



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0055903
 (43) 공개일자 2008년06월19일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) Int. Cl.
 <i>A23C 21/00</i> (2006.01) <i>A23C 9/00</i> (2006.01)
 <i>A23J 1/20</i> (2006.01) <i>A23L 1/29</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2008-7008516
 (22) 출원일자 2008년04월08일
 심사청구일자 없음
 번역문제출일자 2008년04월08일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/AU2006/001322
 국제출원일자 2006년09월08일</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2007/028210
 국제공개일자 2007년03월15일</p> <p>(30) 우선권주장
 2005904981 2005년09월09일 오스트레일리아(AU)</p> | <p>(71) 출원인
 머레이 걸번 코-어퍼러티브 컴퍼니 리미티드
 호주국, 빅토리아 3056, 브런스윅, 더슨 스트리트 140</p> <p>(72) 발명자
 로우니 마이클
 오스트레일리아 빅토리아 3268 포트 캄프벨 핏처 스트리트 30
 카메론-스미스 데이비드
 오스트레일리아 빅토리아 3137 아쉬부르톤 유이레 스트리트 45
 코넬리 스코트
 미국 씨에이 92625 코로나 텔 마르 포인세티아 에 비뉴 309</p> <p>(74) 대리인
 박장원</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 우유 유래 조성물 및 근육량 또는 근력을 강화하기 위한용도

(57) 요약

본 발명은 영양 보조제로서 사용하기 위한 유제품을 함유하는 조성물의 제조에 관한 것이다. 상세하게 말하자면, 유장 성장 인자 추출물 함유 조성물과 저항성 운동을 수행하는 개체의 영양 부족을 보충하기 위한 방법에 있어서 이들의 사용에 관한 것이다. 본 발명의 하나의 관점에 따르면, 골격 근력을 증가시키기 위하여 양이온 교환 크로마토그래피에 의하여 유제품으로부터 단리시킨 유장 성장 인자 추출물을 함유하는 조성물의 용도가 제공된다.

특허청구의 범위

청구항 1

양이온 교환 크로마토그래피에 의하여 유제품으로부터 단리시킨 유장(乳漿) 성장 인자 추출물 (WGFE)을 함유하는 근력 강화 조성물.

청구항 2

- a) 유제품을 에스피 세파로즈(SP Sepharose) 양이온 교환 칼럼에 적용하는 단계와,
- b) 상기 칼럼을 이온 강도가 약한 완충액으로 세척하는 단계와,
- c) WGFE 분획을 pH 6.5에서 0.4 내지 0.5M NaCl을 함유하는 완충액 또는 이와 이온 강도가 동등한 완충액으로 용출(溶出)시키는 단계

를 포함하는 방법에 의하여 유제품으로부터 단리시킨 유장 성장 인자 추출물을 함유하는 근력 강화 조성물.

청구항 3

- a) 유제품을 에스피 세파로즈 양이온 교환 칼럼에 적용하는 단계와,
- b) 상기 칼럼을 0.008M 이하의 NaCl의 완충액으로 세척하는 단계와,
- c) WGFE 분획을 pH 6.5에서 0.4M의 NaCl을 함유하는 완충액으로 용출시키는 단계

를 포함하는 방법에 의하여 유제품으로부터 단리시킨 유장 성장 인자 추출물을 함유하는 근력 강화 조성물.

청구항 4

제1항, 제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 근력 강화 조성물은 추가의 단백질을 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 단백질원은 유장 단백질인 것인 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 유장 단백질은 유장 단백질 단리물 (WPI)인 것인 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 유장 단백질 단리물은 다음의 성분을 함유하는 것인 조성물.

수분	5.0%
지방	0.5%
pH (5% 용액)	6.3
회분(灰分)	3.7%
락토스	0.5%
단백질 (TN x 6.38)	90.0%
나트륨	0.7%
인	0.3%
칼슘	0.15%

청구항 8

제1항 내지 제7항 중의 어느 하나의 항에 있어서, 상기 유장 성장 인자 추출물은 전유(全乳), 치즈 유장, 레닛 카세인 유장, 산 카세인 유장 또는 탈지 우유로부터 단리시킨 것인 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 유장 성장 인자 추출물은 탈지 우유로부터 단리시킨 것인 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중의 어느 하나의 항에 있어서, 상기 조성물은 근력 강화제로서 사용되는 것인 조성물.

청구항 11

유장 성장 인자 추출물을 유효량으로 함유하는 제1항, 제2항 또는 제3항에 따른 조성물을 저항성 운동 훈련을 수행하는 개체에게 투여하는 것을 포함하는 이들 개체의 근력 및/또는 근육 규격을 증가시키는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 조성물은 최소한 5 mg/ml-체중 내지 12.5 mg/ml-체중의 유장 성장 인자 추출물, 종기로는 최소 25 mg/ml-체중의 유장 성장 인자 추출물을 1일 투여량으로 하여 투여되는 것인 방법.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 조성물은 추가의 단백질을 함유하는 것인 방법.

청구항 14

양이온 교환 크로마토그래피에 의하여 유제품으로부터 단리시킨 유효량의 유장 성장 인자 추출물과 별도로 얻은 추가의 단백질을 함유하는 조성물을 저항성 운동 훈련을 수행하는 개체에 투여하는 것을 포함하는 이들 개체의 근력 및/또는 근육 규격을 증가시키는 방법.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 조성물은 최소한 5 mg/ml-체중에서 12.5 mg/ml-체중의 유장 성장 인자 추출물, 종기로는 최소 25 mg/ml-체중의 유장 성장 인자 추출물 및 최소 225 mg/ml-체중의 추가의 단백질을 1일 투여량으로 하여 투여되는 것인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 추가의 단백질원은 제5항 내지 제7항 중의 어느 하나의 항에 기재되어 있는 것인 방법.

청구항 17

제11항 내지 제16항 중의 어느 하나의 항에 있어서, 개체에 대한 상기 투여는 2일 또는 3일에 1회 내지 1일에 최소 1회인 것인 방법.

청구항 18

제11항 내지 제16항 중의 어느 하나의 항에 있어서, 개체에 대한 상기 투여는 저항성 운동 훈련 이전 및/또는 직후인 것인 방법.

청구항 19

제11항 내지 제16항 중의 어느 하나의 항에 있어서, 상기 투여는 저항성 운동 훈련 직후인 것인 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 투여는 운동 후 20분 내지 2 시간 사이인 것인 방법.

청구항 21

양이온 교환 크로마토그래피에 의하여 유제품으로부터 단리시킨 유장 성장 인자 추출물의, 저항성 운동을 수행하는 개체의 근력 및/또는 근육 규격 증가용 의약의 제조를 위한 용도.

