(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0064915
(43) 공개일자 2021년06월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/64 (2015.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61P 21/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/64 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0153665
(22) 출원일자 2019년11월26일
심사청구일자 2019년11월26일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김기영
경기도 용인시 수지구 푸른솔로 49, 706동 1302호(죽전동, 도담마을7단지뜨리에체아파트)
김민호
충청남도 천안시 동남구 서부대로 252, 202동 905호(신방동, 신방동두레현대아파트2단지)
김재구
경기도 고양시 일산동구 위시티4로 46, 211동 904호(식사동, 위시티일산자이2단지아파트)
(74) 대리인
특허법인 하나

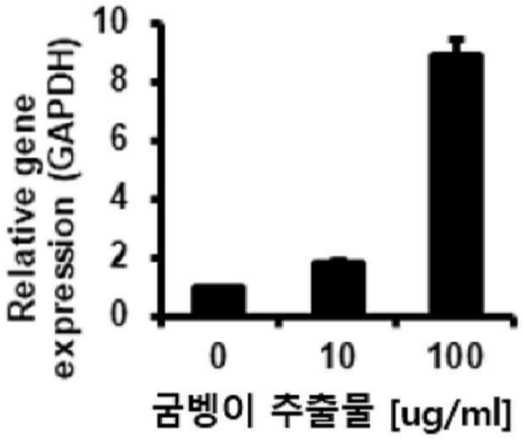
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **굼벵이 추출물을 포함하는 근기능 개선용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*) 유충의 추출물을 포함하는 근육 활성 증진 및 근기능 개선, 운동 수행 능력 향상을 위한 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 21/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/316 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	GRRC 경희 2018-B4
부처명	경기도
과제관리(전문)기관명	경기도
연구사업명	글로벌의약품소재개발연구센터
연구과제명	미토콘드리아 특이 질환 치료제 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2018.07.01 ~ 2020.06.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*) 유충의 추출물을 포함하는, 근육 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 근육 질환은 근육 손상, 근 기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인하여 유발된 근육 질환인 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증(myasthenia), 악액질(cachexia) 및 근육감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 추출물은 물, C_1 내지 C_4의 저급 알코올, 또는 이들의 혼합 용매로 추출된 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 추출물은 냉침, 환류 및 초음파 추출로 구성된 군에서 하나 이상 선택되는 방법에 의해 추출된 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 근육 손상은 근육 좌상(muscle strain), 근육 파열(muscle rupture), 근육 열상(muscle tearing), 타박상(contusion), 염좌(distortion), 회전근개 증후근(roator cuff syndrome) 및 근육염(myositis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*) 유충의 추출물을 포함하는, 운동수행능력 향상용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 운동수행능력 향상은 운동 수행 가능 시간(exercise endurance) 증가, 근력 강화, 균형 감각 증진 및 운동 적응 능력(exercise adaptation) 증진으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 효과가 있는 것인, 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 운동수행능력 향상은 미토콘드리아 이상 질환, 신경퇴행성 질환, 지구력 저하증 및 순발력 저하증으로 이

루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 질환을 예방 또는 개선하는 것인, 조성물.

청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 운동수행능력 향상용 식품 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 개체의 근육 질환을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 12

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 개체의 운동수행능력을 향상시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*) 유충의 추출물을 포함하는 근육 활성 증진 및 근기능 개선, 운동 수행 능력 향상을 위한 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 근육은 크게 골격근, 심장근, 내장 근육으로 구분된다. 이중 골격근은 체중의 40%를 차지할 정도로 많은 인체의 많은 부분을 차지하고 있으며, 뼈와 함께 인체의 형태를 잡아주며 운동, 움직임을 가능하게 한다. 이러한 뼈와 골격근을 합쳐 근골격계라고 부른다.

[0003] 근육의 기본 세포는 근섬유 세포(myoblast)로 구성되어 있다. 근육에 상처가 생기거나, 과격한 운동으로 인한 근육 조직의 파열이 생길시, 근육 조직의 줄기세포인 위성 세포(satellite cell)가 활성화되어 위성 세포의 분열이 촉진된다. 증가한 위성 세포의 일부는 다시 줄기세포의 기능을 보전하고, 일부는 근육 세포로 분화를 시작한다. 이때, 근육 세포의 분화에 관련된 여러 전사 인자들이 활성화되며 위성 세포는 근세포(myocyte), 근섬유(myoblast) 및 근관(myotube) 순으로 분화를 하여 상처 부위 및 파손된 근육 조직을 다시 새로운 근섬유로 채워 넣게 된다.

[0004] 한편, 근육의 성장은 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, 먼저 근육 세포의 수를 늘려 성장하는 증생(hyperplasia)과 세포의 크기를 늘려 성장하는 비대(hypertrophy)가 있다. 주로 증생(hyperplasia)은 성장기 즉, 유아기로부터 2차 성징까지 주로 일어나게 되며, 운동으로 근육의 크기를 성장시키는 것은 비대(hypertrophy)에 해당한다. 또한, 적당한 양의 운동을 지속해서 수행하여 근육 세포에 자극을 주게 되면, 근육 발달에 관여하는 인자들이 지속해서 발현된다. 근섬유의 크기와 수, 근육의 발달 및 근육량 증대는 물론 근육의 운동성에 중요한 ATP를 합성하는 미토콘드리아의 생합성 및 그 기능을 향상하게 된다.

[0005] 이러한 근육의 항상성 유지는 원활한 삶을 유지하기에 필수적인 조건이지만 현대 사회에서는 고령화 및 직업분포의 변화 등에 따라 운동 부족 현상이 증가하고 있다. 이로 인해 근육 사용량이 줄어들어 근육량 및 근 기능이 저하되어 피로감을 쉽게 느끼거나 작은 충돌에도 큰 상처를 입게 되는 사건이 잦아지고 있다. 또한, 불규칙한 식생활, 스트레스, 술, 흡연 등 인체에 해로운 행동도 근 기능 약화를 불러오는 원인이 되고 있다.

[0006] 근력이란 근육의 능력으로, 주로 근육이 한 번에 최대로 낼 수 있는 힘을 의미한다. 운동 수행능력이란 근력을 이용하여 운동을 수행하는 능력을 의미한다. 상기 언급한 문제들로 인한 근 기능 약화 및 근육 약화는 근력 및 운동 수행능력의 저하를 불러오게 되며 이는 체력 저하, 성인병 증가, 삶의 질 감소 등의 원인이 된다.

[0007] 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*)는 꽃무지족에 속하는 17~22㎜ 크기의 구릿빛 검은색을 띄며 광택이 있고 편평하며 딱딱한 인상을 주는 풍뎅이의 일종으로, 앞날개를 펼치지 않고 날며 꽃 또는 나무의 수액에 모여드는 습성이 있다.

[0008] 애벌레는 굼벵이라고도 불리며, 동의보감에도 실리는 등 예로부터 한약재로 좋은 취급을 받아왔다. 생으로 먹기도 하고 굽거나 볶아먹기도 하는데, 곤충 식품이 각광을 받으면서 2014년 9월 30일 흰점박이꽃무지 애벌레가 식료품으로 인정받았으며 다수의 농장에서 양식이 이루어지고 있고 애완동물로 기르기도 하는 등 사람에게 매우

친숙한 곤충이다.

[0009] 하지만 상기 추출물 및 성분은 신규 단백질원으로서의 식품 또는 첨가물로는 알려져 있으나, 근육 기능과 관련된 근 기능 개선 및 이를 통한 운동 수행 능력 향상에 대한 연구는 이루어지지 않았을 뿐만 아니라 보고된 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1382400호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*) 유충의 추출물을 포함하는 근육 질환 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*) 유충의 추출물을 포함하는 운동수행능력 향상용 조성물과 이를 포함하는 식품조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 투여하여 근육 질환 치료 또는 운동수행능력을 향상시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은, 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*) 유충의 추출물을 포함하는, 근육 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명에서 상기 “흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*)”는 식용곤충의 하나로서, 민간 및 동의보감 등의 전통 한방의서에서 "제조" 또는 "굼벵이" 라는 속명으로 불리고 있는 딱정벌레목, 풍뎅이과, 꽃무지아과에 속하며, 몸길이 17~22 ㎜, 폭 12~15 ㎜의 초식성 곤충이고, 몸은 진한 구리빛이고 광택이 있으며 황백색 무늬가 흩어져 있다.

