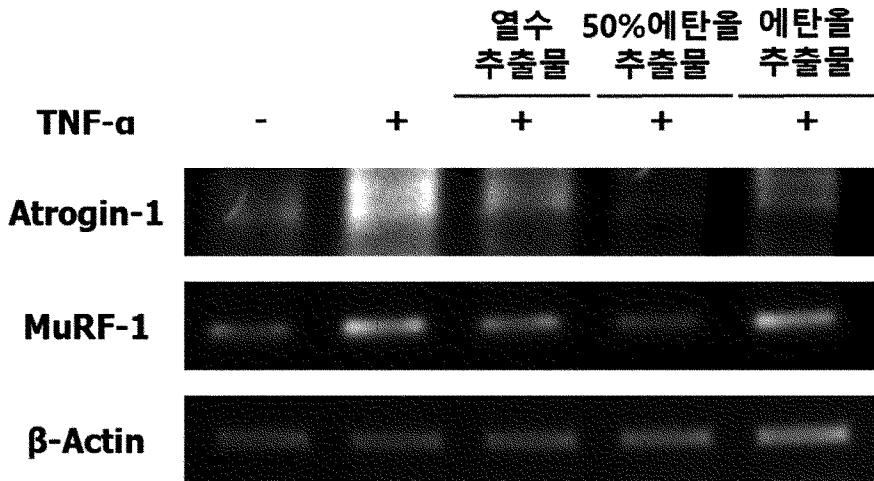
[도1]



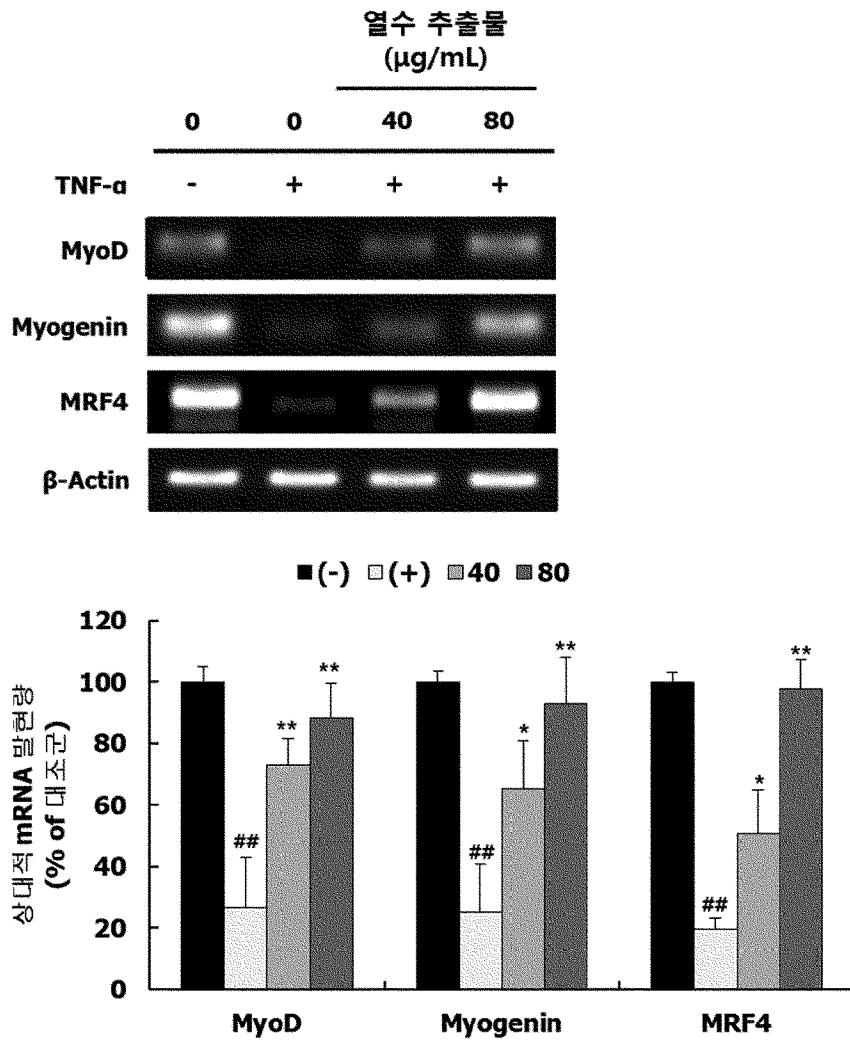
[도2]



