



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0023259
(43) 공개일자 2025년02월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/435 (2006.01) A23K 20/147 (2016.01)
A23L 33/18 (2016.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/43563 (2013.01)
A23K 20/147 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2024-0064224
(22) 출원일자 2024년05월17일
심사청구일자 2024년05월17일
(30) 우선권주장
1020230103666 2023년08월08일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
대한민국(농촌진흥청장)
전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300 (중동)
(72) 발명자
오은영
경기도 광주시 삼지곡길 46 (삼동, 다원하우스)
김유경
서울특별시 송파구 올림픽로35길 104 (신천동, 장미아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인(유)남아이피그룹

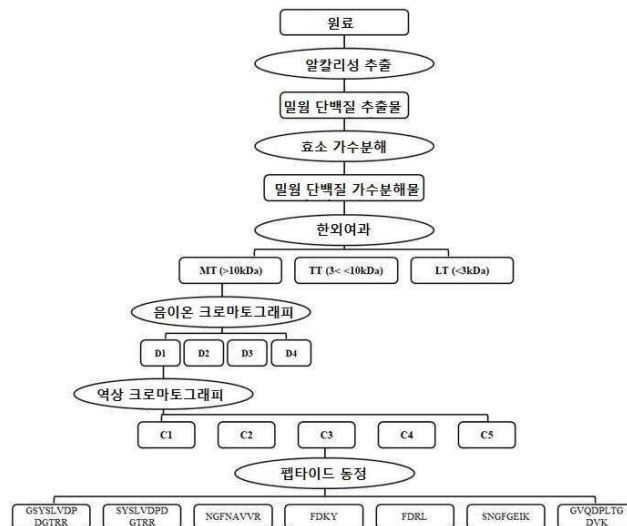
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 근육 감소 억제 효과를 갖는 갈색거저리 유충 단백 가수분해 펩타이드 조성물

(57) 요약

갈색거저리 유충 단백질 가수분해물 유래의 근육 감소 억제 활성을 갖는 펩타이드; 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 근육 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약제학적 조성물; 식품 조성물; 건강기능식품; 및 사료조성물에 관한 것이다. 본 발명의 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물로부터 분리된 분획물은 7개의 생리활성 펩타이드를 포함하고 있으며, 이러한 분획물은 마이오스타틴(Myostatin) 발현을 효과적으로 억제할 수 있는바, 이를 유효성분으로 포함하는 조성물은 근 기능 저하, 근육 감소, 근육 위축, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인하여 발생하는 다양한 근육 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로서 의약품, 식품 및 사료 산업에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A23L 33/18 (2016.08)

A61K 38/00 (2013.01)

A61P 21/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/316 (2013.01)

(72) 발명자

김현수

서울특별시 노원구 덕릉로86길 29-25 (중계동)

최라영

전라북도 전주시 완산구 척동7길 18-6 (효자동3가)

김인우

전라북도 완주군 이서면 이서로 90-11 (지엘하늘가 아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395074223

과제번호 PJ015912022022

부처명 농촌진흥청

과제관리(전문)기관명 농촌진흥청

연구사업명 농업정책지원기술개발사업

연구과제명 갈색거저리 및 쌍별귀뚜라미를 활용한 대체 단백질 소재의 물리 화학적 특성 및 기능성 구명(2공통)

과제수행기관명 고려대학교(서울)

연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열로 표시되는 근감소 억제 활성을 갖는 펩타이드.

청구항 2

서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 근육 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 근육 질환은 근 기능 저하, 근육 감소, 근육 위축, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환인 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증, 악액질(cachexia), 경직성 척추 증후군(rigid spinesyndrome), 근위축성 측삭경화증(루게릭병, amyotrophic lateral sclerosis), 샤르코-마리-투스병(Charcot-Marie-Tooth disease) 및 근감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 5

서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 근육 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 과자류, 면류, 떡류, 빵류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류 및 주류로 이루어진 군으로부터 선택되는 건강기능식품.

청구항 7

서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 근육 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 8

서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 근육 질환의 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물 유래의 근육 감소 억제 활성을 갖는 펩타이드; 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 근육 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약제학적 조성물; 식품 조성물; 건강기능식품; 및 사료조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 대한민국은 '22년 65세 이상 고령인구가 우리나라 인구의 17.5%로, 향후 계속 증가하여 '25년에는 20.6%로 초고령사회로 진입할 것으로 전망된다(2022년 고령자 통계, 통계청). 사람의 근육량은 나이가 들면서 감소하고(50~70세에 10~15% 정도, 그리고 70세~80세에서 30% 이상 감소), 이에 따라 근력과 근기능도 약화되는데, 이를 노인성 근감소증(sarcopenia)이라 한다. 노인성 근감소증은 활동장애와 보행장애를 유발하여 노인들의 독립적인 생활을 제한하는 주요 원인이 된다. 또한, 근감소증은 기초대사율을 저하시켜 인슐린 저항성을 높이고 2형 당뇨병 발생을 촉진하며, 고혈압 및 심혈관계 질환 발생위험을 3~5배 증가시킨다.
- [0003] 근감소증의 개념은 1989년 Irwin Rosenberg가 'sarcopenia'라는 용어를 도입하면서 시작된 것으로, 그리스어에서 기원을 보면 근육을 의미하는 “sarx”와 감소되어 있다는 뜻의 “penia”가 합성된 단어이다. 근감소증은 노화와 연관되어 근육량의 감소에 따른 근력의 저하를 의미한다. 여기에서 “근육(muscle)”이란 골격근(skeletal muscle)을 의미하고 평활근(smooth muscle)과는 관계가 없다. 즉, 근감소증은 주로 사지에 분포한 골격근의 감소(loss of skeletal muscle mass)를 의미하며, 악성종양의 말기 등에서 나타나는 현저한 근육 소실 상태인 악액질(cachexia), 독감 등 급성질환으로 인한 근육소모(muscle wasting), 혹은 근육자체의 질병(primary muscle disease)과는 구별되는 것으로, 순전히 노화와 연관되어 나타나는 점진적인 골격근 감소의 결과로 보아야 한다.
- [0004] 현재 근감소증 치료용도로 승인된 의약품은 전무한 실정이며, 마이오스타틴(myostatin) 억제물질 또는 기존 FDA 승인을 받은 타질환 치료제를 근감소증에 적용하는 약물재배치(drug repositioning) 기술이 개발 중에 있다.
- [0005] 마이오스타틴(myostatin)은 TGF- β 의 superfamily군에 속하는 폴리펩타이드(polypeptide) 성장인자이다. TGF- β 는 다량의 이소폼(isoform)을 가지고 있으며, 이는 세포의 증식(proliferation), 세포사멸(apoptosis), 분화, 뼈의 형성 및 유지에 관여하는 것으로 알려져 있다(Massague & Chen, 2000). 마이오스타틴은 그 중 성장분화인자(growth differentiation factor, GDF) 8번에 속하며, 조직의 성장 및 발달에 관여하고, Smad 신호 전달계를 활성화시켜 작용한다. 또한, p21 유전자에 의해 세포주기 및 전구세포의 증식을 억제하여 골 형성 및 재생에도 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다. 마이오스타틴은 주로 골격근세포에서 생성되어 자가분비 방식으로 근육 소실 및 근력감소를 야기하며, 근 비대에 관여하는 IGF-1이나 폴리스타틴(Follistatin)의 발현을 억제함으로써 근아세포(myoblast)에서의 단백질 합성 및 세포 증식을 억제한다는 것으로 알려져 있다.
- [0006] 종래 근감소증 치료를 위하여 마이오스타틴의 기능만을 억제하기 위한 항체가 제조된바 있으나 부작용이 보고되었으며, 천연물을 이용한 항마이오스타틴 소재에 대한 연구도 활발히 진행되고 있는 실정이다.
- [0007] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 근감소증을 효과적으로 치료할 수 있는 제제를 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물로부터 분리된 분획물이 마이오스타틴(Myostatin)의 발현을 효과적으로 억제시키고, 상기 분획물에 포함되어 있는 7개의 생리활성 펩타이드를 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2023-0036871호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 따라서 본 발명의 목적은 근육 감소를 효과적으로 억제할 수 있는 펩타이드를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은, 근육 질환을 효과적으로 예방 또는 개선할 수 있는 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은, 근육 질환을 효과적으로 예방 또는 개선할 수 있는 건강기능식품을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은, 근육 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 약제학적 조성물을 제공하는 것