청구항 22

제2항 또는 제3항에 따른 방법에 의하여 유제품으로부터 단리시킨 유장 성장 인자 추출물의, 저항성 운동 훈련을 수행하는 개체의 근력 및/또는 근육 규격 증가용 의약의 제조를 위한 용도.

청구항 23

제1항 내지 제10항 중의 어느 하나의 항에 있어서, 저항성 운동 훈련을 수행하는 개체의 근력 및/또는 근육 규격 증가용 의약의 제조를 위한 상기 조성물의 용도.

청구항 24

제11항 내지 제20항 중의 어느 하나의 항에 따른 방법에 사용하기 위한 제1항 내지 제10항 중의 어느 하나의 항의 조성물을 함유하는 식품, 음료, 정제 또는 캡슐제.

청구항 25

제24항에 있어서 상기 식품은 영양 바(nutritional bar) 또는 스낵 식품의 형식인 것인 식품.

청구항 26

저항성 운동 훈련을 수행하는 개체의 근력 및/또는 근육 규격을 증가시키기 위한 식품, 음료, 정제 또는 캡슐제의 제조를 위한 제1항 내지 제10항 중의 어느 하나의 항의 조성물의 용도.

청구항 27

실시예와 관련하여 본 명세서에 실질적으로 기재된 근력 강화 조성물.

청구항 28

실시예와 관련하여 본 명세서에 실질적으로 기재된 유장 성장 인자 추출물의 용도.

청구항 29

실시예와 관련하여 본 명세서에 실질적으로 기재된 저항성 운동 훈련을 수행하는 개체의 근력 및/또는 근육 규격을 증가시키는 방법.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 영양 보조제로서 사용하기 위한 유제품(乳製品) 함유 조성물의 제조에 관한 것이다. 상세하게 말하자면, 본 발명은 유장(乳漿) 성장 인자 추출물(WGFE)을 함유하는 조성물과, 저항성 운동 훈련을 수행하는 개체 중의 영양 부족을 보충하기 위한 방법에 관한 것이다.

배경기술

<2> 본 발명은 관련 기술 분야에서 종래에 행하여진 기술에 비추어 이해될 것이다. 그러나, 이하의 논의가 인용된 어떠한 물질이 본원의 우선일을 기준으로 하여 호주에서 공개 또는 사용되었다거나 또는 통상의 일반적인 지식의 일부이었다는 사실을 인정하는 것은 아니다.

<3> 인간, 또는 심지어 동물에 의하여 일반적 건강을 향상시키기 위한, 또는 예컨대, 운동 수행 능력을 향상시키기 위한 영양 보조제의 용도는 알려져 있다. 영양 보조제는 완전한 음식을 위한 필수 영양분을 모두 제공하려는 것은 아니고, 대신 일반적으로 음식물 섭취를 보충하여 영양상 더 완벽하게 되도록 하려는 것이다. 비타민, 무기질 및 이들 보조제 중에서 발견되는 기타 물질들은 생리학상 중요한 역할을 하며, 일정한 비타민, 무기질 및/또는 보조제의 기타 성분이 부족하면 어떠한 질병의 진행, 일반적인 건강 저하 또는 운동 수행 능력 감소로 이어진다는 사실은 인정되어 있다.

<4> 반대로, 영양 보조제는 다양한 조건하에서 여러 가지 생리학적 상태를 강화시킨다고 알려져 있다. 영양 보조제에 대해서는 대상이 많이 있는데, 예컨대 병을 앓고 있는 환자, 회복 중인 환자, 노인 및 자신의 운동 수행 능

력 및/또는 격렬한 운동으로부터의 회복을 향상시키기 위하여 격렬한 운동 요법을 수행 중인 사람이 있다.

<5> 보디빌더 및 격렬한 신체적 운동에 참여하는 사람의 필수 영양분은, 체지방을 감소시키고 빈약한 근육량/근육 규격 또는 근력을 증가시키려는 사람, 속도 및/또는 지구력을 증가시키려는 사람 및/또는 격렬한 운동으로부터 회복을 향상시키려는 사람의 여부에 관계없이 극히 특정되어 있다. 단백질 보충은 근육 조직을 회복시키고 근육 성장을 용이하게 하기 위하여, 전문적인 군의 사람들에게 의하여 널리 이용되어 왔다. 영양 보충은 음료 또는 식품의 형태로 제공될 수 있는데, 이들에는 사용시 액체와 혼합되는 단백질 가루, 영양분 바(nutritional bar), 스낵 식품, 정제(錠劑), 캡슐제 및 기타의 조제품이 포함된다. 시판되는 적절한 단백질원으로는 가수분해된 우유 단백질, 카제인염, 콩 단백질 단리물 및 한외 여과 탈지 우유로부터 제조된 우유 단백질 농축물을 들 수 있다. 유장 단백질 등의 기타의 단백질원에 기초한 영양 보조제도 역시 구득 가능하고, 과일 주스의 형태로 제공될 수 있지만, 역시 이들은 지질 원료를 제공하지 않기 때문에 불충분하다고 생각된다 (WO 02/15720). 그 밖에, 우유로부터 얻은 일부의 단백질은 장내에서 쉽게 흡수되지 못한다거나, 또는 소화계의 거친 환경에서 살아남아 치료학적 효과를 나타내지 못한다고 생각된다. 유장 성장 인자 추출물은 이 추출물 중의 어떠한 생물학적 활성 단백질도 일단 접치되면 활성을 잃는다고 예상되기 때문에 지금까지는 영양 보충제로서 유용하고 생각되지 않은 유제품 중의 하나이다.

<6> 그러나, 유장 단백질 보충이 저항성 운동 훈련에 참여하는 사람들에게 근육량/근육 규격 및 근력에 있어서 이득을 제공하는 능력은 유익하다는 것이 보고되어 있다. 유장 단백질 단리물 (WPI) 및 우유 단백질 단리물 (MPI)은 체지방을 줄이면서 탈지방 근육량/근육 규격을 신속하게 얻는 데 있어서, 보디빌더에게 효율적이라고 보고되어 있다. WPI는 분지쇄상의 아미노산에 많고, 작용이 빠르다고 여겨지는 반면에, MPI는 주로 더욱 서서히 신진대사되는 카제인이며, 근육 성장 촉진에 효율적이다. 달걀 알부민이 양질의 아미노산원을 제공하는 대체물이다.