[0016] 상기 흰점박이꽃무지는 오래전부터 간질환 등의 치료를 위한 한방 약재로 이용되어 왔다. 또한, 최근에 유용한 생체 활성물질의 탐색 및 개발을 위한 곤충자원으로 크게 주목을 받고 있으며, 항생활성물질의 생산, 흰쥐(mouse)를 이용한 실험에서 알코올 과량섭취에 의해 손상된 간 지질 대사의 회복작용 등이 알려져 있고 혈전용해성 효소에 대한 연구와 집쥐(rat)에서 사염화탄소의 투여에 의해 유도된 간독성에 대한 간 보호 효과를 나타내는 등 유용성이 확인된 바 있으나, 근육 기능과 관련된 근 기능 개선 및 이를 통한 운동 수행능력 향상에 관한 연구는 이루어지지 않았을 뿐만 아니라 보고된 바 없다.

[0017] 본 발명의 명세서에서는 상기 흰점박이꽃무지의 유충을 대신하여 “굼벵이” 라는 용어를 사용하였다.

[0018] 본 발명에서 "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 비례하고, "근 기능 개선"은 근 기능을 더 좋게 향상시키는 것을 의미한다.

[0019] 본 발명에서 "운동수행능력"은 일상생활이나 스포츠에서 볼 수 있는 신체동작을 외형적으로 달리기, 뛰기, 던지기, 헤엄치기 등으로 구분할 때, 상기 동작을 빠르게, 강하게, 정확하게, 오래, 능숙하게 할 수 있는 정도를 나타내는 것으로, 운동수행능력은 근력, 민첩성 및 지구력 등의 인자로 규정되며, "운동수행능력 향상"은 운동수행능력을 개선하거나 향상시키는 것을 의미한다.

[0020] 본 발명에서는 굼벵이 추출물의 처리에 따른 근 기능 개선 및 운동 수행능력 향상의 정도를 확인하기 위하여 근 기능 및 근 합성과 관련된 유전자(실험예 1) 및 단백질의 발현 정도를 비교하였고(실험예 2), 나아가 굼벵이 추

출물 처리에 의한 근육 세포 내 ATP양 변화(실험예 3) 및 근육 세포 증식 변화(실험예 4) 정도를 확인하였다.

[0021] 본 발명에 있어서, 구체적으로 상기 추출물은 물, C_1 내지 C_4의 저급 알코올, 또는 이들의 혼합 용매로 추출된 것일 수 있다. 더욱 구체적으로는 물을 이용해 추출된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 구체적으로, 상기 추출물의 추출공정은 냉침, 온침, 가열, 환류 및 초음파 추출로 구성된 군에서 하나 이상 선택되는 방법을 단독 또는 혼합하여 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않고 필요에 따라 이를 적절히 변경하여 적용할 수 있다.

[0023] 또한, 상기 추출물은 추출 또는 분획과정을 수행한 이후, 감압 여과 과정을 수행하거나 추가로 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 농축하거나 용매를 제거할 수 있고, 구체적으로는 추출 후에 감압 농축하는 과정을 거쳐 추출물을 수득할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 적절히 변경하여 적용 가능하다.

[0024] 본 발명에 있어, 구체적으로 상기 근육 질환은 근 기능 저하, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환인 것일 수 있으며, 더욱 구체적으로 상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증(myasthenia), 악액질(cachexia) 및 근육감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 상기 “긴장감퇴증(atony)”는 이완증(弛緩症), 무긴장증, 긴장감퇴증이라고도 부르는 질환으로서, 근긴장의 감퇴 또는 소실한 상태를 말한다.

[0026] 상기 “근위축증(muscular atrophy)”은 근육을 사용하지 않음으로써 발생하는 근육 조직의 손실 또는 근육 자체의 병 또는 근육을 지배하는 신경의 손상을 말하며, 점진적인 근위축과 근쇠약을 모두 포함한다. 일반적으로는 근육을 사용하지 않음으로써 심각한 근육 강도 손실이 발생해 점차 근위축으로 진행하게 되는 경우가 있으며, 이에 더해 중력이 없는 곳에서 생활하는 사람의 경우 또는 칼슘과 근육 강도의 감소에 의해 근력이 저하되는 증상을 보이는 경우가 있다.

[0027] 또한, 근육 자체의 병으로 인한 근위축으로 중증 근무력증(myasthenia gravis), 듀센형, 베커형, 지대형, 안면견갑상완형과 근육 자체에 발생하는 염증 등을 포함할 수 있으며, 근육을 지배하는 신경의 손상으로 인한 근위축으로 척수성 근위축(spinal muscular amyotrophy)인 베라드니히-호프만형, 쿠겔베르그-벨란더병, 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)인 루게릭병, 척수구 근위축(spinobular muscular atrophy)인 케네디병을 모두 포함할 수 있다.

[0028] 상기 “근이영양증(muscular dystrophy)”은 퇴행성 근육병증의 일종으로, 근육섬유의 괴사를 나타내며 근세포막의 손상으로 근육섬유의 괴사와 퇴행과정을 거쳐 근력저하 및 위축이 발생된다. 뒤시엔느 근이영양증(Duchenne muscular dystrophy), 베커 근이영양증(Becker muscular dystrophy), 사지골반 근이영양증(Limb-girdle muscular dystrophy), 에머리-드라이푸스 근이영양증(Emery-Dreifuss muscular dystrophy), 안면 견갑상환 근이영양증(Facioscapulohumeral muscular dystrophy), 근긴장성 근이영양증(Myotonic muscular dystrophy), 안구 인두 근이영양증(Oculopharyngeal muscular dystrophy), 말단 근육 근이영양증, 선천성 근이영양증(Congential muscular dystrophy) 등을 포함하며, 부위에 따라 다양한 형태로 나타날 수 있다.

[0029] 또한, 상기 근육 소모 또는 근육 퇴화는 전적 요인, 후천적 요인, 노화 등을 원인으로 발생하며, 근육량의 점진적 손실, 근육, 특히 골격근 또는 수의근 및 심장근육의 약화 및 퇴행을 모두 포함하며, 이로 인한 근력 약화를 모두 포함할 수 있다.

[0030] 상기 "근력 약화"는 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 의학적 검진을 통해 객관적인 방법으로 정량화될 수 있다. 근력 약화의 원인으로는 근손상, 근육 세포의 분화 감소 등으로 인한 근육량 감소, 근육 노화 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명에서, “근육 손상”은 상해에 따른 물리적 또는 화학적인 파괴에 의한 모든 손상을 말한다.

[0032] 구체적으로, 상기 근육 손상은 근육 좌상(muscle strain), 근육 파열(muscle rupture), 근육 열상(muscle tearing), 타박상(contusion), 염좌(distortion), 회전근개 증후근(roator cuff syndrome) 및 근육염(myositis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 상기 “근무력증(myasthenia)”은 근육의 신경장애로 근육이 쇠약해지는 질환으로서, 처음에는 눈꺼풀처짐(안검

하수)과 눈동자가 잘 안 돌아가는 등 가벼운 증상이 나타난다. 또 말을 할 때 발음이 정확하지 않거나 음식을 잘 못 삼키게 된다. 이밖에 얼굴 근육도 약해진다. 근무력증이 심해지면 증상은 전신으로 번져서 팔과 다리에 힘이 잘 들어가지 않아 물건을 잘 들지 못하고 쉽게 넘어지게 된다. 또 호흡곤란과 호흡마비 같은 위험한 상태가 나타날 수도 있다.

[0034] 상기 “악액질(cachexia)”은 전신상태의 두드러진 쇠약을 가져오는 상태를 의미하는 것으로서, 원인으로서 악성종양, 바세도우병, 하수체기능저하증, 말라리아, 부신피질 기능저하증, 흉선기능부전 등이 있다. 임상적으로는 전신의 쇠약, 빈혈, 부종이 주요 징후이다. 악성종양의 빈혈, 종양자체의 국소적인 영향으로 인해 영양장애를 가져오고 전신적으로는 숙주의 대사와 경합해 종양의 대사산물에 의해 숙주대사장애를 일으키고 악액질이 생기는 것으로 알려져 있다.

[0035] 본 발명에 있어, 구체적으로 상기 운동수행능력 향상은 미토콘드리아 이상 질환, 신경퇴행성 질환, 지구력 저하증 및 순발력 저하증으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 질환을 예방 또는 치료하는 것을 의미하는 것일 수 있다.