이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은, 근육 질환을 효과적으로 예방 또는 개선할 수 있는 사료첨가제 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서,

[0015] 본 발명은 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열로 표시되는 근감소 억제 활성을 갖는 펩타이드를 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 근육 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 근육 질환은 근 기능 저하, 근육 감소, 근육 위축, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증, 악액질(cachexia), 경직성 척추 증후군(rigid spinesyndrome), 근위축성 측삭경화증(루게릭병, amyotrophic lateral sclerosis), 샤르코-마리-투스병(Charcot-Marie-Tooth disease) 및 근감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 과자류, 면류, 떡류, 빵류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류 및 주류로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물로부터 분리된 분획물은 7개의 생리활성 펩타이드를 포함하고 있으며, 이러한 분획물은 마이오스타틴(Myostatin) 발현을 효과적으로 억제할 수 있는바, 이를 유효성분으로 포함하는 조성물은 근 기능 저하, 근육 감소, 근육 위축, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인하여 발생하는 다양한 근육 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로서 의약품, 식품 및 사료 산업에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명에 따른 갈색거저리 유충 단백질(MPI) 및 이의 가수분해물(MPH)의 제조 공정도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 생리활성 펩타이드를 분리 및 동정하는 공정도를 나타낸 것이다.

도 3은 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 음이온 크로마토그래피 분획물 (D1-D4)의 용리 시간(elution time)을 나타낸 것이다.

도 4는 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 역상 크로마토그래피 분획물 (C1-C5)의 용리 시간(elution time)을 나타낸 것이다.

도 5a는 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 음이온 크로마토그래피 분획물별 (D1-D4) 세포독성을 평가한 것이다.

도 5b는 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 역상 크로마토그래피 분획물별 (C1-C5) 세포독성을 평가한 것이다.

도 6a는 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 음이온 크로마토그래피 분획물별 (D1-D4) 마이오스타틴 프로모터 루시퍼다아제 활성을 측정한 것이다.

도 6b는 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 음이온 크로마토그래피 분획물 중 D1 분획물의 시간 경과에 따른 마이오스타틴 프로모터 활성을 측정한 것이다.

도 6c는 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 음이온 크로마토그래피 분획물 중 D1 분획물의 처리 농도에 따른 마이오스타틴 프로모터 활성을 측정한 것이다.

도 6d는 MT 분획물 (MPH에서 분자량이 10 kDa 이상인 가수분해물)과 D1 분획물의 마이오스타틴 프로모터 활성을 측정한 것이다.

도 7a는 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 역상 크로마토그래피 분획물별 (C1-C5) 마이오스타틴 프로모터 루시퍼다아제 활성을 측정한 것이다.

도 7b는 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 역상 크로마토그래피 분획물 중 C3 분획물의 시간 경과에 따른 마이오스타틴 프로모터 활성을 측정한 것이다.

도 7c는 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 역상 크로마토그래피 분획물 중 C3 분획물의 처리 농도에 따른 마이오스타틴 프로모터 활성을 측정한 것이다.

도 7d는 D1 분획물과 C3 분획물의 마이오스타틴 프로모터 활성을 측정한 것이다.

도 8a는 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 음이온 크로마토그래피 분획물별 (D1-D4) 마이오스타틴의 상대적인 mRNA 발현 수준을 측정한 것이다.

도 8b는 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 음이온 크로마토그래피 분획물 중 D1 분획물의 시간 경과에 따른 마이오스타틴의 상대적인 mRNA 발현 수준을 측정한 것이다.

도 8c는 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 음이온 크로마토그래피 분획물 중 D1 분획물의 처리 농도에 따른 마이오스타틴의 상대적인 mRNA 발현 수준을 측정한 것이다.

도 8d는 MT 분획물 (MPH에서 분자량이 10 kDa 이상인 가수분해물)과 D1 분획물의 마이오스타틴의 상대적인 mRNA 발현 수준을 측정한 것이다.

도 9a는 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 역상 크로마토그래피 분획물별 (C1-C5) 마이오스타틴의 상대적인 mRNA 발현 수준을 측정한 것이다.

도 9b는 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 역상 크로마토그래피 분획물 중 C3 분획물의 시간 경과에 따른 마이오스타틴의 상대적인 mRNA 발현 수준을 측정한 것이다.

도 9c는 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 역상 크로마토그래피 분획물 중 C3 분획물의 처리 농도에 따른 마이오스타틴의 상대적인 mRNA 발현 수준을 측정한 것이다.

도 9d는 D1 분획물과 C3 분획물의 마이오스타틴의 상대적인 mRNA 발현 수준을 측정한 것이다.

도 10은 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 음이온 크로마토그래피 분획물의 마이오스타틴 단백질 발현량을 측정한 결과이다 ((a) D1-D4 분획물별, (b) D1 분획물의 처리 시간별, (c) MT 분획물 (MPH에서 분자량이 10 kDa 이상인 가수분해물)과 D1 분획물 비교).

도 11은 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 역상 크로마토그래피 분획물의 마이오스타틴 단백질 발현량을 측정한 결과이다 ((a) C1-C5 분획물별, (b) C3 분획물의 처리 시간별).

도 12는 본 발명의 7개의 펩타이드 후보군을 농도별 근육아세포주에 처리 후 세포 생존율을 측정한 결과이다.

도 13a는 본 발명의 7개의 펩타이드 후보군별 처리(10 μ g/ml)에 따른 상대적인 미오스타틴 프로모터 활성을 측정한 결과이다.

도 13b는 #4 펩타이드 후보군의 농도별 처리에 따른 상대적인 미오스타틴 프로모터 활성을 측정한 결과이다.

도 13c는 #5 펩타이드 후보군의 농도별 처리에 따른 상대적인 미오스타틴 프로모터 활성을 측정한 결과이다.

도 14는 근위축을 유도하기 위한 텍사메타손 및 본 발명의 7개의 펩타이드 후보군 각각을 동시 처리 후 세포 생존율을 MTS 에세이로 측정한 결과이다.

도 15는 본 발명의 7개의 펩타이드 후보군의 농도별 처리에 따른 근감소 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정한 결과