<7> 최근의 데이터는 운동 전 및/또는 후에 단백질 보충은 다량의 단백질 합성을 자극할 수 있지만, 근육량의 증대는 소량이고 변화하기 쉽다는 사실에 대한 증거를 제공한다 (Anderson *et al.*, Metabolism, 2005, 54(2) : 151~156).

<8> 본 발명자는 유장 성장 인자 추출물을 함유하는 조성물이 WPI를 단독으로 함유하는 조성물을 비롯한 선행 기술의 조성물에 의하여 달성되는 것에 비하여 근력의 증진을 현저하게 증가시킨다는 사실을 개시하고 있다.

발명의 상세한 설명

<9> 발명의 요약

<10> 본 발명은 저항성 운동 훈련을 수행하는 사람들이 그들의 근력을 더 증가시킬 수 있도록 하는 조성물 및 방법에 관한 것이다.

<11> 따라서, 본 발명의 목적은 근력을 강화시키기 위한 선행 기술보다 향상된 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

<12> 본 발명의 한 가지 관점에 따르면, 양이온 교환 크로마토그래피에 의하여 유제품으로부터 단리시킨 유장 성장 인자 추출물을 함유하는 골격 근육 강화 조성물이 제공된다.

<13> 본 발명의 또 다른 관점에 따르면, 본 발명은,

- <14> a) 유제품을 에스피 세파로즈 (SP Sepharose) 양이온 교환 칼럼에 적용하는 단계와,
- <15> b) 상기 칼럼을 이온 강도가 낮은 완충액으로 세척하는 단계와,
- <16> c) WGFE 분획을 pH 6.5에서 0.4 내지 0.5M 범위의 NaCl을 함유하는 완충액 또는 이와 이온 강도가 동등한 완충액으로 용출시키는 단계

<17> 를 포함하는 공정에 의하여 유제품으로부터 단리시킨 유장 성장 인자 추출물로 이루어진 골격 근육 강화 조성물이 제공된다.

<18> 본 발명의 또 다른 관점에 따르면, 본 발명은,

- <19> a) 유제품을 에스피 세파로즈 양이온 교환 칼럼에 적용하는 단계와,
- <20> b) 상기 칼럼을 0.008M 또는 그 이하의 완충액으로 세척하는 단계와,
- <21> c) WGFE 분획을 pH 6.5에서 0.4M NaCl을 함유하는 완충액 또는 이와 이온 강도가 동일한 완충액으로 용출시키는 단계

- <22> 를 포함하는 공정에 의하여 유제품으로부터 단리시킨 유장 성장 인자 추출물을 함유하는 골격 근력 강화 조성물이 제공된다.
- <23> 본 발명의 또 다른 관점에 있어서, 상기 유장 성장 인자 추출물은 전유(全乳), 치즈 유장, 레닛 카세인 유장, 산 카세인 유장 또는 이들의 농축물 또는 탈지 우유로부터 선택된 유제품으로부터 단리된 것인 전술한 조성물이 제공된다.
- <24> 본 발명의 또 다른 관점에 있어서, 근력 및/또는 근육 규격 강화제로서 사용되는 경우 전술한 조성물이 제공된다.
- <25> 본 발명의 또 다른 관점에 있어서, 저항성 운동 훈련을 하는 개체에 양이온 교환 크로마토그래피에 의하여 유제품으로부터 단리시킨 유효량의 유장 성장 인자 추출물 함유 조성물의 투여를 포함하는 이들 개체의 골격 근력 및/또는 근육 규격의 향상 방법이 제공된다.
- <26> 본 발명의 또 다른 관점에 있어서, 본 발명은,
- <27> a) 유제품을 에스피 세파로즈 양이온 교환 칼럼에 적용하는 단계와,
- <28> b) 상기 칼럼을 이온 강도가 낮은 완충액으로 세척하는 단계와,
- <29> c) WGFE 분획을 pH 6.5에서 0.4 내지 0.5M 범위의 NaCl을 함유하는 완충액 또는 이와 이온 강도가 동일한 완충액으로 용출시키는 단계
- <30> 를 포함하는 공정에 의하여 유제품으로부터 단리시킨 유장 성장 인자 추출물을 함유하는 조성물을 유효량으로 저항성 운동 훈련을 수행하는 개체에 투여하는 것을 포함하는 이들 개체의 골격 근력 및/또는 근육 규격의 향상 방법이 제공된다.
- <31> 본 발명의 또 다른 관점에 있어서, 본 발명은,
- <32> a) 유제품을 에스피 세파로즈 양이온 교환 칼럼에 적용하는 단계와,
- <33> b) 상기 칼럼을 0.008M 또는 그 이하의 완충액으로 세척하는 단계와,
- <34> c) WGFE 분획을 pH 6.5에서 0.4M NaCl을 함유하는 완충액 또는 이와 이온 강도가 동일한 완충액으로 용출시키는 단계
- <35> 를 포함하는 공정에 의하여 유제품으로부터 단리시킨 유장 성장 인자 추출물을 함유하는 조성물을 유효량으로 저항성 운동 훈련을 하는 개체에 투여하는 것을 포함하는 이들 개체의 골격 근력 및/또는 근육 규격 향상 방법이 제공된다.
- <36> 본 발명의 또 다른 관점에 있어서, 상기 유장 성장 인자 추출물의 1일 투여량이 최소한 5 mg/kg-체중 내지 12.5 mg/kg-체중인, 저항성 운동 훈련을 하는 개체의 골격 근력 및/또는 근육 규격 향상 방법이 제공된다. 좋기로는, 유장 성장 인자 추출물의 1일 투여량은 최소한 25 mg/kg-체중이다.
- <37> 본 발명의 또 다른 관점에 있어서, 골격 근력 및/또는 근육 규격을 향상시킬 필요가 있는 개체의 치료용 약물을 제조하기 위한 양이온 교환 크로마토그래피에 의하여 유제품으로부터 단리시킨 유장 성장 인자 추출물의 용도가 제공된다.
- <38> 본 발명의 또 다른 관점에 있어서, 골격 근력 및/또는 근육 규격을 향상시킬 필요가 있는 개체의 치료용 약물을 제조하기 위한 앞에서 설명한 방법에 의하여 유제품으로부터 단리시킨 유장 성장 인자 추출물의 용도가 제공된다.
- <39> 본 발명의 또 하나의 관점에 따르면, 양이온 교환 크로마토그래피에 의하여 유제품으로부터 단리시킨 유장 성장 인자 추출물 및 추가의 단백질원을 함유하는 골격 근력 강화 조성물이 제공된다.
- <40> 본 발명의 또 다른 관점에 있어서, 추가의 단백질원으로는 유장 단백질, 좋기로는 유장 단백질 단리물 (WPI), 더 좋기로는 상기 유장 단백질 단리물은 다음을 포함하는 유장 단백질 단리물이다.
- <41> 수분 5.0%
- <42> 지방 0.5%
- <43> pH (5% 용액) 6.3

<44>	회분(灰分)	3.7%
<45>	락토스	0.5%
<46>	단백질 (TN x 6.38)	90.0%
<47>	나트륨	0.7%
<48>	인	0.3%
<49>	칼슘	0.15%

<50> 본 발명의 또 다른 관점에 있어서, 저항성 운동 훈련을 하는 개체에 유장 성장 인자 추출물 및 유장, 종기로는 WPI 등의 추가의 단백질원을 함유하는 조성물을 유효량으로 투여하는 것을 포함하는 이들 개체에 있어서의 골격 근력 및/또는 근육 규격 증가 방법이 제공된다.