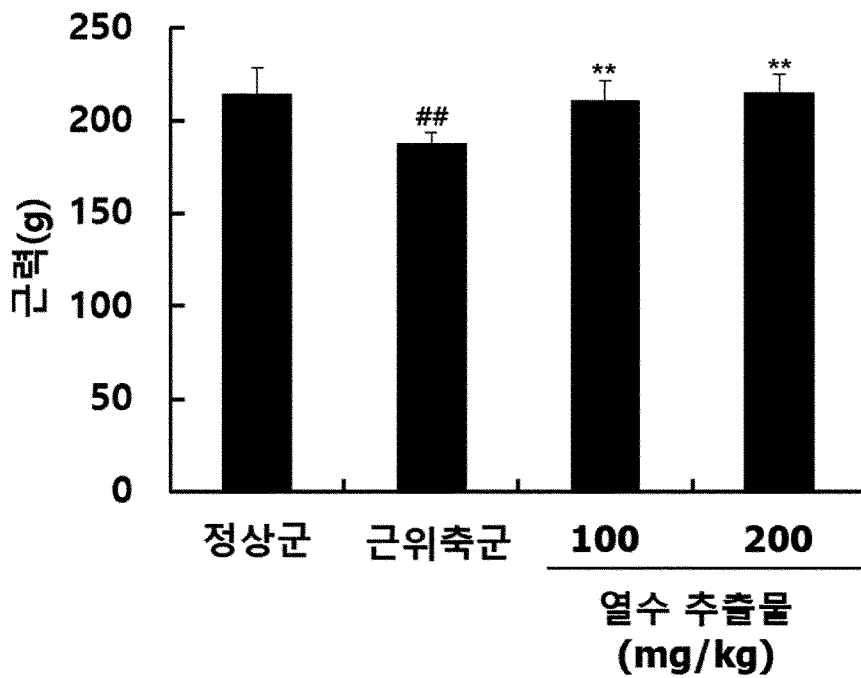
[도3]



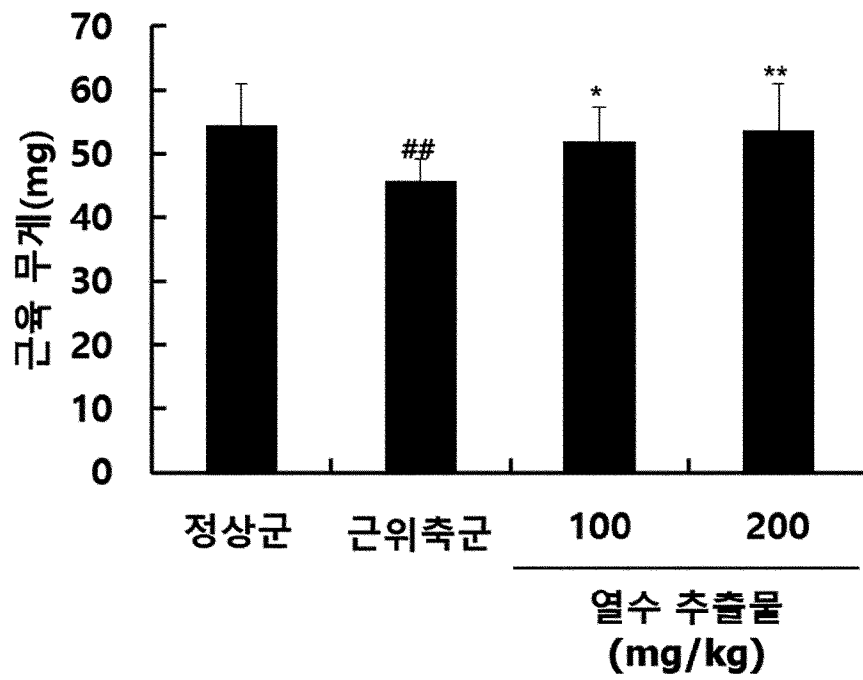
[도4]