[0036] 본 발명에서 상기 ”미토콘드리아 이상 질환(mitochondrial disease)”은 미토콘드리아의 기능 이상에 기인한 질환으로, 미토콘드리아 막 전위 이상으로 인산 팽윤, 활성산소종 또는 자유 라디칼 등에 의한 산화적 스트레스로 인한 기능 이상, 미토콘드리아 DNA나 세포핵의 미토콘드리아 기능 관련 유전자 변이와 같은 유전적 요인으로 인한 기능 이상, 미토콘드리아의 에너지 생성을 위한 산화적 인산화(oxidative phosphorylation) 기능의 결함 등으로 인한 질환 등을 모두 포함할 수 있다.

[0037] 미토콘드리아는 세포 에너지인 ATP를 생성하는 필수 세포 소기관으로, 미토콘드리아의 기능 이상은 세포 내에서 만들어지는 에너지가 점점 줄어들며, 세포 손상 또는 심지어 세포사가 뒤따른다. 이에 따라, 미토콘드리아 기능 이상은 미토콘드리아가 없는 적혈구 이외 미토콘드리아를 포함하는 모든 세포 기능을 저해하며, 특히 근육이나 뇌와 같이 에너지 수요가 높은 기관에 치명적인 손상을 주게 된다.

[0038] 미토콘드리아의 기능 이상은 실질적으로 거의 모든 조직이 영향을 받을 수 있으며, 조직이 관여하는 정도에 따라 매우 다양한 증상들이 존재할 수 있다. 구체적인 미토콘드리아 이상 질환의 예로는 프리이드라이히 실조(Friedreich's ataxia)(FRDA), 레버씨 선천성 시신경병증(Leber's Hereditary Optic Neuropathy)(LHON), 우성 유전 시신경 위축(Dominant Optic atrophy)(DOA); 미토콘드리아 근병증, 뇌병증, 고젖산혈증, 뇌졸중(Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactacidosis, Stroke)(MELAS), 불균일 적색근육 섬유를 갖는 근간대성 간질(Myoclonus Epilepsy Associated with Ragged-Red Fibers)(MERRF) 증후군, 레이(Leigh) 증후군 및 산화적 인산화 장애 등이 있고, 대부분의 미토콘드리아 질환은 신경퇴행성 질환, 뇌졸중, 실명, 청각 장애, 당뇨병 및 심부전 등을 나타낼 수 있는 것으로 알려져 있다.

[0039] 본 발명의 굼벵이 추출물을 근육세포(C2C12)에 처리한 경우(실험예 1) ATP 생산과 관련된 유전자 발현이 증가하는 것을 확인하였으며, 실험예 3에서는 실제 세포 내 ATP의 양이 증가한 것을 확인하였다(도 19). 따라서, 본 발명의 굼벵이 추출물은 미토콘드리아 이상 질환 및 ATP 부족으로 근육과 뇌의 손상으로부터 유발될 수 있는 신경퇴행성 질환, 지구력 저하증 및 순발력 저하증에 대하여 개선 및 예방 효과를 나타낼 수 있다.

[0040] 본 발명에서 상기 “신경퇴행성 질환(Neurodegenerative Disease)”은 신경구조와 기능 상실에 의해 운동조절능력, 인지기능, 지각기능, 감각기능 및 자율신경의 기능 이상을 유발하는 질환으로, 루게릭병(근위축성 측삭경화증, Amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD) 및 파킨슨병(Parkinson's disease; PD)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 의미할 수 있다.

[0041] 본 발명에서 상기 “지구력 저하증” 및 “순발력 저하증”은 근육 세포 내 미토콘드리아의 기능 이상으로 인해 유발되는 것으로서 정상적인 ATP 합성과정이 진행되지 않아 유발되는 것일 수 있다.

[0042] 본 발명에서 상기 “예방”은 동물의 병리학적 세포의 발생 또는 세포의 손상, 소실의 정도의 감소를 의미한다. 예방은 완전할 수 있으며 또는 부분적일 수도 있다. 이 경우에는 개체 내의 병리학적 세포의 발생 또는 신경세포의 사멸이나 손실 등이 상기 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상용 조성물을 사용하지 않은 경우와 비교하여 감소하는 현상을 의미할 수 있다.

[0043] 본 발명에서 상기 “치료”는 상기 근육 질환의 증상을 개선하거나, 증상의 진행을 저지하는 것을 의미하며, 통상적으로 사용되는 치료의 의미를 포괄할 수 있다.

[0044] 본 발명의 다른 측면은 상기 조성물을 포함하는 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상용 약학적 조성물을 제

공한다.

[0045] 상기 약학적 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 굼벵이 추출물을 0.001 중량% 내지 99.9 중량%, 구체적으로는 0.1 중량% 내지 99 중량%, 더욱 구체적으로는 1중량% 내지 50 중량% 포함할 수 있다. 또한, 상기 추가성분의 함량은 구체적으로 상기 굼벵이 추출물 100 중량부 당 0.1 내지 20 중량부 범위에서 추가할 수 있다.

[0046] 또한, 상기 약학적 조성물은 통상적인 약학적 조성물의 조제에 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0047] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유를 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 또한, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화 하여 사용할 수 있다.

[0049] 상기 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 굼벵이 추출물과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제, 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 또는 젤라틴 등을 혼합하여 조제할 수 있다. 상기 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제가 사용될 수도 있다.

[0050] 상기 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0051] 상기 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 사용될 수 있다. 상기 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르가 사용될 수 있다. 상기 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴이 사용될 수 있다.

[0052] 상기 굼벵이 추출물을 포함하는 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양이 대상체에 투여될 수 있다. 상기 “약제학적으로 유효한 양”은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0053] 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 바람직하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0054] 본 발명의 치료용 조성물의 바람직한 투여량은 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 본원발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 치료용 조성물은 굼벵이 추출물의 양을 기준으로 1일 0.0001 내지 1000mg/kg으로, 보다 효과적이기 위해서는 0.01 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량과 투여횟수는 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0055] 본 발명의 다른 측면은, 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*) 유충의 추출물을 포함하는, 운동수행능력 향상용 조성물을 제공한다

[0057] 구체적으로, 상기 운동수행능력 향상은 운동 수행 가능 시간(exercise endurance) 증가, 근력 강화, 균형 감각 증진 및 운동적응 능력(exercise adaptation) 증진으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 효과를 나타내는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0058] 구체적으로, 상기 운동수행능력 향상은 미토콘드리아 이상 질환, 신경퇴행성 질환, 지구력 저하증 및 순발력 저하증으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 질환을 예방 또는 개선하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0059] 미토콘드리아 이상 질환, 신경퇴행성 질환, 지구력 저하증 및 순발력 저하증은 상기 설명한 바와 같다.

[0060] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 조성물을 포함하는, 운동수행능력 향상용 식품 조성물을 제공한다.

[0061] 본 발명에서 식품이라 함은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 건강기능식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제를 모두 포함하는 의도이다.

[0062] 본 발명의 식품은 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영,유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예,스넥류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예,과실,채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면스프 등)을 포함하나 이에 한정되지 않는다.상기 식품, 건강기능식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0063] 본 발명에서 건강기능식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0064] 본 발명에서 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 건강기능음료를 포함하는 의도이다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 굼벵이 추출물을 유효성분으로 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0065] 상기의 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100㎖ 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 5 내지 12g일 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일 주스, 과일 쥬스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육을 추가로 함유할 수 있다.

[0066] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하지 않지만, 본 발명의 굼벵이 추출물 100 중량부 당 0 내지 20 중량부 범위에서 선택될 수 있다.

[0067] 본 발명에서 건강기능음료란 음료에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 음료의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 음료 군이나 음료 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 신체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 음료를 의미한다.

[0068] 또한, 근육 질환 개선 또는 운동수행능력 향상의 효과를 목적으로 하는 식품 조성물에 있어서, 상기 굼벵이 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 포함할 수 있으며, 음료 조성물은 100 ㎖를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 포함할 수 있다.

[0069] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 굼벵이 추출물을 포함하는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 개체의 근육 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0070] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 굼벵이 추출물을 포함하는 운동수행능력 향상용 조성물을 포함하는, 개체의 운동수행능력을 향상시키는 방법을 제공한다.

[0071] 본 발명에서 상기 "개체"는 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 증상이 호전될 수 있는 근육 질환을 가진 동물 또는 인간을 포함한다. 본 발명에 따른 치료용 조성물을 개체에게 투여함으로써, 근육 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.

