(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0018339
(43) 공개일자 2019년02월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *A23L 33/13* (2016.01)
A23L 33/18 (2016.01) *A61K 48/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/1709 (2013.01)
A23L 33/13 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0103198
(22) 출원일자 2017년08월14일
심사청구일자 2017년08월14일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김용안
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 405동 803호(전민동, 엑스포 4단지 아파트)
정혜광
대전광역시 유성구 반석서로 98, 609동 1102호 (반석동, 반석마을6단지아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 공간

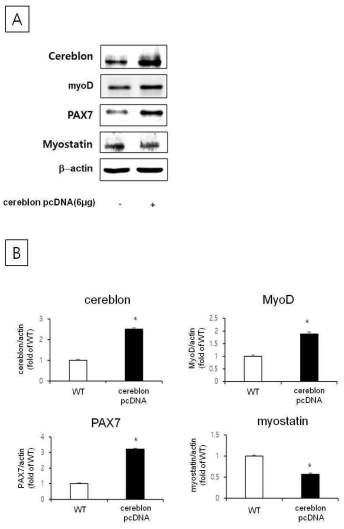
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **세레브론 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 근육 손상으로 유도된 근육 질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 세레브론 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 근육 손상으로 유도된 근육 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 세레브론 단백질은 근육 재생 과정에서 근육 분화 인자인 MyoD, PAX7의 발현을 증가시키고 근육 성장 억제 인자인 미오스타틴의 발현은 억제시키며, 손상된 근원 세포 또는 근육 조직의 분화 및 재생을 유도하므로, 근육 손상으로 유도된 근육 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A23L 33/18 (2016.08)
A61K 48/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/316 (2013.01)
(72) 발명자
이왕록
대전광역시 유성구 어은로 57, 107동 1701호(어은동, 한빛아파트)
오석훈
대전광역시 서구 둔산로 201, 105동 607호(둔산동, 국화아파트)
진순우
대전광역시 유성구 문화원로 119, 1동 707호(봉명동, 봉명시티빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016R1D1A1A02937298
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공학 개인기초연구지원사업
연구과제명 근육 감소증에서 cereblon의 세포 기능 조사
기 여 율 1/1
주관기관 충남대학교
연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

세레브론(cereblon) 단백질을 유효성분으로 포함하는 근육 손상으로 유도된 근육 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

세레브론(cereblon) 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터 또는 세포를 유효성분으로 포함하는 근육 손상으로 유도된 근육 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 근육 질환은 근위축증(muscular atrophy), 근질환(myopathy), 근육 손상(muscular injury), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육감소증(sarcopenia), 다발성 근육염(polymyositis), 당뇨병성 근위축증(diabetic amyotrophy) 및 암성악액질(cancer cachaxia)에 의한 근위축증으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 근육 손상으로 유도된 근육 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

세레브론(cereblon) 단백질을 유효성분으로 포함하는 근육 손상으로 유도된 근육 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 근육 질환은 근위축증(muscular atrophy), 근질환(myopathy), 근육 손상(muscular injury), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육감소증(sarcopenia), 다발성 근육염(polymyositis), 당뇨병성 근위축증(diabetic amyotrophy) 및 암성악액질(cancer cachaxia)에 의한 근위축증으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 근육 손상으로 유도된 근육 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세레브론 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 근육 손상으로 유도된 근육 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 근육(muscle)은 인체에서 가장 구성양이 많은 조직으로서 인체의 기능적 능력을 유지하고 대사성 질환을 예방하기 위해서는 적정 근육양의 확보가 필수적으로 요구된다.

[0003] 근육은 크게 평활근(smooth muscle), 심장근(cardiac muscle), 골격근(skeletal muscle)으로 나뉜다. 골격근은 우리 몸 전체에서 상당한 부분을 차지하면서, 골격의 움직임을 촉진시킨다. 이러한 골격근은 분열하지 않고, 다핵체인 근섬유로 이루어져 있으며, 배 형성 과정에서 만들어 진다. 배 형성 과정이 끝난 후에는, 출생 후 생장 또는 근육 분화(myogenesis) 과정에 의해 근육이 형성된다. 특히 동상이나 염좌, 타박상 등에 의해 근육이 손상되면, 근육 분화가 일어난다.

[0004] 근육 분화(myogenesis) 과정은, 먼저 위성세포(satellite cell)가 활성화되고, 활성화 된 위성세포가 근원세포(myoblast)로 분화된다(Morgan J. E., et al., 2003). 분화된 근원세포는 분열이 일어나고, 근원세포들의 융합(fusion)이 일어나 근관(myotube)으로 발달하게 된다. 이와 같은 과정을 통해 형성된 근섬유는 다발을 이루어

최종적으로 근육을 형성하게 된다.

[0005] 이러한 근육 분화 과정은 MyoD, Myf5(myogenic factor 5), 미오게닌(myogenin), MRF4(myogenic regulator factor 4)와 같은 다양한 근육 조절 인자(muscle regulatory factors)에 의해 조절되며, 그 중 MyoD는 미오신 H 사슬(myosin heavy chain, MHC), 근크레아틴인산화효소(muscle creatine kinase, MCK)와 같은 근육 특이 유전자의 발현을 개시하게 하고 위성세포가 근원세포로 분화하는 것을 유도하며, MyoD의 활성에 의한 미오게닌(myogenin) 발현의 유도는 근원세포의 융합에 가장 중요한 요소로, 근관의 형성에 관여한다(Zanou N., et al., 2013).