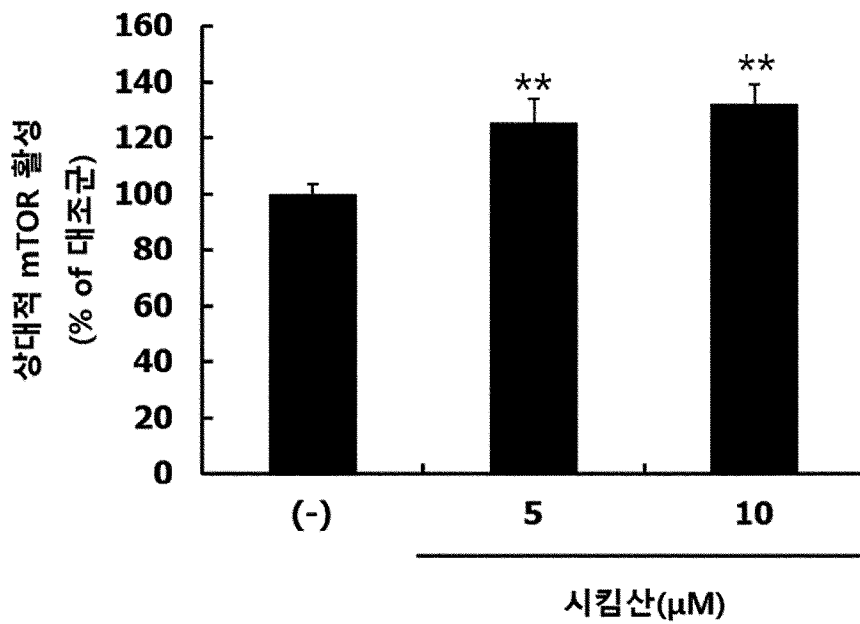
[도5]