이다(15a: #1 펩타이드 후보군, 15b: #2 펩타이드 후보군, 15c: #3 펩타이드 후보군, 15d: #4 펩타이드 후보군, 15e: #5 펩타이드 후보군, 15f: #6 펩타이드 후보군, 15g: #7 펩타이드 후보군).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명은 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열로 표시되는 근감소 억제 활성을 갖는 펩타이드에 관한 것이다.
- [0026] 본 발명의 상기 펩타이드는 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 분획물로부터 유래한 펩타이드로 당업계에 알려진 통상의 펩타이드 합성 방법에 의해 제조가 가능하며, 제조 방법이 특별히 한정되지 않는다.
- [0027] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 근육 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"이란, 상기 조성물을 개체에 투여하여 근육 질환의 발병을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0029] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"란, 상기 조성물에 의해 근육 질환의 증세가 호전되거나 이렇게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0030] 본 발명에서 사용되는 용어 "갈색거저리 유충 단백질"은 갈색거저리의 유충으로부터 추출한 단백질을 의미한다.
- [0031] 상기 갈색거저리 유충 단백질은 a) 갈색거저리 유충 건조물을 분쇄하는 단계; b) 분쇄물에 에탄올을 첨가하여 탈지시키는 단계; c) 탈지된 갈색거저리 유충에 수산화나트륨을 첨가 혼합한 후 원심분리하여 침전물을 수득하는 단계; 및 d) 수득한 침전물을 탈염한 후 동결건조하는 단계를 포함하는 과정을 통해 제조될 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 사용되는 용어 "갈색거저리 유충 단백질 가수분해물"은 갈색거저리 유충 단백질에 가수분해효소를 처리한 후 가수분해시켜 제조되는 물질을 의미한다.
- [0033] 상기 가수분해물은 갈색거저리 유충 단백질에 가수분해효소로서 알칼라아제 및 플라보르자임 복합 효소를 처리하여 가수분해시켜 제조될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 가수분해물은 갈색거저리 유충 단백질을 기질로 하여 0.5%(w/v) 알칼라아제에 12시간 처리한 후 0.5%(w/v) 플라보르자임에 12시간 처리하여 수득한 가수분해물일 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 사용되는 용어 "갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 분획물"은 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물을 분자량별로 분획하고, 이후 음이온 크로마토그래피 및 역상 크로마토그래피를 순차적으로 가하여 수득되는 분획물을 의미한다.
- [0036] 본 발명의 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 분획물은 서열번호 1 내지 7로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 7종의 펩타이드를 포함하고 있으며, 상기 펩타이드를 포함하는 분획물은 마이오스타틴(Myostatin) 발현을 억제 시킴으로써 근육 질환을 예방하거나 또는 치료하는 효과를 나타낼 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 사용되는 용어 "마이오스타틴(Myostatin, MSTN)"은 근육성장을 조절하는 단백질로서 TGF- β (transforming growth factor- β) 계열에 속하고 성장분화 인자 (growth and differentiation factor-8, GDF-8)이다.
- [0038] 본 발명에서 사용되는 용어 "근육 질환"은 근 기능 저하, 근육 감소, 근육 위축, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인해 유발되는 질환을 의미한다.
- [0039] 본 발명에서 사용되는 용어 "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 기능"은 근육량에 비례하고, "근 기능 개선"은 근 기능을 더 좋게 향상시키는 것을 의미한다.
- [0040] 본 발명의 일구체예에서, 상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증, 악액질(cachexia), 경직성 척추 증후군(rigid spinesyndrome), 근위축성 측삭경화증(루게릭병, amyotrophic lateral sclerosis), 경직성 척추 증후군(rigid spinesyndrome), 샤르코-마

리-투스병(Charcot-Marie-Tooth disease) 및 근감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 근육 소모 또는 퇴화는 전적 요인, 후천적 요인, 노화 등을 원인으로 발생하며, 근육 소모는 근육량의 점진적 손실, 근육, 특히 골격근 또는 수의근 및 심장근육의 약화 및 퇴행을 특징으로 한다.

[0041] 본 발명의 조성물은 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물로서 이러한 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0042] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0043] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 상기 조성물을 제형화할 경우에는 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS), 항산화제, 정균제, 킬레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 충전제, 증량제, 결합제, 아쥘란트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제 습윤제, 붕해제 또는 계면활성제, 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0044] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 진분(옥수수 진분, 밀 진분, 쌀 진분, 감자 진분 등 포함), 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 텍스트로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 말티톨, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필 메틸-셀룰로오스 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 예컨대, 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다.

[0045] 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 또는 보존제 등이 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 붕해제로 첨가할 수 있으며, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0046] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제 또는 좌제 등이 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0047] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 피부외용; 복강내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사하는 주사제; 경피 투여제; 또는 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법에 따라 제형화할 수 있다.

[0048] 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 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 헵스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 텍스트로오스와 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.

[0049] 경피 투여제의 경우 연고제, 크림제, 로션제, 젼제, 외용액제, 파스타제, 리니먼트제, 에어로졸제 등의 형태가 포함된다. 상기에서 경피 투여는 약학 조성물을 국소적으로 피부에 투여하여 약학 조성물에 함유된 유효한 양의 활성성분이 피부 내로 전달되는 것을 의미한다.

[0050] 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 전달 할 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투약 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공하여 결정할 수 있다. 예를 들면, 흡입기 또는 취입기에 사용되는 젤라틴 캡

술 및 카트리지는 화합물, 및 락토즈 또는 전분과 같은 적합한 분말 기재의 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.

- [0051] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, “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, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 즉, 본 발명의 약학적 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. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다.
- [0054] 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 약학 조성물은 또한 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 외용제의 제형으로 제공할 수 있다. 본 발명의 근육 질환 예방 및 치료용 약학 조성물을 피부외용제로 사용하는 경우, 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산화제, 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.
- [0056] 본 발명의 근육 질환 예방 및 치료용 약학 조성물이 피부 외용제로 제공될 경우, 이에 제한되는 것은 아니나, 연고, 패취, 겔, 크림 또는 분무제 등의 제형일 수 있다.
- [0057] 또한, 본 발명은 근육 질환의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다. 상기한 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 근육 질환의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 용도로 이용될 수 있다.
- [0058] 또한, 본 발명은 포유동물에게 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 치료상 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 근육 질환의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.
- [0059] 본 발명에서 사용되는 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.
- [0060] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 의사, 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약제학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분과 관련된 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 치료방법에 있어서, 성인의 경우, 본 발명의 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 1일 1회 내지 수회 투여할 수 있으나, 특별히 그 용량을 한정하는 것은 아니다.

- [0061] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 약제학적 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0062] 본 발명에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드와 종래 알려진 근육 질환 치료제를 함께 제제화하거나 병용하여 사용할 수 있다.
- [0063] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 식품 조성물을 제공한다.
- [0064] 상기 식품 조성물은 유효성분인 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0065] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강 보조식품류 등이 있다.
- [0067] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분(서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드) 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0068] 이러한 본 발명의 유효성분(서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드)은 천연물로부터 유래된 소재로서 화학약품과 같은 부작용은 거의 없으므로 근육 질환의 개선을 위한 기능성 부어를 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- [0069] 즉, 본 발명의 식품 조성물은 근육 질환의 예방 또는 개선을 위한 기능성 식품 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [0070] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 근육 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0071] 본 발명의 건강기능식품은 근육 질환의 예방 또는 개선을 목적으로, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0072] 본 발명에서 “건강기능식품”이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0073] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0074] 상기 “식품 첨가물 공전”에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.
- [0075] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분(서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드)을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또

한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.

- [0076] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분(서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드)을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 본 발명의 유효성분(서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드)을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0077] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분(서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드)과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.
- [0078] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분(서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드)과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.
- [0079] 본 발명의 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 건강기능식품은 하기 실시예에서도 확인한 바와 같이 우수한 마이오스타틴(Myostatin) 발현을 억제 효과를 갖는바, 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증, 악액질(cachexia), 경직성 척추 증후군(rigid spinesyndrome), 근위축성 측삭경화증(루게릭병, amyotrophic lateral sclerosis), 샤르코-마리-투스병(Charcot-Marie-Tooth disease) 및 근감소증(sarcopenia) 등과 같은 근육 질환의 예방 또는 개선에 효과적이다.
- [0080] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.
- [0081] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 근육 질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다. 상기 화장료 조성물은 특히 제한되는 것은 아니나, 피부 외용으로 사용하거나, 경구 섭취할 수 있다.
- [0082] 본 발명의 화장료 조성물은 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 함유하며 피부학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 기초 화장품 조성물(화장수, 크림, 에센스, 클렌징폼 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.
- [0083] 상기 부형제로는 이에 한정되지는 않으나 예를 들어, 피부연화제, 피부 침투 증강제, 착색제, 방향제, 유화제, 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 상기 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 첨가하여 용이하게 제조할 수 있다. 크림을 제조하는 경우에는 일반적인 수중유적형(O/W)의 크림베이스에 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 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.
- [0084] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 근육 질환의 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물을 제공한다.
- [0085] 구체적으로 본 발명의 서열번호 1 내지 7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드는 골근력량의 증가 또는 근기능의 향상으로 인하여 전체적인 근력 증가 효과를 나타내므로 동물이나 가축의 성장 촉진제로서 사료첨가제에 포함될 수 있다.
- [0086] 본 발명에서 사용되는 용어 "사료첨가제"란 영양소 보충 및 체중감소 예방, 사료 내 섬유소의 소화 이용성 증진, 육질 개선, 번식장애 예방 및 수태율 향상, 하절기 고온 스트레스 예방 등 다양한 효과를 목적으로 사료에

첨가하는 물질을 말한다. 본 발명의 사료첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당하며, 탄산수소나트륨(중조), 벤토나이트(bentonite), 산화마그네슘, 복합광물질 등의 광물질제제, 아연, 구리, 코발트, 셀레늄 등의 미량 광물질인 미네랄제제, 케로틴, 비타민 E, 비타민 A, D, E, 니코틴산, 비타민 B 복합체 등의 비타민제, 메티오닌, 리이산 등의 보호아미노산제, 지방산 칼슘염 등의 보호지방산제, 생균제(유산균제), 효모배양물, 곰팡이 발효물 등의 생균, 효모제 등이 추가로 포함될 수 있다.