[0072] 본 발명에서 상기 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 인간 또는 동물에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명에 따른 치료용 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 치료용 조성물은 유효성분이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0073] 상기한 바와 같이, 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 본원발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 구체적으로 본 발명의 굼벵이 추출물의 양을 기준으로 1일 0.0001 내지 1000mg/kg으로, 보다 효과적이기 위해서는 0.01 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량과 투여횟수는 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

발명의 효과

[0074] 본 발명에 따르면, 본 발명의 굼벵이 추출물은 운동 능력 향상을 위한 근육량 증가 및 근 기능 개선에 활용될 수 있다.

[0075] 또한, 상기 굼벵이 추출물은 천연물에서 유래한 성분을 포함하므로 인체에 독성이 낮은 물질로 유용하게 활용될 수 있다.

[0076] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0077] 도 1은 굼벵이 추출물에 의한 *myoD* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.

도 2는 굼벵이 추출물에 의한 *myogenin* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.

도 3은 굼벵이 추출물에 의한 *NRF-1* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.

도 4는 굼벵이 추출물에 의한 *Tfam* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.

도 5는 굼벵이 추출물에 의한 *CytC* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.

도 6은 굼벵이 추출물에 의한 *Cox2* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.

도 7은 굼벵이 추출물에 의한 *Cox4* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.

도 8은 굼벵이 추출물에 의한 *ATG5g1* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.

도 9는 굼벵이 추출물에 의한 *SDHb* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.

도 10은 굼벵이 추출물에 의한 *UCP1* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.

도 11은 굼벵이 추출물에 의한 *SIRT1* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.

도 12는 굼벵이 추출물에 의한 *PGC1-α* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.

도 13은 굼벵이 추출물에 의한 *ERR-α* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.

도 14는 굼벵이 추출물에 의한 *PPAR-α* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.

도 15는 굼벵이 추출물에 의한 *PPAR-β* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.

도 16은 굼벵이 추출물에 의한 *TSC1* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.

도 17은 굼벵이 추출물에 의한 *TSC2* 유전자 발현 변화 정도를 나타낸 것이다.

도 18은 굼벵이 추출물에 의한 근 기능 관련 단백질 변화 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 19는 굼벵이 추출물에 의한 근육 세포 내 ATP의 함량 변화 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 20은 굼벵이 추출물에 의한 근육 세포 성장 변화 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0078] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0079] **실시예 1. 굼벵이(흰점박이꽃무지 유충) 추출물의 제조**

[0080] 건조된 굼벵이(흰점박이꽃무지 유충)(구입처: 굼벅스, 한국) 0.5kg을 분쇄하여 추출 용기에 넣고, 굼벵이 중량 대비 15배의 정제수를 넣은 후 60℃에서 3시간 동안 교반하여 추출하였다. 추출액은 여과지로 여과한 후 여액이 완전히 증발할 때까지 50℃에서 감압 농축하여 최종적으로 굼벵이 추출물을 수득하였다. 이에 따른 수율은 약 20.59%로 나타났다.

[0081] **실험예 1. 굼벵이 추출물에 의한 근 기능 개선 관련 유전자 발현 변화 실험**

[0082] 실험예 1-1. 근 기능 개선 관련 유전자 발현 변화 실험 방법

[0083] C2C12는 불멸화된 마우스 근섬유 세포주(immortalized mouse myoblast cell line)로서, *in vitro* 상에서 근육 연구를 할 때 널리 사용되는 세포주(cell line)이다. 고 혈청 조건(High serum conditions)에서 세포분열 속도가 매우 빠르며, 저 혈청 조건(low serum condition) 또는 결핍(starvation) 조건에서 빠르게 분화하여 수축성 근관인 다핵성 근관(multi nucleated myotube)을 형성하고 특징적인 근육 단백질을 생산한다. 따라서 근섬유(myoblast)의 분화에 관련된 기계론적 생화학적 경로(mechanistic biochemical pathway)의 분석을 위한 다양한 단백질 또는 유전자 발현 연구에 사용된다.

[0084] 근 기능 개선 및 근육 활성의 변화를 확인하기 위하여 C2C12 세포를 5일 동안 분화시킨 후, 굼벵이 추출물 10 ug/ml 또는 100 ug/ml을 24시간동안 처리하였다. 그 후 세포를 트리졸(Trizol)을 사용하여 RNA를 추출하였다. 상기 RNA에 역전사 효소(Reverse tanscriptase, Nanohelix)를 이용하여 cDNA를 합성한 후, 하기 표 1의 프라이머를 사용하여 qRT-PCR (CFX Connect Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad)을 실시하였다.

표 1

[0085]

유전자	방향	서열(5’-3’)	서열번호
MyoD	Forward	CCGTGTTTCGACTCACCAGA	1
	Reverse	GTAGTAGGCGGTGTCGTAGC	2
Myogenin	Forward	GAGGAAGTCTGTGTCGGTGG	3
	Reverse	CCACGATGGACGTAAGGGAG	4
NRF-1	Forward	CTTCATGGAGGAGCACGGAG	5
	Reverse	ATGAGGCCGTTTCCGTTTCT	6
Tfam	Forward	GAGCGTGCTAAAAGCACTGG	7
	Reverse	CCACAGGGCTGCAATTTTCC	8
CytC	Forward	GGGCCTCGTTAGTGCAGCAGG	9
	Reverse	GGGCTCCCAGAAAAGGTTGCCT	10
COX2	Forward	ACGAAATCAACAACCCCGTA	11
	Reverse	GGCACAACGACTCGGTTATC	12
COX4	Forward	ACTACCCCTTGCCTGATGTG	13
	Reverse	GCCCACAACTGTCTTCCATT	14
ATP5g1	Forward	TGGGGACCAGGGCAGCCATT	15
	Reverse	AGGGCTTGCTGCCCACACAT	16
SIRT1	Forward	TGCCATCATGAAGCCAGAGA	17
	Reverse	AACATCGCAGTCTCCAAGGA	18
SDHb	Forward	ACTGGTGGAACGGAGACAAG	19
	Reverse	GTTAAGCCAATGCTCGCTTC	20
PGC-1 a	Forward	GTCCTTCCTCCATGCCTGAC	21
	Reverse	GACTGCGGTTGTGTATGGGA	22
UCP1	Forward	CGGAAACAAGATCTCAGCCG	23
	Reverse	CTGACCTTCACGACCTCTGT	24
ERR a	Forward	GAGGTGGACCCTTTGCCTTT	25
	Reverse	GGCTAACACCCTATGCTGGG	26
PPAR a	Forward	ATCCAGGGTTCAGTCCAGTG	27
	Reverse	GCTTAGGGACAGTGACAGGT	28
PPAR δ	Forward	GTTCCTCTGACCCTGTCCTC	29
	Reverse	CCAGCAAGTTTCAAGCCACT	30

TSC1	Forward	TTATCCATCCTCTCGCTGCT	31
	Reverse	AGGTGCTGCTTCCCTGACT	32
TSC2	Forward	ATGGATGTTGGCTTGTCCTC	33
	Reverse	CAGGCAGTTGTAGCAGACCA	34
GAPDH	Forward	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	35
	Reverse	GGATGCAGGGATGATGTTCT	36

[0086] 1-2. *myoD* 및 *myogenin*의 발현량 변화 측정상기 굼벵이 추출물의 처리 농도에 따른 *myoD* 발현량 변화는 도 1에, *myogenin*의 발현량 변화는 도 2에 나타내었다.

[0087] 그 결과, 굼벵이 추출물을 100 ug/ml 처리한 경우 *myoD*의 발현량은 8.85배(도 1) 증가하였으며, *myogenin*의 발현량은 각각 3.78배(도 2) 증가한 것을 확인하였다.

[0088] *myoD* 및 *myogenin*는 근육 분화 조절 인자(myogenic regulatory factor)에 속하는 전사 인자들로, *myoD*는 위성세포(satellite cell)로부터 근육 세포가 분화하기 위해 중요한 인자이며, 운동 또는 근육 조직 손상에 반응하여 발현량이 증대된다. *myogenin* 또한 근육 세포의 분화에 중요하며 특히 기능성 골격 근육의 발달에 필수적인 인자로서, 근육 분화(Myogenesis) 과정에서 근육 분화 전구세포(myogenic precursor cell)들의 적절한 분화에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0089] 결론적으로 이 두 가지 전사 인자들의 유전자 발현 증가는, 근육 세포의 분화를 유도하여 근 섬유의 형성과 골격근 질량의 증가를 유도하여 근 기능 개선에 매우 중요한 역할을 수행하게 될 뿐만 아니라, 근육 세포 손상이 일어날 경우 손상 치유를 유도할 수 있어 근육 세포 보호에 영향을 줄 수 있음을 의미한다.