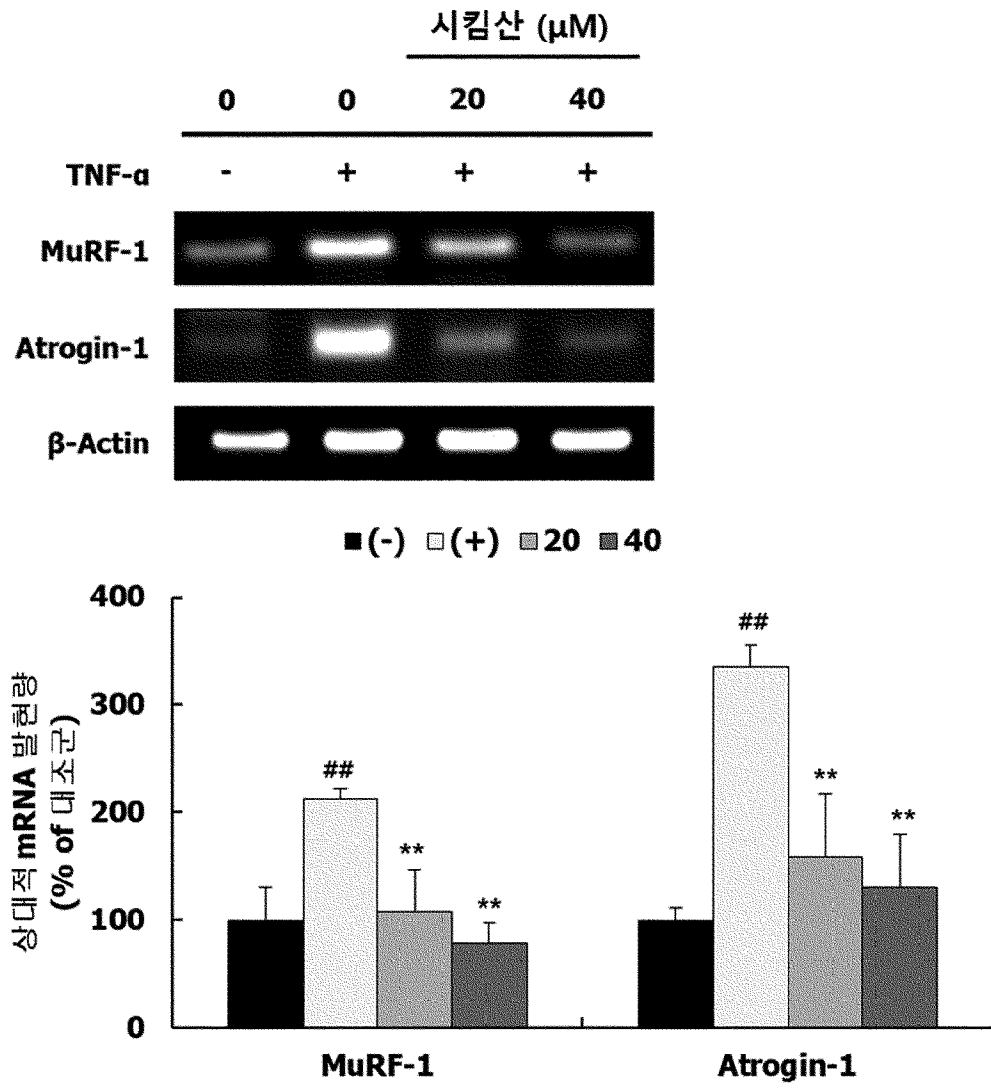
[도6]