[0087] 본 발명에 따른 사료첨가제 조성물은 골격근량의 증가 또는 근기능의 향상, 골밀도 향상으로 인하여 전체적인 근육 증가 및 성장 촉진을 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 것이든 적용 가능하다. 상기 개체는 동물, 예를 들어 비-영장류(예를 들면, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트 및 마우스) 및 영장류(예를 들면, 원숭이, 예를 들어 사이노몰구스(cynomolgus) 원숭이 및 침팬지)를 비롯한 포유동물을 나타낸다. 또 다른 구체예에서, 상기 개체는 축산용 동물(예를 들면, 말, 소, 돼지 등) 또는 애완동물(예를 들면, 개 또는 고양이)이다.

[0089] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0091] <실시예 1>

[0092] 갈색거저리 유충 단백질 추출

[0093] 본 실험에서는 갈색거저리 유충 단백질을 추출하였다. 추출된 갈색거저리 유충 단백질(Mealworm Protein Isolate)은 'MPI' 라 약칭하였다.

[0095] <1-1> 갈색거저리 유충 원료

[0096] 갈색거저리 유충은 (주)이더블 버그(Edible bug Co., Seoul, Korea)에서 건조물로 구입하였고, 분쇄 후 1.4mm의 체를 이용하여 가루 형태로 제조, 4℃에서 냉장 저장하며 사용하였다.

[0098] <1-2> 갈색거저리 유충 탈지

[0099] 갈색거저리 유충의 탈지 공정을 거쳐 단백질 추출의 효율성을 높였다. 즉, 갈색거저리 유충에 99.5% 에탄올을 1:5 비율로 넣은 후, 40℃에서 60분 동안 shaking bath(VS-1205SW1, Vision Scientific Co., Ltd, Daejeon, Korea)에서 추출하였다. 이 과정을 2번 반복한 후 12시간 동안 에탄올을 휘발·건조하였다.

[0101] <1-3> 갈색거저리 유충 단백질 추출 공정

[0102] 탈지된 갈색거저리 유충에 0.25M NaOH을 1:15의 비율로 넣은 후, 40℃에서 60분 동안 hot plate & magnetic stirrer(Vision Science Co., Korea)를 이용하여 혼합하였다. 이후 원심분리기(VS-24SMTi, Vision Science Co., Ltd, Korea)를 이용하여 4℃에서 4200 rpm으로 15분 동안 원심분리 후, 상층액을 모아 pH를 4.5로 조정하였다. 이후 4℃에서 4200 rpm으로 15분 동안 원심분리하여 침전물을 수득하였다.

[0104] <1-4> 침전물 투석 및 동결건조

[0105] 상기 실시예 <1-3>을 통해 수득한 침전물은 투석백(12KDa MWC0; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 넣어 12시간 동안 탈염하였다. 이후 36시간 동안 동결건조하여, 최종적인 본 발명의 갈색거저리 유충 단백질(Mealworm Protein Isolate, MPI)을 수득하였다.

[0107] <실시예 2>

[0108] 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물

[0109] 본 실험에서는 단백질 가수분해효소를 이용하여 갈색거저리 유충 단백질의 가수분해물을 제조하였다. 상기 갈색거저리 유충 단백질의 가수분해물(Mealworm Protein Hydrolysate)은 ‘MPH’ 라 약칭하였다.

[0111] <2-1> 원료 갈색거저리 유충 단백질

[0112] 상기 <실시예 1>을 통해 제조된 갈색거저리 유충 단백질(MPI)을 원료로 사용하였다.

[0114] <2-2> 갈색거저리 유충 단백질 가수분해 조건 설정

[0115] 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 최적 제조 조건 확립을 위해 기질 농도, 효소 농도, pH, 반응 온도, 반응 시간의 조건을 기존 선행 연구를 참고하여 다음과 같이 설정하였다. 기질 농도 (1%(w/v)), 효소 농도 (기질 무게의 0.5% (w/w) 알칼라아제를 첨가하여 12시간 처리한 후, 기질 무게의 0.5% (w/w) 플라보르자임을 12시간 처리), pH (8), 반응 온도 (55℃), 반응 시간 (24시간).

[0117] <2-3> 갈색거저리 유충 단백질 자가 효소 불활성

[0118] 설정한 기질농도 조건에 맞게 단백질 파우더를 pH 8 버퍼에 분산시키고 water bath에서 85℃, 20분 동안 자가 효소를 불활성화하였다.

[0120] <2-4> 갈색거저리 유충 단백질 가수분해 pH 환경 조성

[0121] 자가 효소를 불활성화 한 단백질 용액을 각각의 조건에 맞는 반응온도에 맞춰 놓은 다른 water bath에 옮겨 냉각시키고 1N NaOH를 이용하여 설정한 pH로 조정하였다.

[0123] <2-5> 갈색거저리 유충 단백질의 가수분해물 수득

[0124] 기질 무게의 0.5%에 해당하는 알칼라아제를 투여한 후 pH 8을 유지하며 12시간 동안 가수분해를 실시하였다. 이후 기질 무게의 0.5%에 해당하는 플라보르자임을 투여한 후 pH 8을 유지하며 12시간 동안 가수분해를 실시하였다. 반응 종료 후 효소 불활성화를 위해 가열하고 (100℃, 10분), 냉각한 뒤 원심분리하여 상층액만 채취한 뒤 냉장보관하였다.

[0126] <실시예 3>

[0127] 갈색거저리 유충 유래 분획물 분리 및 정제

[0129] <3-1> 분자량별 분획물 수득

[0130] 상기 <실시예 2>에서 수득한 가수분해물을 PierceTM Protein Concentrator PES, 10K MWCO (Thermo ScientificTM, MA, USA)를 사용하여 4200 x g에서 25분간 원심분리하였다. 분리되지 않은 층은 분자량이 10kDa 보다 큰 가수분해물인 ‘MT’ 을 수득하였다. 분리된 층은 다시 PierceTM Protein Concentrator PES, 3K MWCO (Thermo ScientificTM, MA, USA)으로 원심분리(4200 x g, 25분)하여 분자량이 3kDa 보다 크고 10 kDa 보다 작은 가수분해물 ‘TT’ 및 3kDa 보다 작은 가수분해물 ‘LT’ 를 수득하였다.

[0131] - LT: MPH에서 분자량이 3 kDa 이하인 가수분해물

[0132] - TT: MPH에서 분자량이 3~10 kDa인 가수분해물

[0133] - MT: MPH에서 분자량이 10 kDa 이상인 가수분해물

[0135] <3-2> 음이온 크로마토그래피 분획물 수득

[0136] 상기 실시예 <3-1>에서 수득한 분획물 'MT'의 동결건조 분말을 start buffer (20mM Tris-HCl, pH 8.0)에 12mg/ml의 농도로 녹여 FPLC (Akta Go, Cytiva, Marlborough, MA, USA) 기기에 500 μ L 주입한 뒤 (loop injection), capto DEAE 컬럼 (1mL Hitrap Capto DEAE, Cytiva)을 이용하여 음이온크로마토그래피를 시행하였다. 컬럼에 시료 주입 후 2 CV (column volume)로 컬럼에 결합되지 않은 시료를 씻어내고, 0-100% elution buffer (20mM Tris-HCl, 1M NaCl, pH 8.0) gradient가 되도록 이동상 20 CV를 흘려보내며 fraction collector (F9-R, Cytiva)를 이용하여 분획물 (D1-D4)을 수득하였다. 각 분획물의 머무름 시간 (retention time (min); RT)은 D1 (2.5 min), D2 (8 min), D3 (13.5 min), D4 (20.5 min)로 나타났다 (도 3 참조).