[0006] 위성세포에서 근원세포로의 분화, 근원세포의 분열 등과 같은 근육 분화 과정 동안에 문제가 생기면 근육위축증(muscle atrophy), 근질환(myopathy), 근육 손상(muscle injury), 근이영양증(muscle dystrophy), 근육감소증(sarcopenia)과 같은 여러 가지 근육 장애 및 질환이 발생한다.

[0007] 근육 장애 및 질환을 극복하기 위한 방법으로, 근육세포를 재생하는 방법이 최근에 보고되고 있으며, 이러한 근육세포의 재생은 근육세포 바깥부분에 존재하는 위성세포를 자극하여 위성세포가 분열을 일으켜 근육 조직을 형성하는 것으로 알려져 있다. 근육세포의 재생은 손상된 근육의 수리뿐만 아니라 노화에 의한 자연적인 근육 손실에도 적용이 가능한 것으로 보고되었다(Conboy I. M., et al., 2003).

[0008] 인간 세레브론(cereblon, CRBN) 유전자는 염색체 3에 위치하며 11개의 엑손으로 구성된 30,111 뉴클레오타이드 서열로 이루어져 있고, 상기 서열로부터 442개의 아미노산 서열로 이루어진 E3 리가제(ligase) 단백질을 생산한다. 세레브론은 큰 전도성을 가진 칼슘-활성화된 포타슘 채널(large-conductance calcium-activated potassium channels)과 직접적으로 상호작용하여 이들의 표면 발현을 조절한다. 이후에, 세레브론은 탈리도마이드(thalidomide)-유도된 최기성(teratogenicity)의 주요 타겟 및 E3 리가제 복합체의 기질 수용체로서 동정되었다(한국공개특허 제10-2014-0100731호).

[0009] 인간에게서, 세레브론 유전자는 상염색체 열성 비-증후군성 정신 지체(ARNSMR)의 후보 유전자로 확인되었다(Higgins, J. J. et al., 2004). 처음에는 쥐의 뇌에서 칼슘 활성화된 칼륨 채널 단백질(SLO1)과 상호 작용하는 RGS 함유 신규 단백질로 특징 지어졌으며, 나중에는 AMPK7과 DDB1를 갖는 망막에서 전압 개폐 염화물 채널(CIC-2)과 상호 작용하는 것으로 나타났다(Jo, S. et al., 2005; Hohberger B. et al., 2009; Angers, S. et al., 2006). 세레브론은 또한 대뇌 피질의 질병에 대한 치료제 개발을 위한 표적으로 확인되었다(국제공개특허 제2010-137547호).

[0010] 한편, 세레브론 단백질을 포함하는 근육 질환의 예방 또는 치료용 조성물과 관련된 선행문헌으로서, 한국공개특허 제10-2014-0100731호에는 CRBN KO 마우스의 제조방법 및 이의 용도가 개시되었고, 한국공개특허 제10-2014-0024914호에는 예측인자로 세레브론을 사용하는 암 및 염증성 질환의 치료를 위한 방법이 개시되였으며, 국제공개특허 제2015-127351호에는 신경 세포 확장을 위한 cereblon의 활성화제 사용 및 중추신경계 장애의 치료에 대해 개시된 바 있다. 그러나, 본 발명과 같이 세레브론 단백질이 근원 세포의 분화 및 재생을 유도하고 근육 손상으로 유도된 근육 질환의 예방 또는 치료 효과가 있음을 확인한 이전 보고는 아직 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2014-0100731호, CRBN KO 마우스의 제조방법 및 이의 용도, 2014년 08월 18일, 공개.

(특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-2014-0024914호, 예측인자로 세레브론을 사용하는 암 및 염증성 질환의 치료를 위한 방법, 2014년 03월 03일, 공개.

(특허문헌 0003) 국제공개특허 제2015-127351호, METHODS OF USING AN ACTIVATOR OF CEREBLON FOR NEURAL CELL EXPANSION AND THE TREATMENT OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM DISORDERS, 2015년 08월 27일, 공개.

(특허문헌 0004) 국제공개특허 제2010-137547호, PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING NUCLEAR FACTOR INVOLVED IN PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF CENTRAL NEURONAL CELLS, 2010년 12월 2일, 공개.

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) Angers, S. et al., Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery, Nature, 443(7111), 590-593, 2006.

(비특허문헌 0002) Conboy I. M. et al., Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle, Science, 302(5650), 1575-1577, 2003.

(비특허문헌 0003) Higgins, J. J. et al., A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild mental retardation, Neurology, 63(10), 1927-1931, 2004.

(비특허문헌 0004) Hohberger B. et al., Cereblon is expressed in the retina and binds to voltage-gated chloride channels, FEBS Lett., 583(4), 633-637, 2009.

(비특허문헌 0005) Jo, S. et al., Identification and functional characterization of cereblon as a binding protein for large-conductance calcium-activated potassium channel in rat brain, J. Neurochem., 94(5), 1212-1224, 2005.

(비특허문헌 0006) Morgan J. E. et al., Muscle satellite cells. Int. J. Biochem. Cell Biol., 35(8), 1151-1156, 2003.