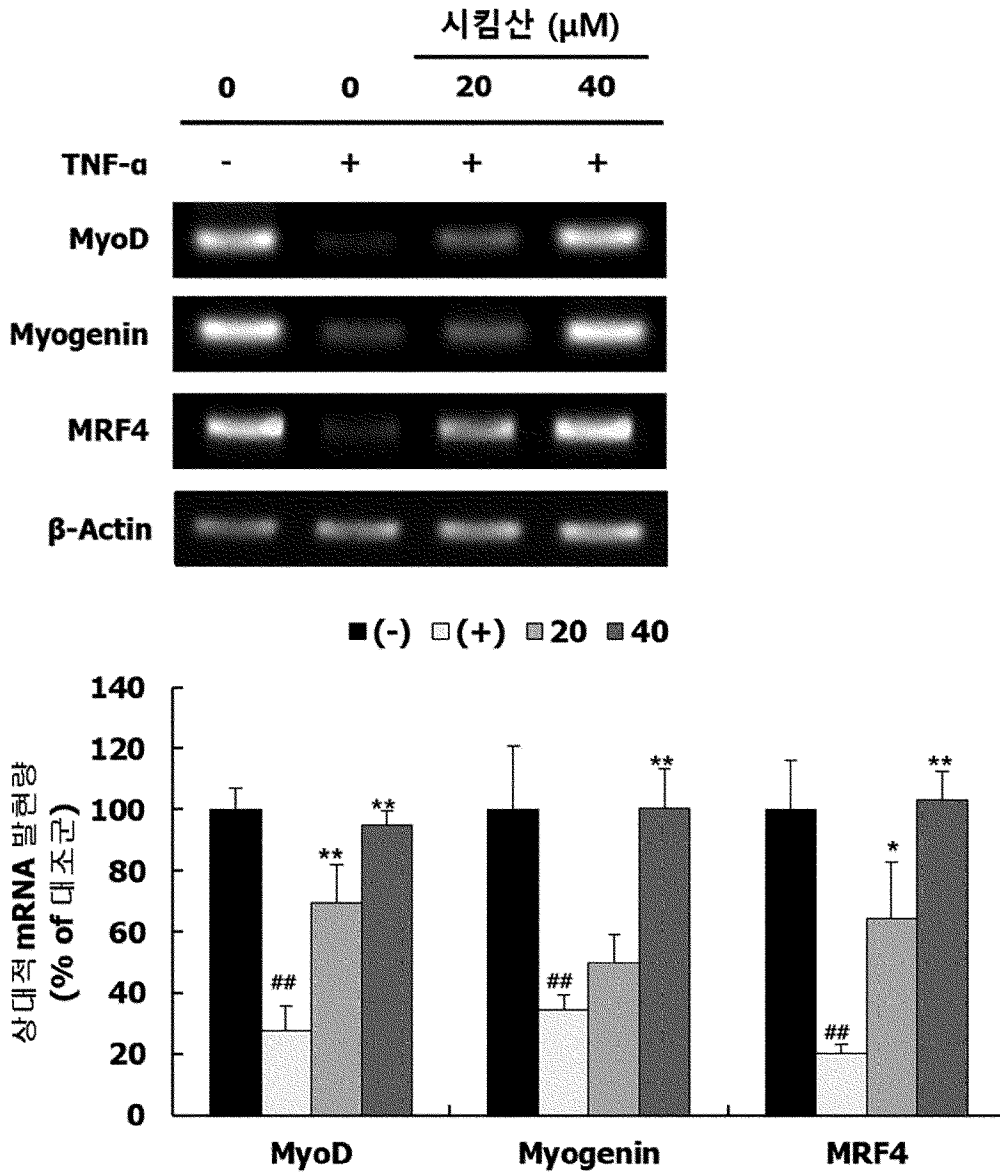
[도7]



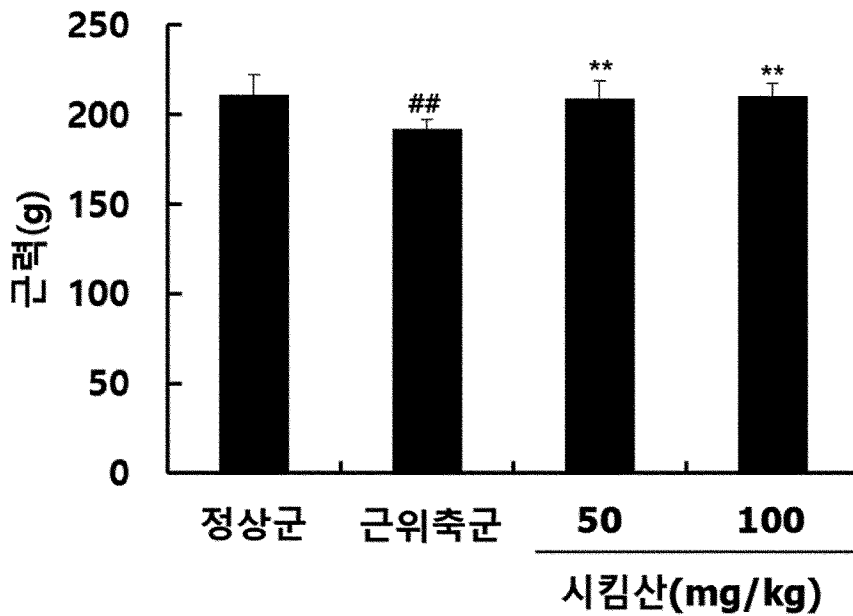
[도8]



[도9]



[도10]



[도11]