[0138] <3-3> 역상 크로마토그래피 분획물 수득

[0139] 상기 실시예 <3-2>에서 수득한 분획물 'D1'의 동결건조 분말을 증류수 (DW, HPLC grade)에 30mg/ml의 농도로 녹여 HPLC (YL 9100, YL instruments, Anyang, Korea) 기기에 50 μ L 주입한 뒤, C18 컬럼 (YMC Titrade C18, 250x4.6mm, 5.5 μ m, YMC, Kyoto, Japan)을 이용하여 역상크로마토그래피를 시행하였다. 유속 1 mL/min, 흡광도 215 nm에서 이동상 A (0.1% 트리플루오로아세트산 함유 아세토니트릴 용액)와 이동상 B (0.1% 트리플루오로아세트산 함유 증류수)를 이용하였으며, 기울기 조건은 하기 표 1에서 나타내었다. 분획물 (C1-C5)은 fraction collector (Foxy R1, Teledyne ISCO, Lincoln, NE, USA)을 이용하여 수득하였다. 각 분획물의 머무름 시간 (retention time (min); RT)은 C1 (0 min), C2 (10 min), C3 (20 min), C4 (30 min), C5 (40 min)로 나타났다 (도 4 참조).

표 1

[0141] 기울기 조건

Time (min)	A (%)	B (%)
initial	0	100
5	0	100
40	45	55
45	45	55
55	0	100

[0143] <실험예 1>

[0144] 갈색거저리 유충 유래 분획물의 마이오스타틴 발현에 미치는 영향

[0146] <1-1> 세포독성 평가(MTT Assay)

[0147] 마이오스타틴(Myostatin)의 발현 정도를 측정하기 위해 시료의 독성을 측정하기 위해 MTT 실험을 실시하였다.

[0148] 10% FBS (Fetal bovine serum), 1% 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함한 DMEM 배지에 근육아세포주인 C2C12 마우스 정상 세포를 37℃에서 24시간 배양 (세포 밀도: 8×10^3 /well) 후 배지를 제거하고, 시료를 농도별 (1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1 μ g/ml)로 포함한 배지 100 μ L로 교체하였다. 37℃에서 24시간 배양 후 MTT 시약 (2mg/mL)을 웰 (well)당 10 μ L씩 분주한 뒤 37℃에서 2시간 배양한 다음 배지를 모두 제거하였다. 50 μ L의 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 분주한 뒤 microplate spectrophotometer (Epoch, Biotek industries, Highland, USA)를 이용하여 595nm에서 O.D (optical density)를 측정하였다. 세포생존률은 대조군 (시료 무처리)의 O.D값으로 정규화하여 나타내었다.

- [0149] 그 결과 도 5에서 나타난 바와 같이, 분획물 D1 내지 D4는 1 μ g/ml까지 세포 생존율의 유의한 변화가 없었고, 분획물 C1, C3, C4의 경우 1 μ g/ml에서 세포 생존율의 유의한 변화가 관찰되었다. 전반적으로 모든 분획물에서 1 μ g/ml 농도까지 80% 이상의 세포 생존율을 보여주었다.
- [0151] <1-2> 상대적인 마이오스타틴 프로모터 활성 측정
- [0152] 자세하게는, pGL4.15 vector에 MSTN(Myostatin) promoter (-534 ~ +132, 667 bp)를 XhoI과 BglII를 이용하여 삽입시켰다. 12 웰 (well)에 C2C12 세포를 배양 (세포 밀도: 4 $\times$ 10⁵/well)한 후 24시간 후에 PBS를 이용 세포를 세척한 후 Opti-MEM media 900 μ l를 넣어주었다. 이후 Opti-MEM media 100 μ l에 pGL4.15-MSTN promoter (1 μ g, firefly luc)와 pRL-TK (200ng, renilla luc)를 Lipofectamine 2000 (2 μ l, Invitrogen)과 함께 동시에 섞어주었고, 세포에 100 μ l씩 넣어 동시형질주입(co-transfection)시킨다. 이때 pGL4.15 공백터는 음성 대조군으로 사용하였다. 4시간 후 10% FBS (Fetal bovine serum), 1% 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함한 DMEM 배지로 갈아주었고, 24시간 배양하였다.
- [0153] 이후 a) 동일 단계 분획물별, b) 최적 분획물의 시간별, c) 농도별, d) 상위 단계 분획물과의 비교를 위한 프로모터 활성도 측정 방법은 아래와 같다.
- [0154] a) 시료 (D1-4, C1-5)를 100ng/ml의 농도로 포함한 배지 500 μ L로 교체한 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 배양하였다.
- [0155] b) 최적 활성 분획물 (D1, C3)을 100ng/ml의 농도로 포함한 배지 500 μ L로 교체한 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 1시간, 3시간, 6시간, 12시간, 24시간 동안 배양하였다.
- [0156] c) D1의 경우 10ng/ml, 30ng/ml, 100ng/ml, 300ng/ml, 1 μ g/ml 의 농도로 포함한 배지 500 μ L로 교체하였고, C3의 경우 50ng/ml, 100ng/ml, 200ng/ml의 농도로 포함한 배지 500 μ L로 교체한 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 배양하였다.
- [0157] d) MT와 D1, D1과 C3을 각각 100ng/ml의 농도로 포함한 배지 500 μ L로 교체한 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 배양하였다.
- [0158] 이후 용해 버퍼를 이용하여 세포를 용해시킨 후 상등액 20 μ L와 루시페린 용액 50 μ L를 반응시켜 microplate reader (Synergy H1, Biotek)을 이용하여 형광 정도를 측정하였고, 각 상등액의 단백질 함량을 bradford assay를 통하여 측정하였다. 단백질 함량에 따라 형광값을 보정하고 프로모터 활성도는 대조군 (시료 무처리)의 형광값으로 정규화하여 나타내었다.
- [0159] 그 결과, D1 분획물에서 마이오스타틴 프로모터 활성이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며 (표 2 및 도 6a 참조), D1 분획물의 처리 후 3시간이 경과한 시점에 가장 낮은 활성을 보였고 (표 3 및 도 6b 참조), D1 분획물의 처리 농도에 의존적으로 활성이 감소되는 것으로 나타났다 (표 4 및 도 6c 참조). 한편, D1 분획물의 경우 MT 분획물과 비교하였을 때 유의하게 낮은 활성도를 보여주었다 (표 5 및 도 6d 참조).
- [0160] 또한, C3 분획물에서 마이오스타틴 프로모터 활성이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며 (표 6 및 도 7a 참조), C3 분획물의 처리 후 3시간이 경과한 시점에 가장 낮은 활성을 보였고 (표 7 및 도 7b 참조), 200ng/ml 처리 농도에 유의적으로 활성이 감소되는 것으로 나타났다 (표 8 및 도 7c 참조). 한편, C3 분획물의 경우 D1 분획물과 비교하였을 때 유의하게 낮은 활성도를 보여주었다 (표 9 및 도 7d 참조).