(비특허문헌 0007) Zanou N., et al., Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors(MRFs) and insulin-like growth factors(IGFs) pathways, Cell. Mol. Life Sci., 70(21), 4117-4130, 2013.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 세레브론 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 근육 손상으로 유도된 근육 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 세레브론(cereblon) 단백질을 유효성분으로 포함하는 근육 손상으로 유도된 근육 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 또는, 세레브론 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터 또는 세포를 유효성분으로 포함하는 근육 손상으로 유도된 근육 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0015] 상기 "단백질"은 펩타이드 결합(들)에 의해 함께 연결된 아미노산의 중합체를 포함하는 분자를 의미한다. 단백질은 2이상의 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드 일 수 있다.

[0016] 상기 "폴리뉴클레오티드"는 디옥시리보핵산(deoxyribonucleic acid, DNA), 리보핵산(ribonucleic acid, RNA) 또는 이들의 혼합물일 수 있다.

[0017] 상기 "벡터(vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 상기 벡터는 목적 유전자 발현을 위한 요소(elements)를 포함하는 것으로, 복제원점(replication origin), 프로모터, 작동 유전자(operator), 전사 종결 서열(terminator) 등을 포함할 수 있고, 숙주 세포의 게놈 내로의 도입을 위한 적절한 효소 부위(예컨대, 제한 효소 부위) 및/또는 숙주 세포 내로의 성공적인 도입을 확인하기 위한 선별 마커 및/또는 단백질로의 번역을 위한 리보좀 결합 부위(ribosome binding site, RBS), IRES(Internal Ribosome Entry Site) 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0018] 상기 "재조합 벡터"는 통상적인 유전공학적 방법으로, 목적 유전자를 숙주의 유전발현체계에서 발현시키도록 프로모터, SD 서열(Shine-Dalgarno sequence), 클로닝 부위 등을 적절하게 배열한 벡터를 의미한다.

[0019] 상기 재조합 벡터는 바이러스성 또는 비바이러스성 벡터일 수 있으며, 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 재조합 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예: pL프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, T7 프로모터, tac 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 리보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다.

[0020] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSC101, ColE1, pBR322,

pUC8/9, pHC79, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지(예: gt4xue, -Charon, z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나, 특별히 이에 한정되지 않는다.

[0021] 상기 "세포"는 벡터의 복제 또는 발현을 지지할 수 있는 것으로, 원핵생물 세포(대장균 등) 또는 진핵생물 세포(효모, 곤충 등) 또는 포유동물 세포일 수 있다.

[0022] 상기 "근육 질환"은 근육 손상으로 유도된 근육 질환을 의미하며, 근위축증(muscular atrophy), 근질환(myopathy), 근육 손상(muscular injury), 근이영양증(muscular dystrophy), 근육감소증(sarcopenia), 다발성 근육염(polymyositis), 당뇨병성 근위축증(diabetic amyotrophy) 및 암성악액질(cancer cachaxia)에 의한 근위축증으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

[0023] 본 발명에 따른 약학 조성물은 일반적으로 사용되는 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. "약학적으로 허용 가능"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다.

[0024] 또한, 상기 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로즈, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아라비아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 파라옥시벤조산메틸, 파라옥시벤조산프로필, 탈크, 스테아르산마그네슘 및 광물유를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 안정화제, 결합제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 단백질에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0025] 본 발명에 개시된 세레브론 단백질을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여시간, 투여경로, 약물의 흡수, 분포 및 배설률, 사용되는 다른 약물의 종류 및 처방자의 판단 등에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01㎎/㎏/일 내지 대략 2000㎎/㎏/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 1㎎/㎏/일 내지 500㎎/㎏/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0026] 또 다른 일면에 있어서, 본 발명은 세레브론(cereblon) 단백질 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 근육 손상으로 유도된 근육 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다. 상기 건강기능식품은 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 또는 가공한 식품을 지칭하는 것으로, 예를 들어 건강보조식품, 기능성 식품, 영양제, 보조제 등을 모두 포함한다.

[0027] 상기 세레브론 단백질은 전체 식품 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.001중량% 내지 50중량%, 더 바람직하게는 0.001중량% 내지 30중량%, 가장 바람직하게는 0.001중량% 내지 10중량%로 하여 첨가될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 세레브론 단백질을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제 등이 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명은 세레브론 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 근육 손상으로 유도된 근육 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 세레브론 단백질은 근육 재생 과정에서 근육 분화 인자인 MyoD, PAX7의 발현을 증가시키고 근육 성장 억제 인자인 미오스타틴의 발현은 억제시키며, 손상된 근원 세포 또

는 근육 조직의 분화 및 재생을 유도하므로, 근육 손상으로 유도된 근육 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 근육 분화가 유도된 근원세포에서의 세레브론 및 미오게닌의 발현량을 측정한 결과이다.

도 2A는 근육 분화가 유도된 근원세포에서, 세레브론의 넉다운시 근육 분화 인자인 MyoD, PAX7, MHC와 근육 성장 억제 인자인 미오스타틴에 대한 발현량을 측정한 웨스턴 블롯 결과이며, 도 2B는 이를 정량화한 그래프이다.

도 3A는 근육 분화가 유도된 근원세포에서, 세레브론의 과발현시 근육 분화 인자인 MyoD, PAX7과 근육 성장 억제 인자인 미오스타틴에 대한 발현량을 측정한 웨스턴 블롯 결과이며, 도 3B는 이를 정량화한 그래프이다.

도 4는 세레브론이 과발현된 근원세포에 스크래치를 낸 다음, 근육 세포의 재생 효과를 확인한 결과이다.