<51> 본 발명의 또 다른 관점에 있어서, 저항성 운동 훈련을 하는 개체에 양이온 교환 크로마토그래피에 의하여 유제품으로부터 단리시킨 유효량의 유장 성장 인자 추출물 및 별도로 얻은 추가의 단백질원을 함유하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 이들 개체에 있어서 골격 근력 및/또는 근육 규격 증가 방법이 제공된다.

<52> 종기로는 추가의 단백질원의 1일 투여량은 최소한 225 mg/kg-체중 (건조 중량), 종기로는 최소한 435 mg/kg-체중 (건조 중량)이다.

<53> 본 발명의 또 다른 관점에 있어서, 본 발명 조성물의 투여는 2일 또는 3일에 1회 내지 1일에 최소 1회이고, 종기로는 저항 운동 훈련 전 및/또는 직후, 더욱 종기로는 저항 운동을 한 직후, 가장 종기로는 운동 후 20분 내지 2 시간 사이이다.

<54> 본 발명의 또 하나의 관점에 있어서, 골격 근력 및/또는 근육 규격을 향상시킬 필요가 있는 개체의 치료용 약물의 제조를 위한 양이온 교환 크로마토그래피에 의하여 유제품으로부터 단리시킨 유장 성장 인자 추출물 및 추가의 단백질원의 용도가 제공된다.

<55> 본 발명의 또 다른 관점에 있어서, 저항성 운동 훈련을 하는 개체에 있어서 골격 근력 및/또는 근육 규격을 증가시키기 위한 방법에 사용되는 본 발명의 조성물을 함유하는 식품 또는 음료가 제공된다.

<56> 본 발명의 또 다른 관점에 있어서, 저항성 운동 훈련을 하는 개체에 있어서 골격 근력 및/또는 근육 규격을 증가시키기 위한 식품 또는 음료의 제조를 위한 본 발명 조성물의 용도가 제공된다.

<57> **발명의 상세한 설명**

<58> 본 발명은 저항성 운동을 수행하는 사람들이 그들의 근력을 증가시킬 수 있도록 하는 조성물 및 방법에 관한 것이다.

<59> 따라서, 본 발명의 목적은 근력을 증가시키는 선행 기술보다 향상된 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

<60> 본 발명의 한 가지 관점에 따르면, 양이온 교환 크로마토그래피에 의하여 유제품으로부터 단리시킨 유장 성장 인자 추출물을 함유하는 골격 근력 강화용 조성물이 제공된다.

<61> 본 발명에서 사용하기 위한 상기 유장 성장 인자 추출물은 우유, 탈지 우유, 우유 유도제, 유장, 초유 및 초유 유도제로부터, 예컨대 본 명세서에 참고로 포함시킨 호주 특허 제645589호 (PCT/AU91/00303)에 기재되어 있는 방법에 의하여 단리시킬 수 있다. 이 방법은 유장 성장 인자 추출물을 구성하는 출발 물질로부터 염기성 단백질을 선택적으로 추출하는 강한 양이온 교환 크로마토그래피에 본질적으로 의존한다.

<62> **WGFE 분획의 제조 방법**

<63> 본 발명에서 사용하기 위한 양호한 WGFE 제조 방법은 에스피(SP (술포프로필)) 세파로즈로 채워진 칼럼을 사용하는 것이다. 상기 칼럼에 유제품, 종기로는 탈지 우유의 흐름을 적용된 우유의 부피가 그 칼럼에 채워놓은 수지 부피의 최대 1000배로 될 때까지 적용한다. 칼럼 중에 잔류하는 우유를 이온 강도가 작은 (<0.008M NaCl 또는 이와 등가) 완충액으로 10분간 제거한다. 0.4~0.5M NaCl (기타의 양이온도 적당하지만), 가장 종기로는 0.4M의 NaCl과 등가의 나트륨 이온을 함유하는 완충액을 사용하여 칼럼으로부터 상기 WGFE 성분을 용출시킨다.

<64> 이동층의 pH는 4.5~9.0 등의 넓은 범위일 수 있는데, 5.5~7.5가 좋고, 약 6.5가 가장 좋다. 상한과 하한 모두에서 단백질 안정성 및 단백질의 양이온 교환 수지에 대한 결합력이 영향을 받게 된다. 5.5~7.5 범위의 pH에서

WGFE의 수율이 가장 높다.