표 2

[0162] 음이온 크로마토그래피 분획물별 (D1-D4) 마이오스타틴 프로모터 활성

	대조군	D1	D2	D3	D4
평균	100.00	82.82	90.67	89.18	107.93
표준편차	2.29	1.96	6.67	7.28	12.16

[0163]

표 3

[0164]

D1 분획물의 시간 경과에 따른 마이오스타틴 프로모터 활성

	대조군	1h	3h	6h	12h	24h
평균	100.00	102.64	83.57	88.15	88.50	101.79
표준편차	6.44	9.83	6.80	11.91	7.77	12.68

표 4

[0166]

D1 분획물의 처리 농도에 따른 마이오스타틴 프로모터 활성

	대조군	10ng/ml	30ng/ml	100ng/ml	300ng/ml	1ug/ml
평균	100.00	100.47	89.05	90.33	85.84	84.88
표준편차	3.81	10.54	7.61	4.58	7.00	6.68

표 5

[0168]

MT 분획물과 D1 분획물의 마이오스타틴 프로모터 활성

	대조군	MT	D1
평균	100.00	86.27	68.27
표준편차	4.68	6.69	6.87

표 6

[0170]

역상 크로마토그래피 분획물별 (C1-C5) 마이오스타틴 프로모터 활성

	대조군	C1	C2	C3	C4	C5
평균	100.00	95.61	97.39	72.32	99.91	97.61
표준편차	1.95	5.03	17.07	3.14	16.43	10.02

표 7

[0172]

C3 분획물의 시간 경과에 따른 마이오스타틴 프로모터 활성

	대조군	1h	3h	6h	12h	24h
평균	100.00	95.13	82.73	100.75	86.83	102.63
표준편차	5.62	6.54	12.80	13.70	6.45	12.73

표 8

[0174]

C3 분획물의 처리 농도에 따른 마이오스타틴 프로모터 활성

	대조군	50ng/ml	100ng/ml	200ng/ml
평균	100.00	102.83	99.26	81.62
표준편차	6.73	5.63	8.07	5.19

표 9

[0176]

D1 분획물과 C3 분획물의 마이오스타틴 프로모터 활성

	대조군	D1	C3
평균	100.00	79.94	64.62
표준편차	7.03	9.41	8.31

[0178]

<1-3> 마이오스타틴의 상대적인 mRNA 발현 수준 측정

[0179]

갈색거저리 유충 유래 분획물의 근감소증 예방 및 개선 효과를 확인하기 위해 마이오스타틴의 mRNA 발현량을 측정하였다. C2C12 세포를 10% FBS (fetal bovine serum), 1% 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함한 DMEM 배지를 이용하여 6 웰(well)에 배양 (37℃, 24h, 세포 밀도: 1×10^6 /well)하고 배지를 제거하였다. 이후 PBS 용액으로 세척하고 2% 말 혈청, 1% 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함한 DMEM 배지로 교체 (Day 0)한 후, 근관세포 (myotube)로의 분화를 유도하였다. 이후 a) 동일 단계 분획물별, b) 최적 분획물의 시간별, c) 농도별, d) 상위 단계 분획물과의 비교를 위한 mRNA 발현량 측정 방법은 아래와 같다.

[0180]

a) 시료 (D1-4, C1-5)를 100ng/ml의 농도로 포함한 배지 1 mL로 교체한 뒤 37℃에서 24시간 (D1-4) 혹은 12시간 (C1-5) 배양하였다.

[0181]

b) 최적 활성 분획물 (D1, C3)을 100ng/ml의 농도로 포함한 배지 1 mL로 교체한 뒤 37℃에서 6시간, 12시간, 24시간 동안 배양하였다.

[0182]

c) 분획물 D1의 경우 100ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml, 1μg/ml 의 농도로 포함한 배지 1 mL로 교체한 뒤, 37℃에서 24시간 동안 배양하였고, 분획물 C3의 경우 25ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml, 200ng/ml의 농도로 포함한 배지 1 mL로 교체한 뒤 37℃에서 12시간 동안 배양하였다.

[0183]

d) 분획물 MT와 D1, D1과 C3을 각각 100ng/ml, 50ng/ml의 농도로 포함한 배지 1 mL로 교체한 뒤 37℃에서 24시간 (MT와 D1), 혹은 12시간 (D1과 C3) 동안 배양하였다.

[0184]

배양 6일차에 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 웰(well)에 트리졸 200 μL을 주입하여 상온에서 5분간 방치 후 클로로포름 40 μL을 첨가하고 혼합하였다. 이후 13,200 rpm, 4℃에서 15분간 원심분리 후, 상층액에 이소프로판올 120 μL를 혼합하여 상온에서 10분간 방치하였다. 10분 후 13,200 rpm, 4℃에서 15분간 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤 70% 에탄올 500 μL 주입 후, 13,200 rpm, 4℃에서 15분간 원심분리를 진행하였다. 이후 70% 에탄올 제거 및 DEPC (Diethyl pyrocarbonate) water 주입 후 65℃에서 5분간 RNA 펠렛을 녹였다. Microplate reader (Epoch, BioTek)를 이용, RNA의 농도를 측정하였다. 2 μg의 RNA를 정량한 뒤 총 부피가 10 μL가 되도록 DEPC water를 주입하였다. 이에 TOPreal™ qPCR 2X PreMIX (SYBR Green with high ROX) 10 μL을 주입한 뒤 cDNA를 합성한다. cDNA 20 μL에 pure water 80 μL 주입하여 5배 희석한 뒤, PCR 플레이트에 2 μL를 분주하였다. 이에 2X mastermix 5 μL, pure water 2.5 μL, primer 0.5 μL를 주입하였다. 이를 밀봉하여 Real-Time PCR(Applied Biosystems, Quantstudio3)기기를 이용, 증폭되는 DNA를 검출하였다.

[0185]

그 결과, D1 분획물을 처리한 경우 마이오스타틴 mRNA 발현량이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며 (표 10 및 도 8a 참조), 시간 및 농도 의존적으로 활성이 감소하는 것으로 나타났다 (표 11-12 및 도 8b-8c 참조). 한편, D1 분획물의 경우 MT 분획물과 비교하였을 때 유의하게 낮은 발현량을 보여주었다 (표 13 및 도 8d 참조).

[0186]

또한, C3 분획물을 처리한 경우 마이오스타틴 mRNA 발현량이 두드러지게 낮은 것을 확인하였으며 (표 14 및 도 9a 참조), C3 분획물의 처리 후 12시간이 경과한 시점에 가장 낮은 mRNA 발현량을 보였고 (표 15 및 도 9b 참조), 처리 농도는 50 ~ 200ng/ml 범위에서 유의적으로 낮은 mRNA 발현량을 보여주었다 (표 16 및 도 9c 참조). 한편, C3 분획물의 경우 D1 분획물과 비교하였을 때 두드러지게 낮은 발현량 보였다 (표 17 및 도 9d 참조).

표 10

[0188]

음이온 크로마토그래피 분획물별 (D1-D4) 마이오스타틴의 mRNA 발현 수준

	대조군	D1	D2	D3	D4
평균	1.01	0.67	0.92	0.93	0.78
표준편차	0.07	0.05	0.01	0.01	0.06

[0189]

표 11

[0190]

D1 분획물의 시간 경과에 따른 마이오스타틴의 mRNA 발현 수준

	대조군	6h	12h	24h
평균	1.00	0.81	0.65	0.39
표준편차	0.07	0.12	0.01	0.05

표 12

[0192]

D1 분획물의 처리 농도에 따른 마이오스타틴의 mRNA 발현 수준

	대조군	100ng/ml	250ng/ml	500ng/ml	1ug/ml
평균	1.01	0.77	0.78	0.53	0.22
표준편차	0.12	0.03	0.07	0.06	0.05

표 13

[0194]

MT 분획물과 D1 분획물의 마이오스타틴의 mRNA 발현 수준

	대조군	MT	D1
평균	1.01	0.76	0.51
표준편차	0.12	0.04	0.03

표 14

[0196]

역상 크로마토그래피 분획물별 (C1-C5) 마이오스타틴의 mRNA 발현 수준

	대조군	C1	C2	C3	C4	C5
평균	1.00	0.66	0.52	0.36	1.05	1.08
표준편차	0.11	0.01	0.07	0.06	0.15	0.21

표 15

[0198]

C3 분획물의 시간 경과에 따른 마이오스타틴의 mRNA 발현 수준

	대조군	6h	12h	24h
평균	1.09	0.72	0.43	1.09
표준편차	0.13	0.05	0.15	0.19

표 16

C3 분획물의 처리 농도에 따른 마이오스타틴의 mRNA 발현 수준

	대조군	10ng/ml	30ng/ml	100ng/ml	300ng/ml
평균	1.00	1.03	0.74	0.59	0.11
표준편차	0.08	0.05	0.07	0.02	0.01