[0090] 1-2. *NRF-1* 및 *Tfam*의 발현량 변화 측정

[0091] 상기 굼벵이 추출물의 처리 농도에 따른 *NRF-1* 발현량 변화는 도 3에, *Tfam*의 발현량 변화는 도 4에 나타내었다.

[0092] 그 결과, 굼벵이 추출물을 처리하지 않은 경우와 비교하여 굼벵이 추출물을 100 ug/ml 처리한 경우에 *NRF-1*의 발현량은 4.47배, *Tfam*의 발현량은 2.67배 증가한 것을 확인하였다.

[0093] *RF-1(Nuclear respiratory factor 1)*은 산화적 인산화(oxidative phosphorylation) 및 미토콘드리아 신생(mitochondrial biogenesis) 관련 유전자 발현을 조절하는 전사 인자이고, *Tfam(Mitochondrial transcription factor A)*은 미토콘드리아 유전자의 전사와 복제를 조절하는 전사 인자로서, 굼벵이 추출물의 투여에 의한 두 가지 유전자의 발현량 증가는 미토콘드리아 생합성 증대의 결과를 나타낸 것을 확인하였다.

[0094] 1-3. *CytC, Cox2* 및 *Cox4*의 발현량 변화 측정

[0095] 상기 굼벵이 추출물의 처리 농도에 따른 *CytC* 발현량 변화는 도 5에, *Cox2*의 발현량 변화는 도 6에, *Cox4*의 발현량 변화는 도 7에 나타내었다.

[0096] *CytC(Mitochondrial cytochrome C)*, *Cox2*(Cytochrome c oxidase subunit 2), *Cox4(Cytochrome c oxidase subunit 4)*는 ATP를 합성하는 미토콘드리아의 내막에 존재하는 전자 전달계의 주요 단백질이다. 굼벵이 추출물의 처리 결과 *CytC*(도 5, 0.855배) 및 *Cox2*(도 6, 0.996배)에서는 유전자 발현이 증가하지 않았으나, *Cox4*(도 7, 2.18배)의 유전자 발현은 증가하는 것을 확인하였다.

[0097] 1-4. *ATG5g1*의 발현량 변화 측정

[0098] 상기 굼벵이 추출물의 처리 농도에 따른 *ATG5g1*의 발현량 변화는 도 8에 나타내었다.

[0099] *ATG5g1*는 미토콘드리아 ATP 합성효소(Mitochondrial ATP Synthase)의 막 서브유닛 c(membrane subunit c)를 암호화하는 유전자로서, 막 서브유닛 c는 ATP의 합성에 관여하는 단백질이다.

[0100] 도 8에 나타난 바와 같이, 굼벵이 추출물 100 ug/ml을 처리하는 경우 *ATG5g1* 유전자의 발현량이 1.3배 증가한 것을 확인하였으며, 이를 통해 ATP 합성량이 증가함에 따라 에너지 전달체가 증가하여 세포 활성이 증가할 수 있음을 확인하였다.

[0101] 1-5. *SDHb* 및 *UCP1*의 발현량 변화 측정

[0102] 상기 굼벵이 추출물의 처리 농도에 따른 *SDHb* 발현량 변화는 도 9에, *UCP1*의 발현량 변화는 도 10에

나타내었다.

[0103] 그 결과, 굼벵이 추출물을 처리하지 않은 경우와 비교하여 굼벵이 추출물을 100 ug/ml 처리한 경우에 *SDHb*의 발현량은 1.61배 증가, *UCP1*의 발현량은 0.44배로 감소한 것을 확인하였다.

[0104] *SDHb*(Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial)는 복합체II의 철-황 서브유닛(iron sulfur subunit of complex II)로도 알려져 있으며, 미토콘드리아 내막에서 일어나는 TCA 사이클에서의 이화작용 중 숙신산의 산화 작용을 하며 FAD를 $FADH_2$로 환원시키는 효소를 암호화하는 유전자이다.

[0105] *UCP1*은 터모제닌(Thermogenin) 또는 짝풀림 단백질 1(uncoupling protein 1)을 암호화하는 유전자로서, UCP1 단백질은 미토콘드리아 내막에서 산화적 인산화를 통해 생성된 양성자 농도 차를 감소시키는 역할을 한다.

[0106] 즉, 굼벵이 추출물을 처리하는 경우 *SDHb*의 유전자 발현 증가와 *UCP1*의 유전자 발현 감소효과를 보이므로, 상기 결과로부터 굼벵이 추출물이 ATP 생산량 증대에 영향을 주는 것을 확인하였다.

[0107] 1-6. *SIRT1, PGC1-α* 및 *ERR-α*의 발현량 변화 측정

[0108] 상기 굼벵이 추출물의 처리 농도에 따른 *SIRT1*의 발현량 변화는 도 11에, *PGC1-α*의 발현량 변화는 도 12에, *ERR-α*의 발현량 변화는 도 13에 나타내었다.

[0109] SIRT1은 노화나 대사 등 세포 내에서 여러 가지 조절 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 다음과 같은 두 단백질의 대사 조절 전사 인자(metabolic regulatory transcription factor) PGC1-α/ERR-α 복합체를 탈아세틸화(deacetylation) 시켜 활성을 조절하기도 한다.

[0110] PGC1-α(Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha)는 에너지 대사에 관여하는 전사 공활성인자(transcription coactivator)로서 외부자극에 반응하여 미토콘드리아의 생합성에 직접 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 지구력 운동을 하면 이 단백질의 발현이 골격근에서 증가하게 된다.

[0111] ERRα(Estrogen-related receptor alpha)는 대사와 에스트로겐 신호전달에 관여하는 핵막 수용체로서, 대사적 관점에서 보면 미토콘드리아 생합성(mitochondrial biogenesis)이나 포도당신생합성(gluconeogenesis), 산화적 인산화, 지방산 대사(fatty acid metabolism)에 관련된 유전자의 발현을 증대시킨다.

[0112] 즉, 굼벵이 추출물을 100 ug/ml 처리한 경우 *SIRT1*(도 11, 2.65배), *PGC1-α*(도 12, 4.05배) 및 *ERR-α*(도 13, 1.5배) 모두에서 유전자의 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

[0113] 1-7. *PPAR-α* 및 *PPAR-β*의 발현량 변화 측정

[0114] 상기 굼벵이 추출물의 처리 농도에 따른 *PPAR-α* 발현량 변화는 도 14에, *PPAR-β*의 발현량 변화는 도 15에 나타내었다.

[0115] PPARs(Peroxisome proliferator-activated receptors)는 α, β, γ 세종류가 있으며 대사과정과 세포 증식, 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이중 α, β 두 가지는 대부분 조직에서 발현하며, 근육에서도 지방산의 대사과정을 조절한다. PPAR-α는 지방산의 수송과 활성화에 관여하는 유전자 발현을 증가시키며, PPAR-β는 에너지대사에 포도당 대신 지방산을 사용을 증가시킨다.

[0116] 굼벵이 추출물을 100 ug/ml 처리한 경우 PPAR-α(도 14, 2.09배)의 유전자 발현 및 PPAR-β/δ(도 15, 1.17배)의 유전자 발현을 모두 증가시켰으며 특히 PPAR-α의 발현량을 크게 증가시켰으므로, 본 발명의 굼벵이 추출물이 근육으로의 지방산 수송을 촉진함으로써 에너지 항상성에 기여하는 것을 확인하였다.

[0117] 즉, 상기 실험예 1-6 및 1-7의 결과를 종합하여 고려할 때, 본 발명의 굼벵이 추출물은 글루코스와 지방산의 흡수 및 산화를 증가시켜 에너지 항상성을 유지시켜 주는데 기여하고, 미토콘드리아 생합성을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

[0118] 1-8. *TSC1* 및 *TSC2*의 발현량 변화 측정

[0119] 상기 굼벵이 추출물의 처리 농도에 따른 *TSC1* 발현량 변화는 도 16에, *TSC2*의 발현량 변화는 도 17에 나타내었다.

[0120] TSC1(Tuberous sclerosis 1) 및 TSC2(Tuberous sclerosis 2)는 함께 TSC 복합체를 이루어 세포 크기를 조절한다. 또한, TSC 복합체는 GTP 가수분해효소-활성화 단백질(GTPase-activating protein, GAP)로 작용하여 mTOR 신호전달 경로를 음성적으로 조절한다.