도 5A는 세레브론이 넉아웃된 마우스에서의 세레브론, 근육 분화 인자인 MyoD, PAX7 및 근육 성장 억제 인자인 미오스타틴에 대한 발현량을 측정한 웨스턴 블롯 결과이며, 도 5B는 이를 정량화한 그래프이다.

도 6A는 세레브론이 넉아웃된 마우스 전경골근에 근손상 유도 물질인 CTX의 처리한 다음, 2일, 5일 및 8일 후의 근육량을 확인한 결과이며, 도 6B는 8일 후의 근육량을 정량화한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0031] **<실시예 1. 근원세포 배양 및 분화유도>**

[0032] 본 발명의 세레브론 단백질의 활성을 확인하기 위해 마우스 근원세포인 C2C12(myoblast, ATCC: CRL-1772) 세포를 이용하였다.

[0033] C2C12 세포에 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% 페니실린(penicillin)/스트렙토마이신(streptomycin)을 포함한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지를 넣고 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

[0034] **<실시예 2. 근육 세포의 분화 과정에서 세레브론 단백질의 발현량 변화 확인>**

[0035] 근육 분화 과정에서의 세레브론의 영향을 확인하기 위해, 근육 세포의 분화를 유도하고, 세레브론과 분화과정에서 확인되는 근육 분화 인자의 발현량 변화를 확인하였다.

[0036] 먼저, 근관세포(myotube)로의 분화를 유도하기 위하여, 상기 실시예 1에서 배양한 C2C12 세포를 60㎜ 플레이트에 분주하고, 세포가 80% 이상으로 찰 때까지 배양하였다. 배양액을 제거하고 2% 말 혈청(horse serum)과 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 DMEM 배지로 교체한 후, 4일 동안 배양하였다. 이후, 각 세포로부터 단백질을 회수하여 웨스턴 블롯방법으로 세레브론과 근육 분화 인자인 미오게닌에 해당하는 각각의 항체를 이용하여 단백질 발현을 확인하였고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0037] 도 1을 참고하면, 근육 분화가 유도된 경우 세레브론의 발현량과 근육 분화 인자인 미오게닌의 발현량이 증가하여, 근육 분화에 세레브론 단백질이 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

[0038] **<실시예 3. 세레브론 단백질이 결핍된 근육 세포의 분화 과정에서 근육 분화 관련 인자의 발현량 변화 확인>**

[0039] 세레브론이 결핍된 근육 세포 분화 과정에서 근육 분화 인자의 영향을 확인하기 위해, 세레브론 siRNA가 형질주입(transfection)된 근육 세포를 제조하고 이를 분화 유도하여, 세레브론과 분화과정에서 확인되는 근육 분화 인자의 발현량 변화를 확인하였다.

[0040] 먼저, 상기 실시예 1에서 배양한 C2C12 세포가 80% 정도 찼을 때, 배양액을 제거하고 페니실린/스트렙토마이신이 없는 DMEM 배지로 교체하여 3시간 동안 배양하였다.

[0041] 다음으로, 하나의 튜브에 Opti-MEM(gibco, Inc) 배지와 세레브론 siRNA(santa cruz biotechnology, Inc)를 섞고, 또 다른 튜브에 Opti-MEM(gibco, Inc) 배지와 리포펙타민 RNAi MAX(Invitrogen, Inc)를 섞고 10분 동안 반응하였다. 10분 후, 2개의 튜브를 하나로 합치고 20분 동안 안정화시킨 다음, 이를 상기 3시간 동안 배양한

C2C12 세포에 넣어 6시간 동안 배양하였다. 6시간 후 배양액을 제거하고 2% 말 혈청(horse serum)과 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 DMEM 배지로 교체한 후, 24시간째의 세포로부터 단백질을 회수하여 웨스턴 블롯방법으로 세레브론 및 근육 분화 인자(MyoD, PAX7, 미오스타틴 및 MHC)에 해당하는 각각의 항체를 이용하여 단백질 발현을 확인하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0042] 도 2의 결과를 참고하면, 세레브론의 발현을 억제한 경우, 근육 분화 인자인 MyoD, PAX7, MHC의 발현은 감소하였으나 근육 성장 억제 인자인 미오스타틴의 경우 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0043] **<실시예 4. 세레브론 단백질이 과발현된 근육 세포의 분화 과정에서 근육 분화 관련 인자의 발현량 변화 확인>**

[0044] 근육 세포 분화 과정에서 세레브론의 영향을 확인하기 위해, 세레브론이 과발현된 근육 세포를 제조하고 이를 분화 유도하여, 세레브론과 분화과정에서 확인되는 근육 분화 인자의 발현량 변화를 확인하였다.

[0045] 먼저, 상기 실시예 1에서 배양한 C2C12 세포가 80% 정도 찼을 때, 배양액을 제거하고 페니실린/스트렙토마이신이 없는 DMEM 배지로 교체하여 2시간 동안 배양하였다.