표 17

D1 분획물과 C3 분획물의 마이오스타틴의 mRNA 발현 수준

	대조군	D1	C3
평균	1.01	0.77	0.20
표준편차	0.16	0.37	0.05

[0204] <1-4> 마이오스타틴의 상대적인 단백질 발현 수준 측정

[0205] 갈색거저리 유충 유래 분획물의 근감소증 예방 및 개선 효과를 확인하기 위해 마이오스타틴의 단백질 발현량을 측정하였다. C2C12 세포를 10% FBS (fetal bovine serum), 1% 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함한 DMEM 배지를 이용하여 6 웰(well)에 배양 (37℃, 24h, 세포 밀도: 1×10^6 /well) 하고 배지를 제거하였다. 이후 PBS 용액으로 세척하고 2% 말 혈청, 1% 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함한 DMEM 배지로 교체 (Day 0)한 후, 근관세포(myotube)로의 분화를 유도하였다. 이후 a) 동일 단계 분획물별, b) 최적 분획물의 시간별, c) 상위 단계 분획물과의 비교를 위한 단백질 발현량 측정 방법은 아래와 같다.

[0206] a) 시료 (D1-4, C1-5)를 50ng/ml의 농도로 포함한 배지 1 mL로 교체한 뒤 37℃에서 48시간 (D1-4) 혹은 12시간 (C1-5) 배양하였다.

[0207] b) 최적 활성 분획물 (D1, C3)을 50ng/ml의 농도로 포함한 배지 1 mL로 교체한 뒤 37℃에서 12시간, 24시간, 48시간 동안 배양하였다.

[0208] c) 분획물 MT와 D1, 50ng/ml의 농도로 포함한 배지 1 mL로 교체한 뒤 37℃에서 48시간 동안 배양하였다.

[0209] 배양 6일차에 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 웰(well)에 프로테아제 및 인산가수분해효소 억제제(phosphatase inhibitor)를 포함한 용해 버퍼 80 μ L 주입 후 세포를 용해시켰다 (4℃, 15min). 이후 세포를 스크래핑(scraping)하여 마이크로튜브(microtube)에 담고, 초음파 처리를 통해 세포벽과 세포막을 파쇄하였다. 이후 13,200 rpm, 4℃에서 20분간 원심분리 후, 상등액을 10배 희석하여 bradford assay로 단백질 농도를 측정하였다. 30 μ g의 단백질 함량을 가지도록 세포 상등액을 정량한 뒤, 6x reducing buffer를 주입하여 가열하였다 (95℃, 5min). 전기영동 탱크에 1x running buffer를 붓고, 12% gel을 이용하여 전기영동 (80V, 3h)하였다. 전기영동된 gel은 탱크에서 1x transfer buffer를 붓고 PVDF 멤브레인 (0.45 μ m)으로 이동시켰다 (250mA, 1h). 이후 멤브레인은 1x ponceau 용액으로 단백질 염색한 뒤, 1X TBST 용액으로 세척하였다. 5% 스킴 밀트(skim milk)를 이용하여 블로킹 (RT, 1h)한 뒤, 1차 항체 (myostatin: GTX32624, GENETEX; β -actin: mAb #3700, Cell signalling)를 5% BSA (bovine serum albumin)를 포함하는 1X TBST 용액과 1:3,000 비율로 혼합하여 항원-항체 반응시켰다 (4℃, overnight). 이후 1X TBST로 3회 세척 (각 10분)한 뒤, 2차 항체 (myostatin: rabbit; β -actin: mouse)를 5% 스킴 밀트(skim milk)와 1:5,000 비율로 혼합하여 반응시켰다. 이후 1X TBST로 3회 세척 (각 10분)한 뒤, ECL solution (Thermo Fisher Scientific) A와 B를 1:1 혼합하여 멤브레인에 분주한 뒤 ChemiDoc imager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 밴드를 검출하였다. β -actin 밴드의 면적으로 정규화하여 발현량을 비교하였다.

[0210] 그 결과 도 10에서 나타난 바와 같이, D1 분획물을 처리한 경우 마이오스타틴 단백질 발현량이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며, 이는 48시간에서 가장 낮은 발현량을 보여주었다. 한편, D1 분획물의 경우 MT 분획물과 비교하였을 때에도 유의하게 낮은 발현량을 보여주었다.

[0211] 또한, 도 11에서 나타낸 바와 같이, C3 분획물을 처리한 경우 마이오스타틴 단백질 발현량이 유의적으로 감소하였고, 이는 12시간에서 유의하게 낮은 발현량을 보여주었다.

[0213] <실시예 4>

[0214] 생리활성 펩타이드의 규명

[0215] 본 발명의 분획물 'C3' 을 증류수(Distilled water, DW)로 평형화된 C18 카트리지 (HyperSep C18 Catridge, Thermo Fisher Scientific) 를 이용하여 탈염한 뒤, 80% 아세토니크릴 (20% DW)로 결합된 펩타이드를 용출시켰다. 용출된 시료는 speedvac (Savant, Farmingdale, NY, USA)을 이용하여 건조시킨 후 이동상에 녹여 샘플로 사용하였다. 샘플 8 µL를 Thermo(Dionex) UHPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific)에 주입한 뒤, 질량은 Q-TOF spectrometer (AB sciex Triple TOF 5600+; AB SCIEX, Framingham, MA, USA)를 결합하여 분석하였다 (mass range; start: 300m/z, end: 2500m/z). 컬럼은 Acquity UPLC BEH C18 (1.7 µm, Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였고, 유속 300 µL/min에서 이동상 A (0.1% 포름산을 포함하는 증류수)와 이동상 B (0.1% 포름산을 포함하는 아세토니트릴)을 이용하였다. 기울기 조건과 질량분석기의 파라미터 값은 각각 표 18 및 표 19와 같다. 결과는 ProteinPilot™ 와 PeakView software (AB SCIEX)로 분석하였으며, NCBI에서 제공하는 protein database을 사용하여 펩타이드 서열을 규명하였다.

표 18

기울기 조건

Time (min)	A (%)	B (%)
initial	99	1
5	99	1
95	50	50
100	0	100
105	0	100
106	99	1
120	99	1

표 19

파라미터 값

Experiment parameters		Mass range parameters	
parameter	value	parameter	value
CUR	25	CE	44
		CES	0
GS1	50	DP	80
		IDIx	5
GS2	50	IRD	66.633
		IRW	24.917
ISVF	5500	IRWx	10000
		IWIx	0
TEM	500	IWUx	5
		XA1	70.64

CUR: Curtain gas (이온화 영역과 질량 분석 영역을 분리하는 역할)
 GS1: Source gas 1 (CUR 이후에 생성된 이온들의 분석을 위해 필요한 선택적 이온화를 수행)
 GS2: Source gas 2 (CUR과 GS1을 통해 생성된 이온들 중에서 선택적으로 분해하여 정보를 얻도록 함)
 ISVF: IonSpray Voltage Floating (Ionization Source에서 사용되는 전압이며, 이를 "Floating" 상태로 조절)
 TEM: Temperature (실험 온도)
 CE: Collision energy (충돌에너지, 질량분석기 내에서 이온들을 분해하기 위해 사용되는 에너지)
 CES: Collision energy spread (충돌에너지 분포도, 충돌에너지 분포가 큰 경우, 이온들이 다양한 에너지를 받게 되어 조각화 과정에서 얻는 이온들의 상대적 풍부도가 다를 수 있음)
 DP: Declustering Potential (클러스터링 억제 전위, 이온화된 이온들을 물리적으로 가속시키기 위해 사용되는 전압)
 IRD: Ion release delay (분석기의 분해능(resolution) 설정값)
 IRW: Ion release width (스펙트럼 피크의 너비(width)를 설정하는 데 사용)

[0221] 그 결과 TIC (total ion current) data (blue: MS, red: MS2 detected), BPC (baseline peak chromatogram) data 상에서 다양한 RT (retention time)에서 ion peak 검출이 확인되었고, 하기 표 20에서 나타난 바와 같이 7개의 펩타이드 후보군을 특정하였다.