[0121] 상기 mTOR(Mammalian target of rapamycin)는 외부 신호에 의해 활성화되어 신호 전달(signal transduction)에 의해, 세포 성장(cell growth), 세포 증식(cell proliferation), 세포 운동성(cell motility), 세포 생존(cell survival), 단백질 합성(protein synthesis), 자가 포식(autophagy) 등의 관련 유전자 발현을 조절하는 단백질로서, 근육 세포에서는 세포 증식에 관여하여 근육량을 증대시키는 기능이 있음이 알려져 있다.

[0122] 즉, 굼벵이 추출물을 100 ug/ml 처리한 경우의 TSC1/2의 발현 감소 정도가 각각 0.33배(도 16) 및 0.31배(도 17)이므로, 본 발명의 굼벵이 추출물을 투여하면 mTOR 신호를 활성화하여 세포 활성과 근육량을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

[0123] **실험예 2. 굼벵이 추출물에 의한 근 기능 개선 관련 단백질 발현 변화 실험**

[0124] 근 기능 개선 및 근육 활성을 확인하기 위하여 C2C12 세포를 5일 동안 분화시킨 후, 각 굼벵이 추출물을 10 ug/ml 또는 100 ug/ml 농도로 24시간 처리하였다. 그 후 세포를 변형된 RIPA 버퍼를 이용하여 파쇄한 다음 각 조건별로 20 ug의 단백질을 채취하여 분석에 사용하였다.

[0125] 1차 항체는 ERK(sc-135900: santa cruz) p-ERK(9101S, Cell Signaling), mTOR(sc-8319, santa cruz) p-mTOR(2971, Cell signaling), p70S6k(sc-230, santa cruz), p-p70S6k(sc-11759, santa cruz), p38(sc-535, santa cruz), p-p38(sc-17852-R, santa cruz), p-AMPK(4186, Cell signaling), GAPDH(sc-25778, santa cruz)를 사용하였으며, 2차 항체는 mouse anti-rabbit IgG-HRP(sc-2357, santa cruz) 및 m-IgGk BP-HRP(sc-516102, santa cruz)를 사용하여 분석하였고, 그 결과를 도 18에 나타내었다.

[0126] 도 18에 나타난 바와 같이, 굼벵이 추출물에 의해 C2C12 세포의 ERK1/2의 인산화가 촉진되었음을 확인하였다. ERKs(Extracellular signal-regulated kinases)는 사람에서 여러 조직의 세포 증식에 관여한다고 알려진 MAP(Mitogen-activated protein) 경로의 주요 키나아제 단백질로서, 이를 통해 본 발명의 굼벵이 추출물이 근육 세포의 성장을 증대시키는 것을 확인하였다.

[0127] mTOR(Mammalian target of rapamycin)는 특정 아미노산 또는 아미노산 유도체의 물리적 운동 및 섭취로 의해 반응하여 인간의 근섬유 및 근육 단백질 합성을 통한 골격 근육 비대에 필수적이다. 따라서 mTOR의 활성화 즉 인산화의 증가는 세포 활성 및 근육량 증대에 매우 중요한 요소에 해당하며, 본 발명의 굼벵이 추출물은 *TSC1/2*의 발현 감소와 함께 mTOR 신호 전달 경로를 활성화시켜 세포 활성과 근육량의 증가에 기여할 수 있음을 확인하였다.

[0128] S6K1(Ribosomal protein S6 kinase beta-1)는 p70S6 kinase(p70S6K, p70-S6K)로도 알려져 있으며, 상기 mTOR에 의해 조절되는 키나아제 중 하나이다. p70S6K는 세포 내 신호전달에 관여하여 mTOR 신호 전달 경로에 의해 인산화되면 단백질 합성을 활성화하는 역할을 수행한다. 본 발명의 굼벵이 추출물에 의한 mTOR의 인산화는 p70S6K의 인산화로 이어져 근육 증대에 영향을 준 것을 확인하였다(도 18).

[0129] p38은 ERK1/2와 함께 MAP 경로의 주요 키나아제 단백질 중 하나로, 마찬가지로 여러 가지 조직에서 세포 증식에 관여돼 있다고 알려져 있으며, 근육에서도 또한 p38의 인산화가 세포의 증식을 촉진한다고 알려져 있다. 따라서 p38의 인산화 증가(도 18)로부터 본 발명의 굼벵이 추출물이 근육 세포의 분화에 영향을 주어 근육량 증가에 기여할 수 있음을 확인하였다.

[0130] AMPK(5' AMP-activated protein kinase)는 세포 에너지 항상성에 역할을 하는 효소이며, 본 발명의 굼벵이 추출물에 의한 AMPK의 인산화 증가(도 18)로부터 본 발명의 굼벵이 추출물이 미토콘드리아 생합성 및 전자 전달계 효소 유전자 발현량 증대와 함께, 미토콘드리아 생합성(mitochondrial biogenesis)을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

[0131] **실험예 3. 굼벵이 추출물에 의한 C2C12 세포 내의 ATP양 변화**

[0132] 본 발명의 굼벵이 추출물에 의한 근육의 에너지 합성 증대 효과를 확인하기 위해 C2C12 세포 내 ATP양을 측정하였다.

[0133] 구체적으로, C2C12 세포를 5일 동안 분화시킨 후, 각 굼벵이 추출물을 10 ug/ml 또는 100 ug/ml 농도로 24시간 처리하였다. 분화된 세포는 상온에서 2X ATP 검출시약(detection reagent)을 넣어준 다음, Mitochondrial ToxGlo™ Assay kit(Promega)를 사용하여 형광(Luminescence)을 측정하였고, 그 결과를 도 19에 나타내었다.

[0134] 그 결과, 도 19에 나타난 바와 같이 굼벵이 추출물은 농도에 의존적으로 세포 내의 ATP양을 증가시킴을 확인하였으며, 100ug/ml의 농도에서 약 18%의 증가를 확인하였다.

[0135] 이는 상기 결과와 같이 미토콘드리아의 생합성 및 ATP 합성 관련 유전자들의 발현을 증가시켜 결론적으로 에너지 합성을 증가시킨 것으로서, 굼벵이 추출물이 근 기능 개선 및 근육 세포의 활성을 증가시킬 수 있음을 시사하는 것이다.

[0136] **실험예 4. 굼벵이 추출물에 의한 세포 성장 변화 확인**

[0137] 본 발명의 굼벵이 추출물에 의한 세포 증식능력 개선 효과를 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다.

[0138] 구체적으로, 10^3 cells의 세포를 96-웰 조직 배양 플레이트(SPL)의 각 웰에 넣은 후 DMSO에 용해된 굼벵이 추출물을 각각 10ug/ml 및 100ug/ml로 배양 플레이트에 추가하고 48시간 배양하였다. 대조군 DMSO는 최대 농도가 0.2%를 초과하지 않도록 각 플레이트에 투입하였다.

[0139] 48시간 배양 후 100㎕의 5mg/㎖ MTT(sigma Cat. M2128)를 투입한 후, 2시간 동안 37℃에서 반응시켰다. 배지를 제거 후 0.1ml의 DMSO를 투입하고 10분 동안 상온에서 반응시킨 후 마이크로 플레이트 리더(micro plate reader; BioTek Instruments, 한국)를 이용하여 540nm 흡광도에서 활성을 측정하였고, 그 결과를 도 20에 나타내었다.

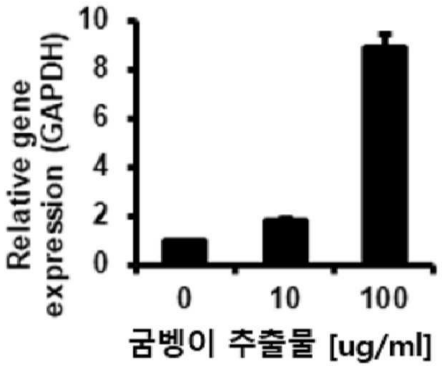
[0140] 그 결과, 도 20에 나타난 바와 같이 굼벵이 추출물을 처리한 세포군에서 대조군보다 세포의 생존률이 농도 의존적으로 증가함을 확인하였으며, 세포 독성 또한 없는 것으로 나타났다. 따라서 상기한 결과로부터 굼벵이 추출물은 인체에 해롭지 않으며, 근육 세포의 증식을 촉진시킬 수 있음을 확인하였다.