[0046] 다음으로, 하나의 튜브에 Opti-MEM(gibco, Inc) 배지와 세레브론 유전자가 삽입된 재조합 플라스미드 DNA(세레브론 pcDNA)를 섞고, 또 다른 튜브에 Opti-MEM(gibco, Inc) 배지와 리포펙타민 3000(Invitrogen, Inc)를 섞고 5분 동안 반응하였다. 10분 후, 2개의 튜브를 하나로 합치고 15분 동안 안정화시킨 다음, 이를 상기 3시간 동안 배양한 C2C12 세포에 넣어 6시간 동안 배양하였다. 6시간 후 배양액을 제거하고 2% 말 혈청(horse serum)과 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 DMEM 배지로 교체한 후, 24시간째의 세포로부터 단백질을 회수하여 웨스턴 블롯방법으로 세레브론 및 근육 분화 인자(MyoD, PAX7, 미오스타틴 및 MHC)에 해당하는 각각의 항체를 이용하여 단백질 발현을 확인하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0047] 도 3을 참고하면, 세레브론을 과발현한 경우, 근육 분화 인자인 MyoD, PAX7의 발현은 증가하였으나 근육 성장 억제 인자인 미오스타틴의 경우 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0048] 따라서, 도 2 및 3의 결과로부터, 세레브론은 근원세포에서 근관으로의 분화를 촉진하여, 근육을 형성하는데 영향을 미치는 것임을 알 수 있었다.

[0049] **<실시예 5. 세레브론 단백질이 과발현된 근육 세포에서 근육 세포 재생 효과 확인>**

[0050] 상기 실시예 4와 동일한 과정으로 세레브론 단백질이 과발현된 근육 세포를 배양하고, 플레이트에 스크래퍼를 이용하여 1㎝ 폭으로 스크래치를 낸 다음 근육 세포의 재생 정도를 확인하여 도 4에 나타내었다.

[0051] 도 4를 확인하면, 세레브론이 과발현된 근육 세포의 경우, 정상 근육 세포에 비해, 손상된 근육 세포를 재생하는 효과가 현저하게 우수한 것임을 확인할 수 있었다.

[0052] **<실시예 6. 세레브론 결핍 마우스 근육에서 근육 분화 관련 인자의 발현량 변화 확인>**

[0053] 세레브론이 넉아웃(knock out)된 마우스 모델의 근육 조직으로부터 단백질을 분리하여 세레브론과 근육 분화 인자의 발현량 변화를 웨스턴 블롯 방법으로 확인하였다.

[0054] 도 5의 결과를 참고하면, 세레브론이 넉아웃된 마우스(KO)의 경우, 정상 마우스(WT)에 비해, 근육 분화를 촉진하는 인자인 MyoD 및 PAX7의 발현이 감소하여 근육 분화에 세레브론 단백질이 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

[0055] **<실시예 7. 근육 손상이 유도된 세레브론 결핍 마우스 근육에서 근육량 변화 확인>**

[0056] 세레브론이 넉아웃(KO)된 마우스의 오른쪽 전경골근에는 50㎕의 CTX(cardiotoxin, 20μM)를 처리하여 근육 손상을 유도하고, 왼쪽 전경골근에는 식염수를 처리한 다음, 2, 5 및 8일 후 근육 손상의 회복 정도를 근육량 측정으로 확인하였다. 이때, 대조군으로는 정상 마우스(WT)를 이용하였으며, 그 결과를 도 6A(2, 5 및 8일 후의 근육량 측정) 및 6B(8일 후의 근육량 측정)에 나타내었다.

[0057] 도 6의 결과를 참고하면, 세레브론이 넉아웃된 마우스(KO)는 근육 손상을 유도하지 않아도, 정상 마우스(WT)에서 근육 손상을 유도한 경우(CTX 처리)와 동등한 정도로 감소된 근육량을 나타내었다. 또한, 세레브론이 넉아웃된 마우스에 CTX를 처리하여 근육 손상을 유도한 경우, 정상 마우스의 근육 손상 유도군에 비해 근육량이 2배 더 감소하여, 세레브론이 근육 분화를 촉진하여 근육을 생성하는 데 영향을 미치는 것임을 확인하였다.

[0058] 또한, 상기 도 6에는 나타내지 않았으나, 세레브론이 넉아웃된 마우스에 CTX로 근육 손상을 유도한 다음, 세레브론을 투여하는 경우, 정상 마우스의 PBS 처리군과 동등한 정도의 근육량을 나타내어, 손상된 근육에서 근육

분화를 촉진하고 근육을 생성하는 것임을 확인할 수 있었다. 이에, 세레브론은 근육 손상이 유도된 근육 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0059] **<제제예 1. 산제의 제조>**

[0060] 본 발명의 세레브론 단백질 2g, 유당 1g을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0061] **<제제예 2. 정제의 제조>**

[0062] 본 발명의 세레브론 단백질 100㎎, 옥수수전분 100㎎, 유당 100㎎ 및 스테아린산 마그네슘 2㎎을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0063] **<제제예 3. 캡슐제의 제조>**

[0064] 본 발명의 세레브론 단백질 100㎎, 옥수수전분 100㎎, 유당 100㎎ 및 스테아린산 마그네슘 2㎎을 혼합한 후 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0065] **<제제예 4. 환제의 제조>**

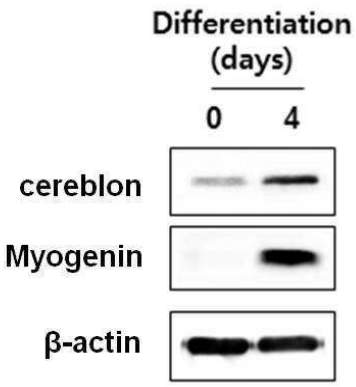
[0066] 본 발명의 세레브론 단백질 90㎎, 찹쌀전분 5㎎ 및 정제수 5㎎ 및 흡습성을 저해하는 첨가제로서 덱스트린, 말토덱스트린, 옥수수전분, 미결정셀룰로오스(MCC)를 소량 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 100㎎의 환제를 만들었다.