- <65> WGFE 성분의 흡착에 적합한 양이온 교환 수지의 종류로서는 세파로즈 양이온 교환 수지 비드 등의 수지를 들 수 있다. 예컨대, 숄포프로필 작용기 및 카르복시메틸기를 각각 함유하는 SP Sepharose Big Beads 및 CM Sepharose beads (GE Healthcare의 제품)이 적절하다. 양이온 교환 수지 비드의 크기는 45~300 μm 가 좋다. 45~165 μm 범위 및 100~300 μm 범위의 SP Sepharose 비드 모두 본 발명에 따른 WGFE 정제에 적합하다.
- <66> WGFE 분획이 겪을 수 있는 추가의 처리법 중의 하나는, 예컨대 투석 또는 한의 여과에 의한 탈염이다.
- <67> 따라서, 본 발명의 또 다른 관점에 있어서, 상기 유장 성장 인자 추출물이 유장 또는 탈지 우유로부터 단리되는 것인 전술한 조성물이 제공된다. 출발 물질로서 사용되는 유장은 치즈 유장, 레닛 카세인 유장, 산 카세인 유장 또는 이들의 농축물일 수 있다. 유장 성장 인자 추출물 및 본 발명에 따라 사용되는 단백질원의 양은 근력 및/또는 근육 규격을 향상시키거나 또는 치료 효과를 나타내는 데 충분하여야 한다.
- <68> 본 발명의 또 하나의 관점에 있어서, 유장 성장 인자 추출물의 1일 투여량은 최소한 5 mg/kg-체중 내지 12.5 mg/kg-체중인 복용 방법이 제공된다. 좋기로는, 유장 성장 인자 추출물의 1일 투여량은 최소한 25 mg/kg-체중이다.
- <69> 본 발명의 또 다른 관점에 있어서, 저항성 운동 훈련을 하는 개체에 유장 성장 인자 추출물을 함유하는 조성물을 유효량으로 투여하는 것을 포함하는 이들 개체의 골격 근력 및/또는 근육 규격 향상 방법이 제공된다.
- <70> 상기 조성물이 WPI 등의 소비용으로 적합한 임의의 단백질원일 수 있는 추가의 단백질원을 함유하는 경우, 단백질원을 단독으로 투여한 개체에 비하여 운동 후 근력이 증가하였다. 상기 단백질원은 전유, 좋기로는 유장 단백질, 더 좋기로는 유장 단백질 단리물 (WPI)로부터 얻을 수 있다. 그러한 유장 단백질 단리물은 나트라프로™ (NatraPro™)라는 상품명으로 머레이 걸번사(Murray Goulburn Co-Op Company Ltd)에 의하여 시판되고 있다. 나트라프로™ WPI의 일반적인 조성물은 다음 성분들을 함유한다.
- <71> 수분 5.0%
- <72> 지방 0.5%
- <73> pH (5% 용액) 6.3
- <74> 회분 3.7%
- <75> 락토스 0.5%
- <76> 단백질 (TN x 6.38) 90.0%
- <77> 나트륨 0.7%
- <78> 인 0.3%
- <79> 칼슘 0.15%
- <80> 또한 본 발명에 따른 조성물은 단백질원을, 투여 방식에 있어서, 추가의 단백질원의 1일 투여량을 최소한 225 mg/kg-체중 (건조 중량), 좋기로는 최소한 435 mg/kg-체중 (건조 중량)으로 함유하는 것이 좋다.
- <81> 본 발명의 조성물은, 투여 방식이 근력 및/또는 근육 규격을 증가시키는 경우라면, 훈련 당일 또는 훈련 당일 및/또는 기타의 날에도 투여될 수 있다는 사실은 이 기술 분야의 숙련자에게 자명할 것이다. 운동 당일에 투여하는 것이 좋은데, 운동 직전 및/또는 직후에 투여하는 것이 더욱 좋다. 운동 후 20분 내지 2 시간 사이에 투여하는 것은 더욱 좋다. 따라서, 본 발명의 양호한 관점에 있어서, 상기 투여는 운동 직후에 투여하는 것인 위에서 설명한 방법이 제공된다.
- <82> 본 발명의 또 다른 측면에 있어서, 골격 근력 및/또는 근육 규격을 증가시킬 필요가 있는 개체의 치료용 의약의 제조를 위한 유장 성장 인자 추출물의 용도가 제공된다. 예컨대, 근육 소모병 환자 또는 중장년층은 그들의 근력을 한 번 더 증강시키는 저항성 운동 훈련이 필요할 수 있다. 본 발명의 조성물을 함유하는 의약은 그들의 근력을 회복하려는 개체에게 역시 도움을 줄 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 말, 그레이하운드 및 기타의 근력을 증가시킬 필요가 있는 인간이 아닌 포유 동물에 있어서 근력을 증가시키는 데 사용될 수 있다.
- <83> 본 발명의 또 다른 관점에 있어서, 저항성 운동 훈련을 수행하는 개체에 있어서 골격 근력 및/또는 근육 규격을 향상시키는 방법에 사용하기 위한 본 발명의 조성물을 함유하는 식품 또는 음료가 제공된다.

- <84> 본 발명의 또 다른 관점에 있어서, 저항성 운동 훈련을 수행하는 개체 중의 골격 근력 및/또는 근육 규격을 향상시키기 위한 식품 또는 음료의 제조에 있어서 본 발명의 조성물의 용도가 제공된다. 본 발명의 조성물은 저항성 운동 훈련을 수행하는 개체에게 투여하기 위하여 정제 또는 캡슐제의 형태로 제공될 수 있다는 사실은 이해되어야 한다.
- <85> WPI는 일반적으로 약 90% w/v의 단백질을 함유하므로, 20 g의 WPI에는 18 g의 단백질이 영양원으로서 함유되어 있다.
- <86> 유장 성장 인자 추출물은 일반적으로 약 85% w/v의 단백질을 함유하므로, 2 g의 유장 성장 인자 추출물은 약 1.7 g의 단백질을 영양원으로서 함유한다.
- <87> 본 명세서에 기재되어 있는 발명은 개시된 특징의 특정한 실시예들에 한정되는 것은 아니라는 사실을 인식하게 될 것이다.

실시예

<93> 실시예 1: 임상 시험

<94> 3개월의 무작위형 이중 맹검 저항성 훈련 프로그램에 참여시킨 20명의 젊은 남성을 대상으로 하여 임상 시험을 수행하였다. 유장 성장 인자 추출물을 호주 특허 제645589호 (PCT/AU91/00303)에 개략적으로 설명되어 있고, 앞에서 더욱 상세하게 설명된 방법에 따라 제조하였다. 각 유장 단백질 제제는 인공 감미료 (Nutrasweet™, Nutrasweet Company, USA)를 함유하였다. 매주 3회의 감독받는 운동을 완수한 각 개체에게, 매 운동 기간 직후에 유장 단백질 제제를 섭취시켰다.

<95> 개체들을 3개군의 보충군 중의 1군에 무작위 배정하였다.

<96> A군: 매 투여당 20 g의 나트라프로 (WPI), 7명

<97> B1군: 매 투여당 20 g의 나트라프로 (WPI) 및 1 g의 WGFE, 6명

<98> B2군: 매 투여당 20 g의 나트라프로 (WPI) 및 2 g의 WGFE, 7명

<99> NatraPro™ WPI의 일반적인 조성물은 다음의 성분을 함유한다.

<100>	수분	5.0%
<101>	지방	0.5%
<102>	pH (5% 용액)	6.3
<103>	회분	3.7%
<104>	락토스	0.5%
<105>	단백질 (TN x 6.38)	90.0%
<106>	나트륨	0.7%
<107>	인	0.3%
<108>	칼슘	0.15%

<109> 본 발명에 따른 WGFE의 일반적인 조성물은 다음의 성분을 함유한다.