[0141] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

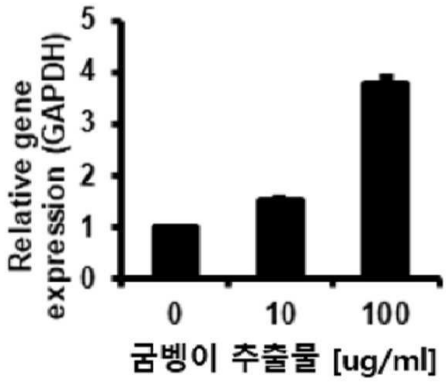
[0142] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

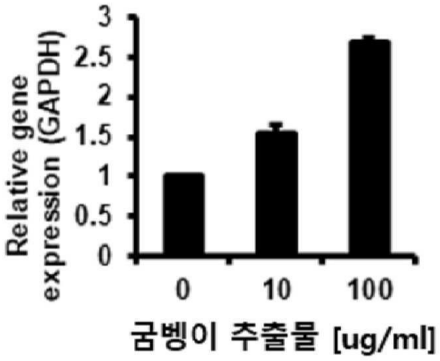
도면1



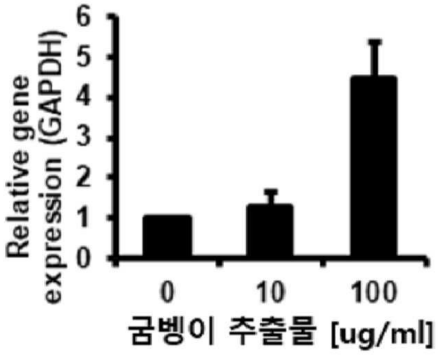
도면2


Relative gene expression (GAPDH)
5
4
3
2
1
0
0
10
100
굼벵이 추출물 [ug/ml]

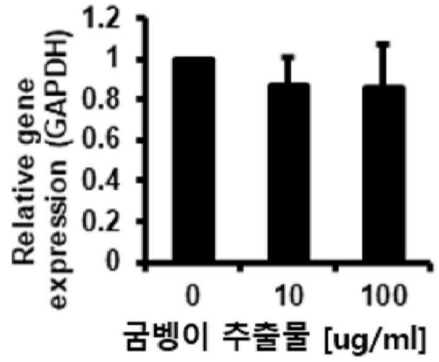
도면3


Relative gene expression (GAPDH)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
10
100
굼벵이 추출물 [ug/ml]

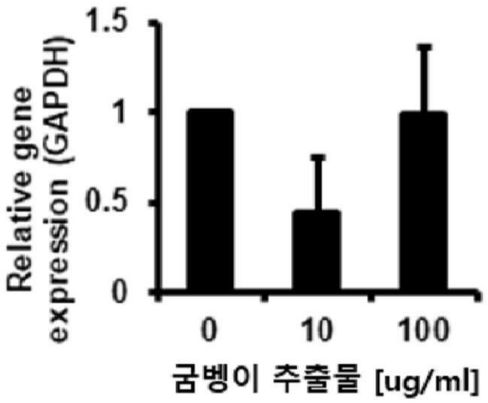
도면4


Relative gene expression (GAPDH)
6
5
4
3
2
1
0
0
10
100
굼벵이 추출물 [ug/ml]

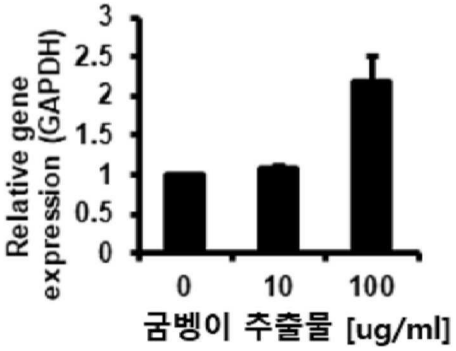
도면5


Relative gene expression (GAPDH)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
10
100
굼벵이 추출물 [ug/ml]

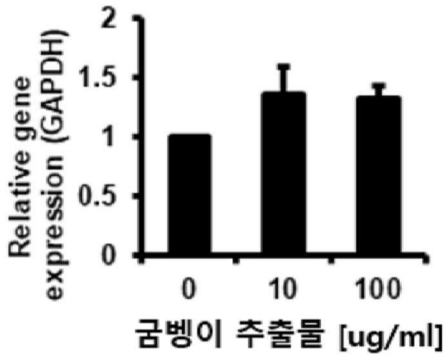
도면6


Relative gene expression (GAPDH)
1.5
1
0.5
0
0
10
100
굼벵이 추출물 [ug/ml]

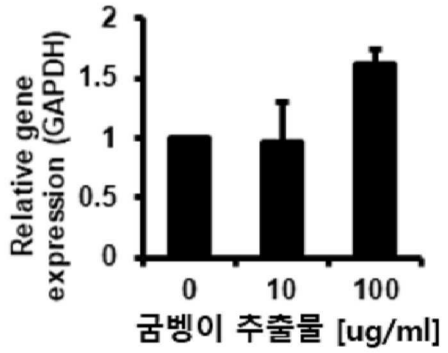
도면7


Relative gene expression (GAPDH)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
10
100
굼벵이 추출물 [ug/ml]