[0067] **<제제예 5. 건강기능식품의 제조>**

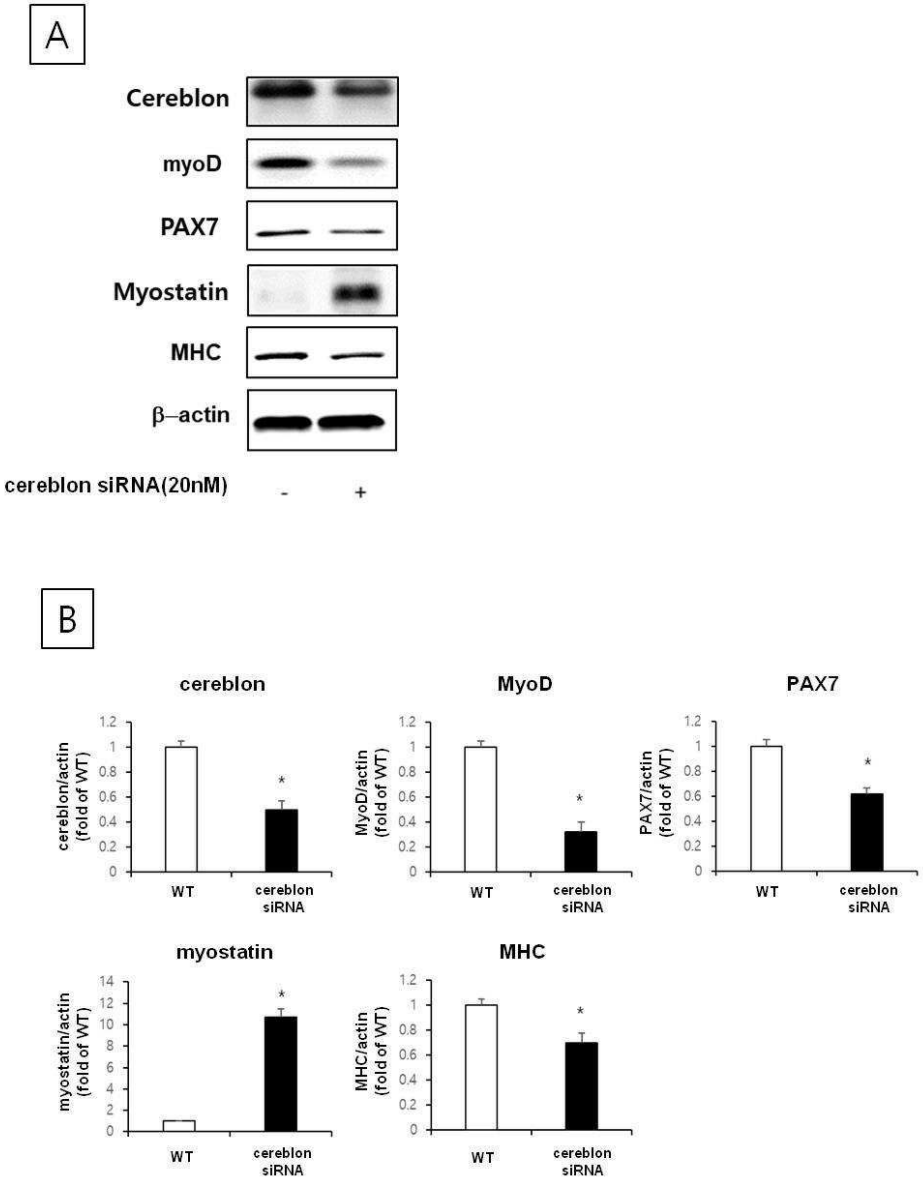
[0068] 본 발명의 세레브론 단백질 20g, 비타민 혼합물 적량, 비타민 A 아세테이트 70㎍, 비타민 E 1.0㎎, 비타민 B1 0.13㎎, 비타민 B2 0.15㎎, 비타민 B6 0.5㎎, 비타민 B12 0.2㎍, 비타민 C 10㎎, 비오틴 10㎍, 니코틴산아미드 1.7㎎, 엽산 50㎍, 판토텐산 칼슘 0.5㎎, 무기질 혼합물 적량, 황산제1철 1.75㎎, 산화아연 0.82㎎, 탄산 마그네슘 25.3㎎, 제1인산칼륨 15㎎, 제2인산칼슘 55㎎, 구연산칼륨 90㎎, 탄산칼슘 100㎎, 염화마그네슘 24.8㎎을 섞어 과립으로 제조하였으나, 용도에 따라 다양한 제형으로 변형시켜 제조할 수 있다. 또한, 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하여 제조할 수 있다.