<110>	수분	5.0%
<111>	지방	<0.5%
<112>	pH (5% 용액)	6.7
<113>	단백질 (TN x 6.38)	95.0%
<114>	회분	1.5%
<115>	pH (5% 용액)	5.5-6.5

<116> Cybex NORM 근력계를 이용하는 다리 확장 강도 시험에 의하여 근력을 분석하였다.

<117> **근육 분석**

<118> 경피적(經皮的) 바늘 생검 기술을 사용하여 우측 다리의 외측광근으로부터 근육 시료를 수집하였다. 절개된 근육 조직을 육안으로 조사하고, 임의의 지방 또는 연결 조직이 없도록 절개하여 과량의 혈액 오염을 제거하고, 후속되는 분석을 위하여 액화 질소 중에서 즉시 냉동시켰다. 근육 조직의 일부를 수용성 봉입제(封入劑) 중에서 표본 제작하고 후속되는 면역 조직 화학 분석을 위하여 액화 질소 중에서 냉각시킨 이소펜탄 중에서 냉동시켰다.

<119> **RNA 추출 & 유전자 발현 분석**

<120> ToTALLY RNA 키트 및 시약 (암비온사(Ambion Inc.))을 사용하여 제조사의 설명서에 따라 골격근 시료로부터 RNA를 추출하였다. Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc.)을 이용하여 총 RNA 농도 및 질을 측정하였다. 이어서, AMV 역전사 효소 키트 프로토콜 및 시약 (Promega)을 사용하여 RNA를 cDNA로 역전사하였다. Primer Express 2.0 소프트웨어를 사용하여 설계된 유전자 특이 프라이머를 사용하여 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 위에서 유전자 발현 분석을 수행하였다.

<121> **면역 조직 화학**

<122> 각 시료의 연속 절편 (10 μm)을 미오신 중쇄 섬유 타입의 분석을 위하여 현미경 슬라이드 위에서 표본 제작하였다. 미오신의 고속 및 저속 이소형(isoform)에 기초한 면역 조직 화학 기법을 이용하여 섬유 타입 분포 및 베한(Behan) 프로토콜에 기초한 근육 단면적을 조사하였다. 표준 면역 조직 화학 기법 및 관련 단백질에 대하여 발생하는 항체를 이용하여 단백질의 세포성 국소화를 수행하였다.

<123> **결과**

<124> 결과를 평균 ± SEM으로서 나타내고, 유의성(有意性)을 본포로니 포스트 호크(Bonforoni post hoc) 시험을 사용하여 이원(二元) 아노바(two-way ANOVA)에 의하여 산출하였다. 운동 전과 후 모두에서 연령, 체중, 신장 또는 BMI 값에 따른 유의차는 없었다.

<125> **표 1 - 개체 특성**

개체 특성	NatraPro WPI (A) (n=7)	NatraPro WPI (B1) (n=6)	NatraPro WPI (B2) (n=7)
나이	20.4±0.6	19.5±0.6	19.0±0.4
키	182.7±3.3	180±5.2	182.3±4.1
체중			
훈련 전	79.9±4.0	80.3±4.6	79.3±6.0
훈련 후	80.1±3.2	80.0±4.7	80.9±5.9
BMI			
훈련 전	24.5±0.8	24.3±1.0	23.9±1.1
훈련 후	24.07±1.1	24.2±1.0	24.4±1.0

<127> 모든 개체는 12주의 강도 훈련 후에 골격 근력의 향상이 있었음을 증명하였다.

<128> 나트라프로 WPI (B1)군은 레그 프레스 강도에 있어서 A군에 비하여 약 23% 향상된 증강을 나타낸 반면에, 나트라프로 WPI (B2)군은 단백질원을 단독으로 받은 개체 (나트라프로 WPI (A), 도 1)에 비하여 레그 프레스 강도에 있어서 35% 향상된 증강을 나타내었다.

<129> **골격 근육 섬유 타입 변화**

<130> 타입 1 (저속/산화) 또는 타입 2 (고속/해당화(解糖化))로서 분류되는 근육 섬유의 백분율을 유장 성장 인자 추출물을 투여함으로써 변화시켰고, 이는 타입 2B (가장 해당화하는) 섬유의 비율을 증가시키고, 이에 대응하여 타입 1 (저속) 섬유의 비율을 감소시키는 경향을 초래하였다.

<131> **유전자 발현 분석**

<132> 유전자의 발현 및 조절은 근육상(筋肉床) (위성 세포) 내부에 위치한 줄기 세포를 활성화시키는 본질적인 과정

이다 (Anderson & Wozniak, Can J Physiol Pharmacol. 2004; 82(5):300-10). 성숙하기 전에 그리고 최종적으로 현존하는 근육 섬유와 융합 또는 함께 결합하여 새로운 근육 섬유를 생성하기 전에, 신속하게 증식하는 성체 줄기 세포의 개체군이다. 위성 세포의 활성화 조절자로서는 신데칸(Syndecan)-3 (위성 세포 증식에 필수적인 투과 막 heparin 황산염 프로테오글리칸), 팩스(Pax)-7 (위성 세포 활성화에 필수적이고 근육 조직 회복에 필요한 단백질을 들 수 있다 (Seal *et al.*, Dev Biol. 2004; 275(2):287-300; Cornelison *et al.*, Dev Biol. 2001; 239(1):79-94).

<133> 팩스 7 및 신데칸 3의 발현은 12주의 훈련 후에 증가하는 경향이 있고 유장 성장 인자 추출물을 투여하면 더욱 그러하다 (도 3).

<134> 상기 데이터는 WGFE가 저항성 운동 훈련 후의 근력 및/또는 근육 규격을 증가시킨다는 사실을 뒷받침해 주고 있다. 이 데이터는 WPI 등의 추가의 단백질원과 결합한 WGFE가 저항성 운동을 훈련을 수행하는 개체들에 의하여 사용되는 것으로 알려져 있는 단백질원 WPI를 단독으로 투여한 경우에 비하여 강도 획득을 더 큰 폭으로 증가시킨다는 사실도 역시 뒷받침해 주고 있다.

<135> 이를 뒷받침하여, 유장 성장 인자 추출물의 투여는 근육 섬유 타입을 저속 (타입 1)으로부터 고속 (타입 2)으로의 변화 및 근육 줄기 세포 활성화 유전자 팩스 7 및 신데칸 3의 발현 증가를 촉진한다는 사실이 관찰되었다.

<136> **실시예 2: WGFE가 근육모 세포의 성장에 미치는 영향.**

<137> L6 근육모 세포를 WGFE (LP), 초유, 10% 우태아혈청 (FCS) 또는 오직 매질 (자극하지 않음)의 존재하에 성장시키는 생체내 근육 세포 성장 연구를 수행하였다. 유장 성장 인자 추출물을 실시예 1로서 제조하였다.