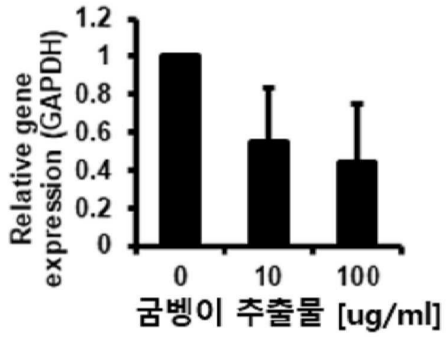
도면8



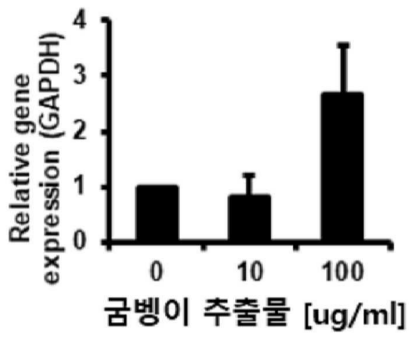
도면9



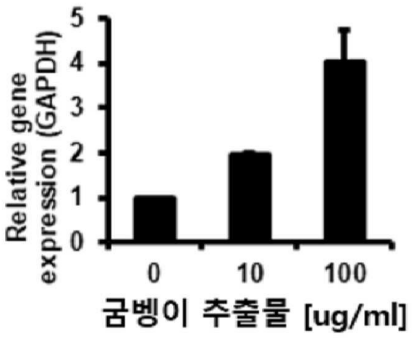
도면10



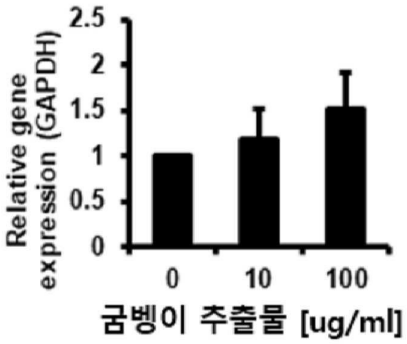
도면11



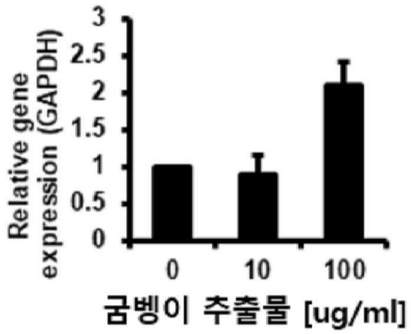
도면12



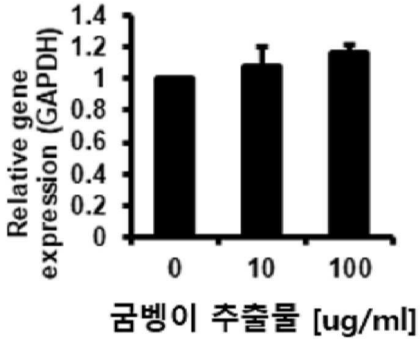
도면13



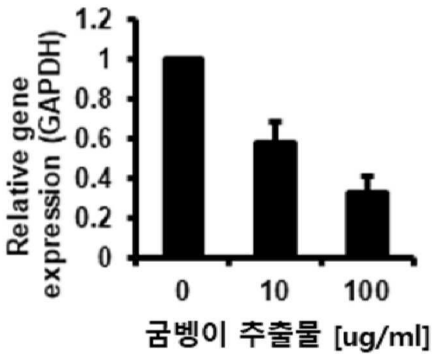
도면14



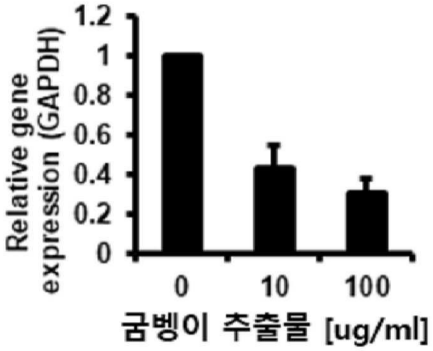
도면15



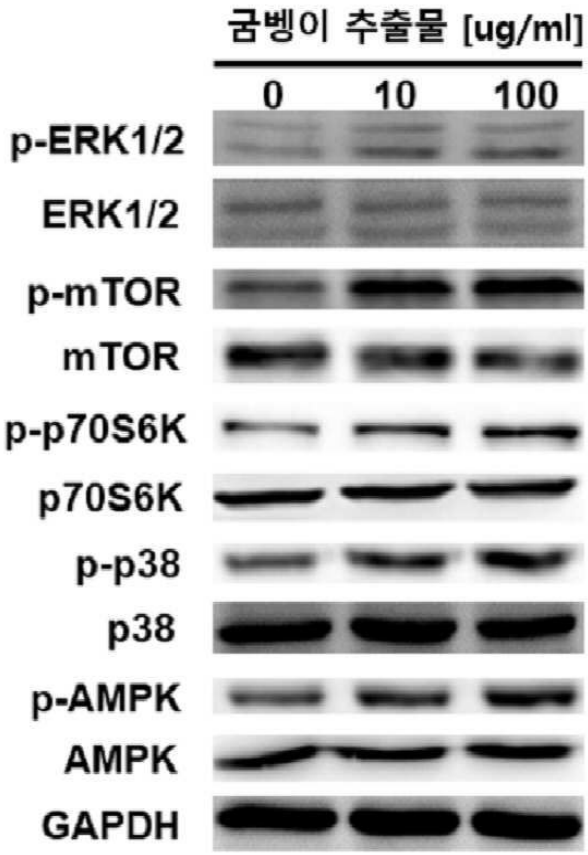
도면16


Relative gene expression (GAPDH)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
10
100
굼벵이 추출물 [ug/ml]

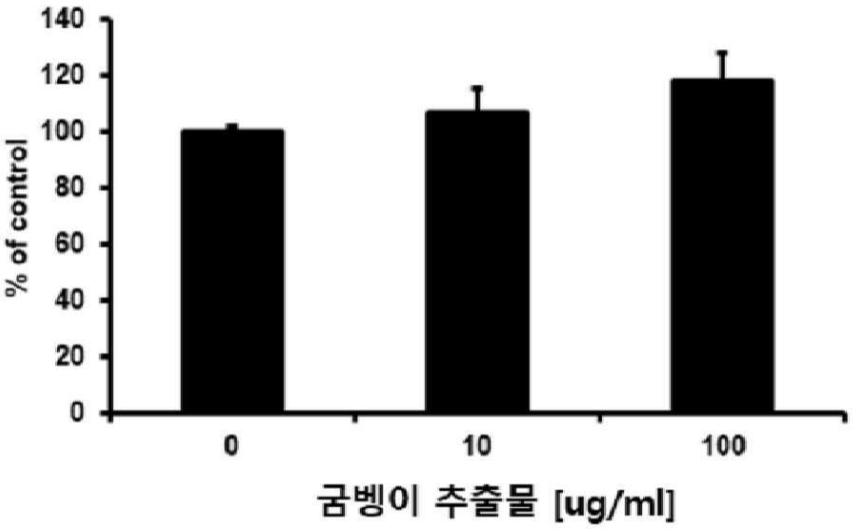
도면17


Relative gene expression (GAPDH)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
10
100
굼벵이 추출물 [ug/ml]

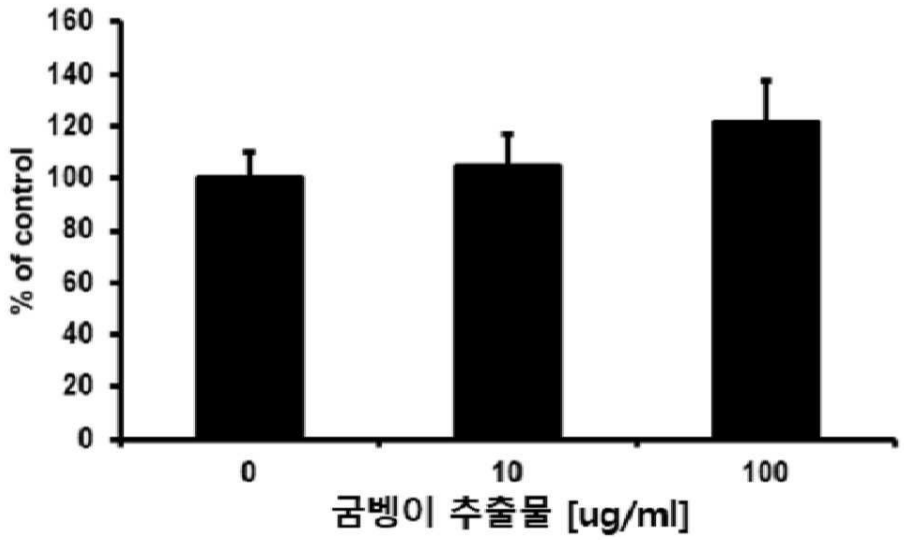
도면18


굼벵이 추출물 [ug/ml]
0
10
100
p-ERK1/2
ERK1/2
p-mTOR
mTOR
p-p70S6K
p70S6K
p-p38
p38
p-AMPK
AMPK
GAPDH

도면19


140
120
100
80
60
40
20
0
% of control
0
10
100
굼벵이 추출물 [ug/ml]

도면20



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> COMPOSITION FOR IMPROVING MUSCLE FUNCTION, COMPRISING GRUB EXTRACT

<130> 19PP31055

<160> 36

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MyoD_F

<400> 1

ccgtgtttcg actcaccaga 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MyoD_R

<400> 2

gtagtaggcg gtgtcgtagc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Myogenin_F

<400> 3

gaggaagtct gtgtcggtgg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Myogenin_R

<400> 4

ccacgatgga cgtaagggag 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRF-1_F

<400> 5

cttcatggag gagcacggag 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRF-1_R

<400> 6

atgaggccgt ttccgtttct 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tfam_F

<400> 7

gagcgtgcta aaagcactgg 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tfam_R

<400> 8

ccacagggct gcaattttcc 20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CytC_F

<400> 9

gggcctcgtt agtgcagcag g 21

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CytC_R

<400> 10

gggctcccag aaaaggttgc ct 22

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX2_F

<400> 11

acgaaatcaa caaccccgta 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX2_R

<400> 12

ggcacaacga ctcggttatc 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX4_F

<400> 13

actacccctt gcctgatgtg 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX4_R

<400> 14

gcccacaact gtcttccatt 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ATP5g1_F

<400> 15

tggggaccag ggcagccatt 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ATP5g1_R

<400> 16

agggcttgct gcccacacat 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SIRT1_F

<400> 17

tgccatcatg aagccagaga 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SIRT1_R

<400> 18

aacatcgcag tctccaagga 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SDHb_F

<400> 19

actggtggaa cggagacaag 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SDHb_R

<400> 20

gttaagccaa tgctcgcttc 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PGC-1a_F

<400> 21

gtccttcctc catgcctgac 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PGC-1a_R

<400> 22

gactgcggtt gtgtatggga 20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> UCP1_F

<400> 23

cggaaacaag atctcagccg 20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> UCP1_R

<400> 24

ctgaccttca cgacctctgt 20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ERRa_F

<400> 25

gaggtggacc ctttgccttt 20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ERRa_R

<400> 26

gaggtggacc ctttgccttt 20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PPARa_F

<400> 27

atccagggtt cagtccagtg 20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PPARa_R

<400> 28

gcttagggac agtgacaggt 20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PPAR_delta_F

<400> 29

gttcctctga ccctgtcctc 20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PPAR_delta_R

<400> 30

ccagcaagtt tcaagccact 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TSC1_F

<400> 31

ttatccatcc tctcgctgct 20

<210> 32

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TSC1_R

<400> 32

aggtgctgct tccctgact 19

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TSC2_F

<400> 33

atggatgttg gcttgtcctc 20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TSC2_R

<400> 34

caggcagttg tagcagacca 20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH_F

<400> 35

aactttggca ttgtggaagg 20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH_R

<400> 36

ggatgcaggg atgatgttct 20