도면

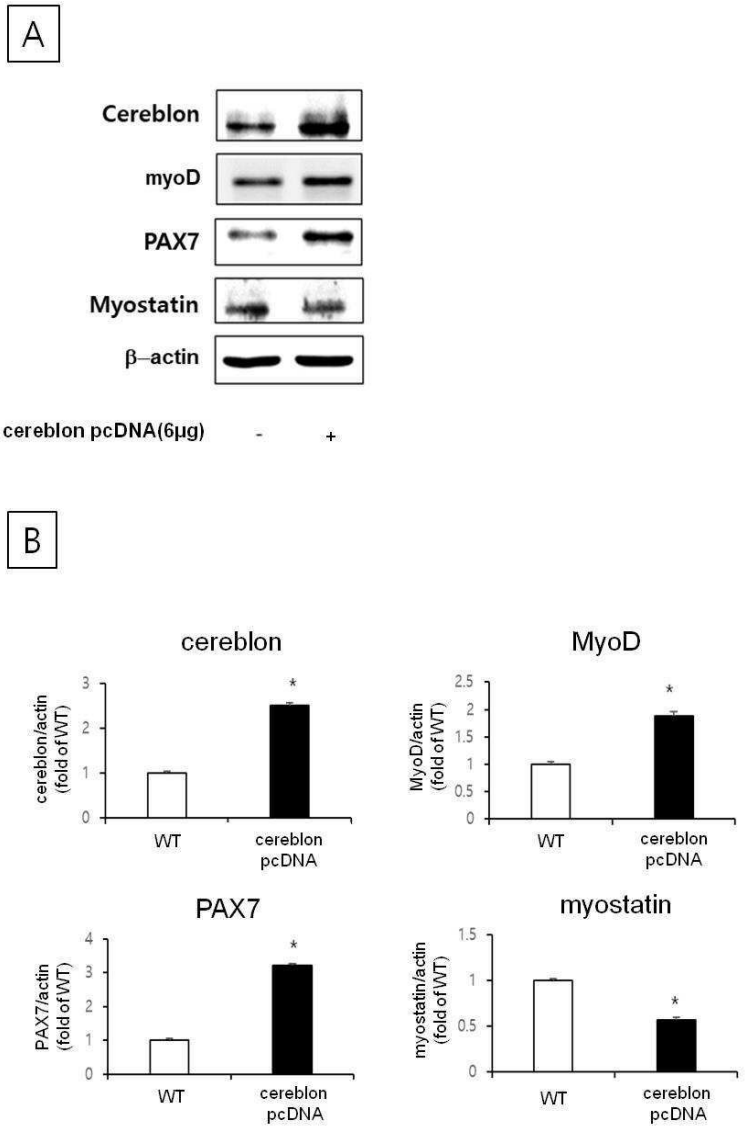
도면1



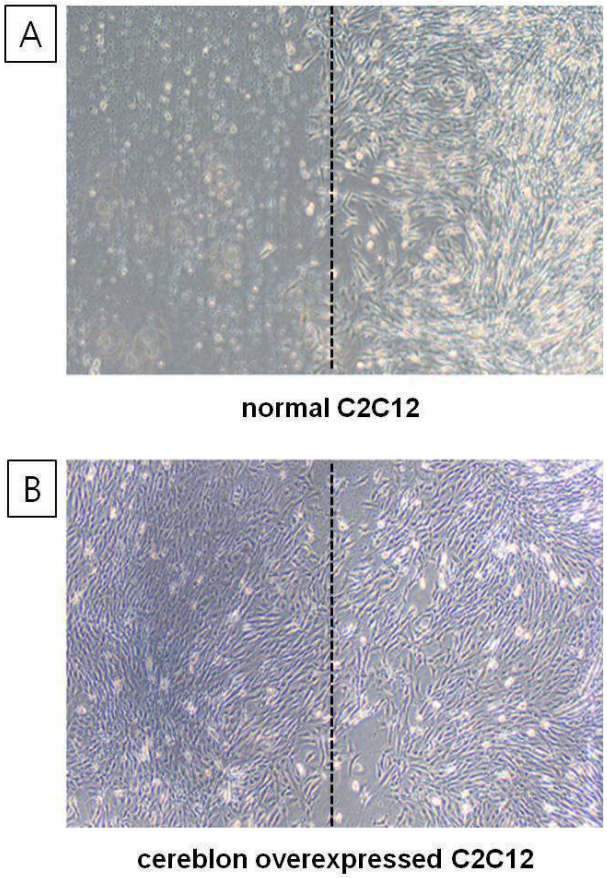
도면2


A
Cereblon
myoD
PAX7
Myostatin
MHC
β–actin
cereblon siRNA(20nM) - +
B
cereblon
MyoD
PAX7
myostatin
MHC
cereblon/actin (fold of WT)
MyoD/actin (fold of WT)
PAX7/actin (fold of WT)
myostatin/actin (fold of WT)
MHC/actin (fold of WT)
WT
cereblon siRNA