<138> 도 4A: 0.04~5 mg/ml 범위의 농도의 LP (WGFE) 또는 초유를 사용한 자극에 대한 반응에 있어서 48 시간의 L6 근육모 세포 성장 분석. 각 점은 3회의 측정으로 얻은 산술 평균 ± SEM을 나타낸다.

<139> WGFE 5 mg/ml로 48 시간 자극한 경우, 세포의 수가 약 2배 증가하였다. 양성 대조군으로서 10% FCS가 포함되었다. 머레이 결번사에 의하여 제조된 초유도 역시 비교 목적으로 포함되었다.

<140> 도 4B: 최대 10 mg/ml의 WGFE에 대한 복용 반응을 측정하는 48 시간의 L6 근육 모세포 성장 분석. 각 점은 3회의 측정으로 얻은 산술 평균 ± SEM을 나타낸다.

<141> 이는 최대 반응은 약 2.5~5 mg/ml에서 달성되고, 이어서 WGFE 농도가 10 mg/ml로 증가함에 따라 감소된다는 사실을 나타낸다.

<142> 도 4C: 5 mg/ml의 WGFE 및 비자극에 대한 반응에 있어서 48 시간의 L6 근육 모세포 성장 분석. 각 점은 3회의 독립적인 실험으로 얻은 평균 반응의 산술 평균 ± SEM을 나타낸다.

<143> 이들 데이터는 WGFE가 근육모 세포의 성장을 자극하는 반면에, 초유는 동일한 농도 범위에서 자극 효과가 거의 없고, 최적의 자극 효과는 1.25~5.0 mg/ml의 범위라는 사실을 시사한다. 더욱이, WGFE로 처리한 근육모 세포의 성장 속도는 처리하지 않은 세포에 비하여 약 2배 빠르다.

<144> **실시예 3: WGFE 및 WPI가 섬유모 세포 성장에 미치는 영향.**

<145> BalbC 3T3 섬유모 세포를 WGFE, WPI, 초유 및 기타 우유 성분, 10% FCS (양성 대조군) 또는 오직 배지만 ('Nil')의 존재하에 성장시키는 시험관내 섬유모 세포 성장 연구를 수행하였다. 실시예 1에 의하여 유장 성장 인자 추출물을 제조하였다. WPI는 나트로프로™라는 상품명으로 머레이 결번사에 의하여 시판되고 있다.

<146> 초유, WPI 100 mg/ml, WGFE 100 mg/ml 또는 위에서 설명한 여러 가지 우유 성분에 대한 반응에 있어서 BalbC 3T3 섬유모 세포를 48 시간 성장시켰다. 좌표에 나타난 값들은 3회의 독립적인 실험으로 얻은 평균 반응의 산술 평균 ± SEM을 나타낸다. 이 분석은 WGFE가 세포 성장 자극에 있어서 WPI를 단독으로 사용하는 경우보다 훨씬 강력하다는 사실을 보여준다.

도면의 간단한 설명

<88> **도 1:** Cybex NORM 근력계 반복 최대 강도 시험은 휴지기과, 시험 개시시 [훈련 전] 및 저항성 운동 훈련 3 시간 직후에 20 g WPI (A군), 1 g WGFE + 20 g WPI (B1군), 2 g WGFE + 20 g WPI (B2군)을 투여하는 6주 및 12주 처치 후 [훈련 후]에 성인 개체의 레그 프레스(leg press)를 초래한다. 결과를 평균 ± SEM으로서 나타내었다.

<89> **도 2:** 저항성 운동 훈련 및 20 g WPI (A군), 1 g WGFE + 20 g WPI (B1군), 2 g WGFE + 20 g WPI (B2군)에 의하

여 처치 후 [훈련 후] 12주에 성인 개체의 외측광근 중의 섬유 타입 조성물의 백분을 변화. 결과를 평균 ± SEM으로서 나타내었다.

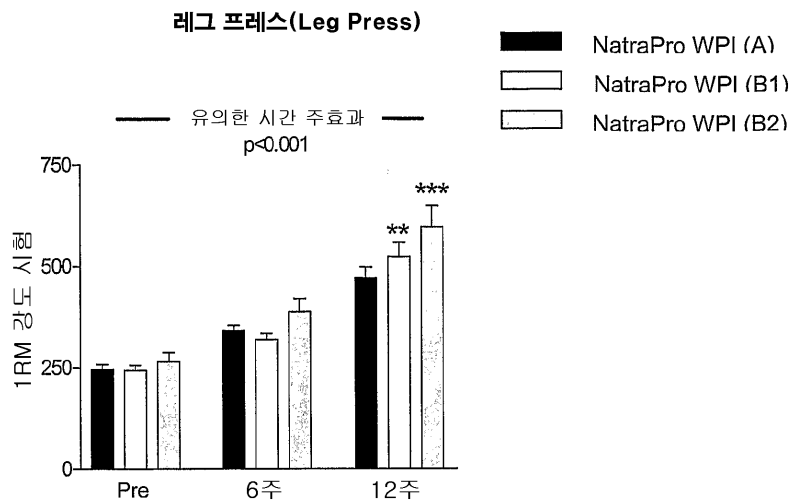
<90> **도 3:** 휴지기과, 시험 개시시 [훈련 전] 및 20 g WPI (A군), 1g WGFE + 20 g WPI (B1군), 2 g WGFE + 20 g WPI (B2군)에 의하여 12주 처치 후 [훈련 후] 저항성 운동 훈련 3 시간 후의 성인 개체의 외측광근 중의 팩스 (Pax) 7 및 신데칸(Syndecan) 3 유전자 (mRNA) 발현의 기록 변화. 결과를 평균 ± SEM으로서 나타내었다.

<91> **도 4A:** 0.04~5 mg/ml 범위의 농도의 LP (WGFE) 또는 초유를 사용한 자극에 반응함에 있어서 48 시간의 L6 근육모 세포 성장 분석. 각 점은 3회 측정으로 얻은 산술 평균 ± SEM을 나타낸다. 양성 대조군으로서, 10% FCS가 포함되었다. 초유는 머레이 결번사에 의하여 제조되었다. **4B:** 최대 10 mg/ml의 LP (WGFE)에 대한 복용 반응을 측정하는 48 시간의 L6 근육모 세포 성장 분석. 각 점은 3회 측정으로 얻은 산술 평균 ± SEM을 나타낸다. **4C:** 5 mg/ml의 LP (WGFE) 및 비자극에 대한 반응에 있어서 48 시간의 L6 근육모 세포 성장 분석. 각 점은 3회의 독립적인 실험으로 얻은 평균 반응의 산술 평균 ± SEM을 나타낸다.