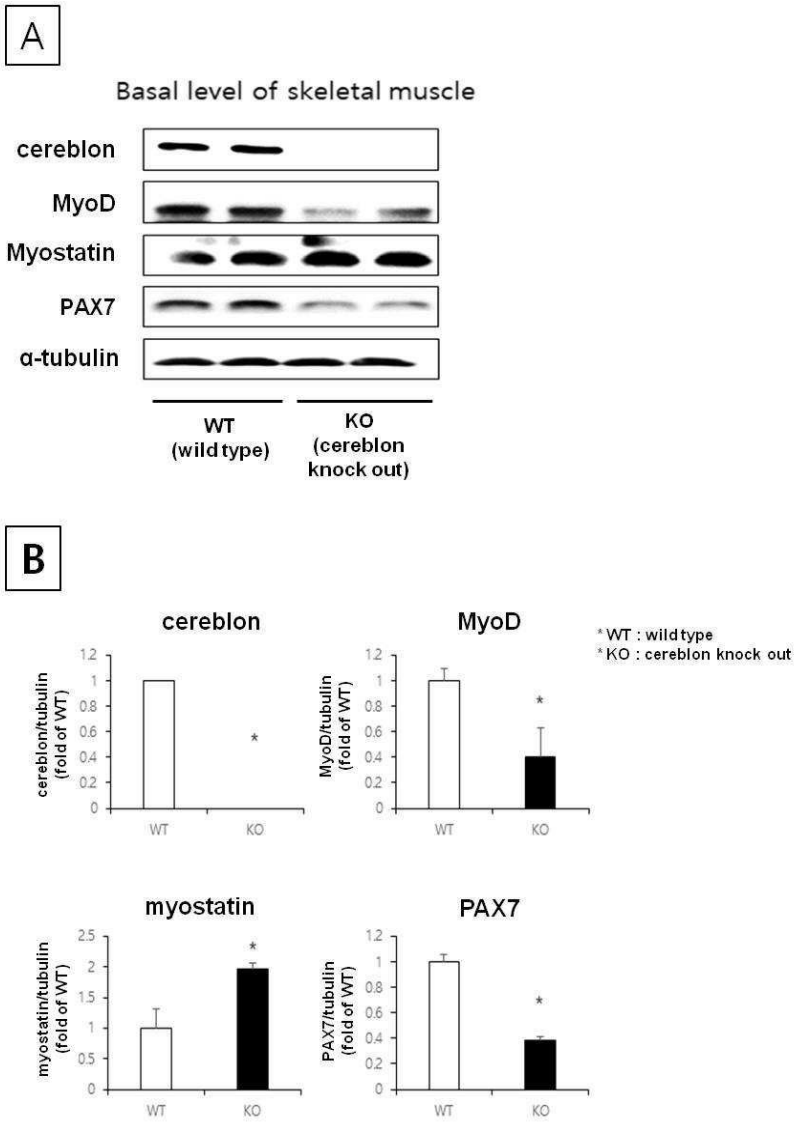
도면3


A
Cereblon
myoD
PAX7
Myostatin
β-actin
cereblon pcDNA(6μg) - +
B
cereblon
cereblon/actin (fold of WT)
WT
cereblon pcDNA
MyoD
MyoD/actin (fold of WT)
PAX7
PAX7/actin (fold of WT)
myostatin
myostatin/actin (fold of WT)

도면4

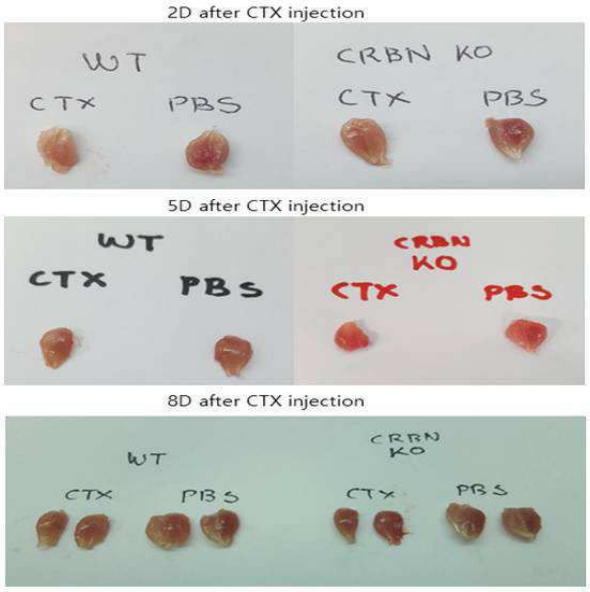


도면5

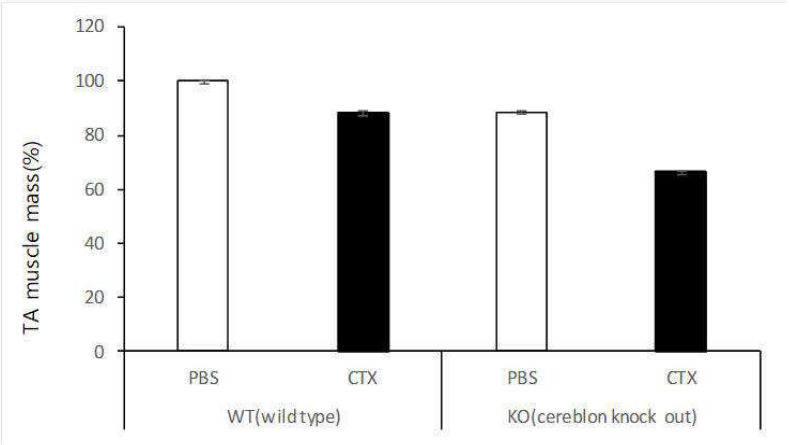

A
Basal level of skeletal muscle
cereblon
MyoD
Myostatin
PAX7
α-tubulin
WT
(wild type)
KO
(cereblon
knock out)
B
cereblon
MyoD
* WT : wild type
* KO : cereblon knock out
cereblon/tubulin
(fold of WT)
MyoD/tubulin
(fold of WT)
myostatin
PAX7
myostatin/tubulin
(fold of WT)
PAX7/tubulin
(fold of WT)
WT
KO

도면6

A


2D after CTX injection
WT
CTX
PBS
CRBN KO
CTX
PBS
5D after CTX injection
WT
CTX
PBS
CRBN KO
CTX
PBS
8D after CTX injection
WT
CTX
PBS
CRBN KO
CTX
PBS

B


TA muscle mass(%)
120
100
80
60
40
20
0
PBS
CTX
PBS
CTX
WT(wild type)
KO(cereblon knock out)