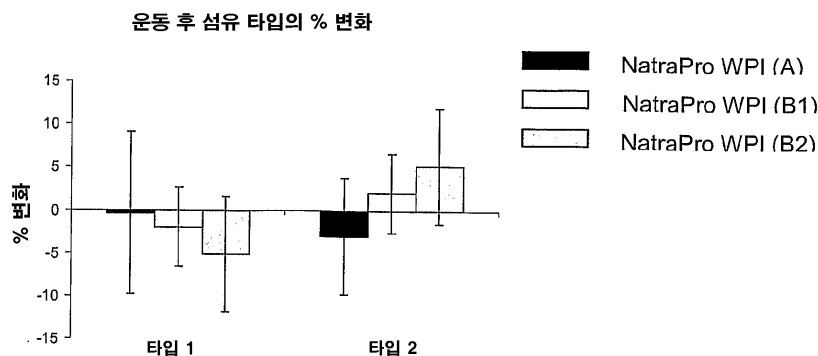
<92> **도 5:** CPI (WPI) 100 mg/ml에서 또는 FMP (WGFE) 100 mg/ml에서 또는 초유, 락토페린 (LF) 및 10% FCS (양성 대조군) 등의 기타 우유 성분에 대한 반응에 있어서 48 시간의 BalbC 3T3 섬유모 세포 성장 분석. 좌표에 나타낸 값들은 3회의 독립적인 실험으로 얻은 평균 반응의 산술 평균 ± SEM을 나타낸다.

도면

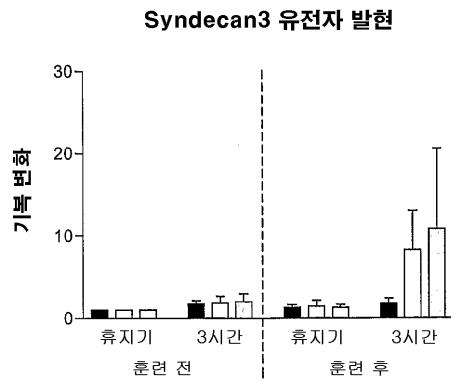
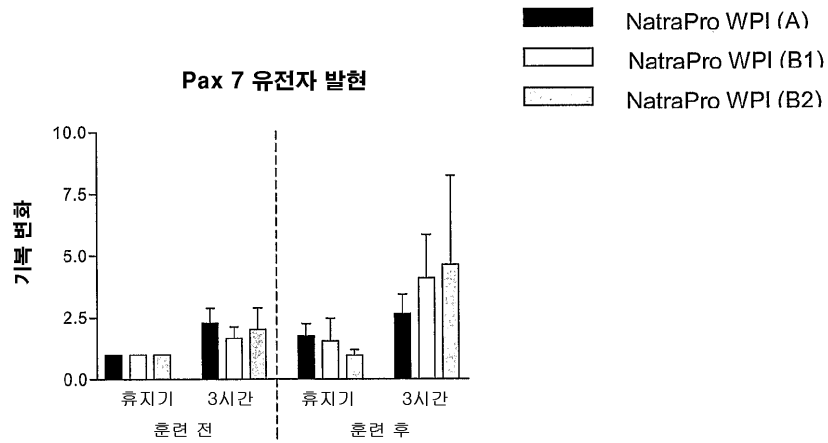
도면1



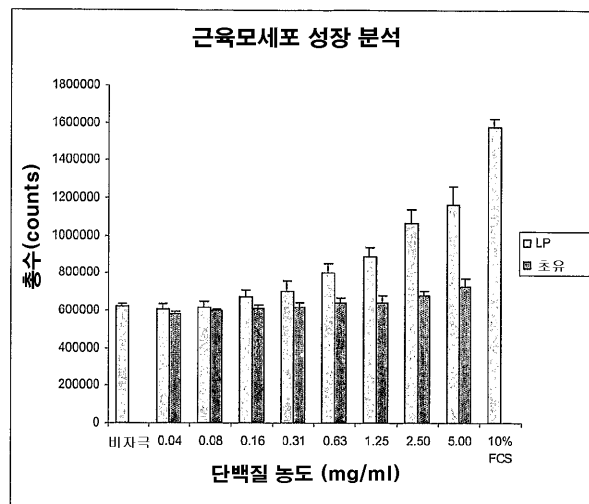
도면2



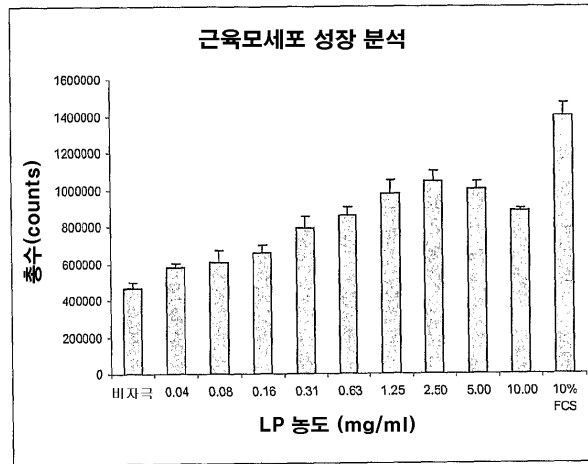
도면3



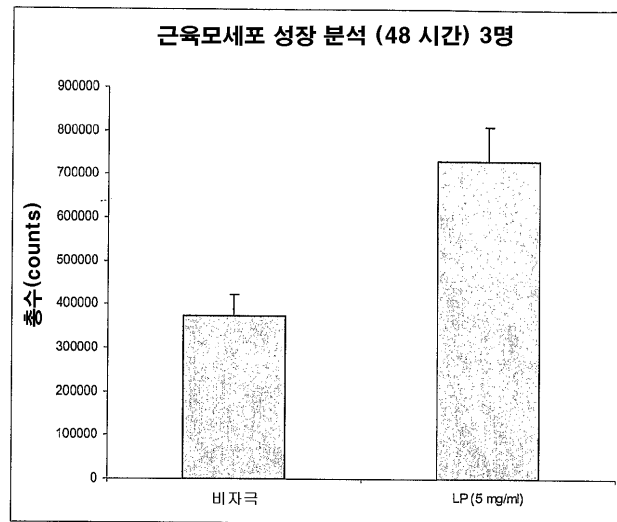
도면4A



도면4B



도면4C



도면5