표 20

[0223] 7개의 펩타이드 후보군

No.	펩타이드 서열	서열번호
1	GSYSLVDPDGTRR	1
2	SYSLVDPDGTRR	2
3	NGFNAVVR	3
4	FDKY	4
5	FDRL	5
6	SNGFGEIK	6
7	GVQDPLTGDVK	7

[0225] <실험예 2>

[0226] 펩타이드 후보군 처리 후 세포 생존율 측정 (MTT assay)

[0227] 본 발명의 7개의 펩타이드 후보군의 세포 독성을 확인하기 위하여, 각 후보군 펩타이드 처리 후 세포 생존율을 MTT 에세이를 통해 분석하였다.

[0228] 자세하게는, 10% FBS (Fetal bovine serum), 1% 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함한 DMEM 배지에 근육아세포주인 C2C12 마우스 정상 세포를 37℃에서 24시간 배양 (density: 8×10^3 /well) 후 배지를 제거하고, 시료를 농도별로 포함한 배지 100 μ L로 교체하였다 (시료의 펩타이드 농도: 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL). 37℃에서 24시간 배양 후 MTT 시약 (2 mg/mL)을 웰 (well)당 10 μ L씩 분주한 뒤 37℃에서 2시간 배양하고, 배지를 모두 제거하였다. 50 μ L의 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 분주한 뒤 microplate spectrophotometer (Epoch, Biotek industries, Highland, USA)를 이용하여 595nm에서 O.D (optical density)를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군 (시료 무처리)의 O.D값으로 정규화하여 나타냈다.

[0229] 그 결과 도 12에서 나타난 바와 같이, #4 후보군을 제외한 모든 펩타이드 후보군에서 100 μ g/mL의 농도부터 대조군 대비 세포 생존율의 유의적 감소가 일어났다. 이에, 10 μ g/mL의 농도로 Luciferase assay를 시행하였다.

[0231] <실험예 3>

[0232] **펩타이드 후보군 처리에 따른 상대적인 미오스타틴 프로모터 활성 측정**

[0233] 본 발명의 7개의 펩타이드 후보군의 미오스타틴 프로모터 활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여, Relative myostatin promoter activity를 luciferase 벡터 인자에 클로닝된 마이오스타틴의 프로모터 영역이 전사되는 정도로 측정하였다. 상기 실험에 <1-2>과 같이 형질 전환된 플라스미드가 주입된 C2C12 세포를 10% FBS (Fetal bovine serum), 1% 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함한 DMEM 배지를 이용하여 12 웰(well)에 배양 (37℃, 24h, 5% CO₂, 세포 밀도: 1×10⁵/well) 하고 배지를 제거하였다. 이후 본 발명의 7개의 펩타이드 후보군 및 이들 후보군의 농도별 처리에 따른 비교를 위한 프로모터 활성도를 아래 방법으로 측정하였다.

[0234] 먼저, 시료 (#1-#7 펩타이드)를 10 µg/ml의 농도로 포함한 배지 500 µL로 교체한 뒤 37℃에서 24시간 배양하였다. 또한, 효과가 우수한 시료 #4 및 #5 펩타이드의 최적 활성 농도를 확인하기 위하여, 이들 후보군을 1, 3, 10, 30, 100 µg/ml의 농도로 포함한 배지 500 µL로 교체한 뒤 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 용해 버퍼를 이용하여 세포를 용해시킨 후 상등액 20 µL와 루시페린(luciferin) 용액 50 µL을 반응시켜 microplate reader (Synergy H1, Biotek)을 이용하여 형광 정도를 측정하였고, 각 상등액의 단백질을 bradford assay를 통하여 측정하였다. 단백질 함량에 따라 형광값을 보정하고 프로모터 활성도는 대조군 (CON, 시료 무처리)의 형광값으로 정규화하여 나타냈다.

[0235] 그 결과는 도 13 및 표 21 ~ 23에서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 7개의 펩타이드 후보군 중 #4 및 #5 펩타이드 후보군에서 대조군 대비 마이오스타틴 프로모터 활성이 유의적으로 감소하였으며, 두 후보군은 30 µg/mL의 농도까지 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다.

표 21

[0237] 7개의 펩타이드 후보군별 처리(10 µg/ml)에 따른 상대적인 미오스타틴 프로모터 활성

	대조군	펩타이드 후보군						
		#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
평균	100.00	109.18	106.85	110.77	85.59	84.26	100.60	100.50
표준오차	2.92	4.26	4.69	6.52	3.53	2.98	4.24	3.15

표 22

[0239] #4 펩타이드 후보군의 농도별 처리에 따른 상대적인 미오스타틴 프로모터 활성

	대조군	농도 (µg/mL)				
		1	3	10	30	100
평균	100.00	88.60	85.56	75.59	68.51	72.02
표준오차	6.77	5.50	4.79	4.09	5.30	6.11

표 23

[0241] #5 펩타이드 후보군의 농도별 처리에 따른 상대적인 미오스타틴 프로모터 활성

	대조군	농도 (µg/mL)				
		1	3	10	30	100
평균	100.00	81.05	83.88	80.92	54.02	68.63
표준오차	8.59	5.86	8.02	4.54	3.63	5.63

[0243] **<실험예 4>**

[0244] **텍사메타손 및 펩타이드 후보군 동시 처리 후 세포 생존율 측정**

[0245] 근위축을 유도하기 위한 텍사메타손 및 본 발명의 7개의 펩타이드 후보군 각각을 동시 처리 후 세포 생존율을 MTS 에세이로 측정하였다.

[0246] 실험에 사용한 미분화 상태의 C2C12 세포는 마우스의 골격근 세포주로 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 구매했으며 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA), 100 units/mL 페니실린 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 (Gibco)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; HyClone Laboratories, Inc., Logan, UT, USA)을 성장배지 (growth medium, GM)로 이용하여 37℃, 5% CO₂가 유지되는 조건에서 배양하였다. C2C12 세포는 96-well plate (SPL Life Sciences Co., Ltd., Pocheon, Korea)에 1×10^4 cells/well의 농도로 분주하고, 24시간 뒤 DM으로 교체하여 4일간 분화시켰다. 그 후, 근위축을 유도하기 위한 텍사메타손 (100 µM)과 농도별 (#1-#6: 0, 50, 500nM; #7: 0, 10, 25, 50, 100 µM) 샘플을 24시간 동안 처리하였다. 세포 생존율은 CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (MTS; Promega Corporation, Madison, WI, USA)을 이용하여 제조사 지침에 따라 측정하였다.

[0247] 그 결과 도 14에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 7개의 펩타이드 후보군 중 #5, #6 펩타이드 후보군을 제외한 모든 펩타이드 후보군은 텍사메타손 처리 단독 처리 (DEX) 대비 세포 생존율을 유의적으로 증가시켰다.

[0249] **<실험예 5>**

[0250] **텍사메타손 및 펩타이드 후보군 동시 처리 후 근감소 유전자의 상대적인 mRNA 발현 수준 측정**

[0251] 근위축을 유도하기 위한 텍사메타손 및 본 발명의 7개의 펩타이드 후보군 각각을 동시 처리 후 근육 감소와 관련한 유전자의 상대적인 mRNA 발현 수준을 RT-PCR을 통해 측정하였다.

[0252] 실험에 사용한 미분화 상태의 C2C12 세포는 마우스의 골격근 세포주로 American Type Culture Collection (Manassas)에서 구매했으며 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), 100 units/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin (Gibco)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; HyClone Laboratories)을 성장배지(GM)로 이용하여 37℃, 5% CO₂가 유지되는 조건에서 배양하였다. C2C12 세포는 6-well plate (SPL Life Sciences Co.)에 2×10^5 cells/mL의 농도로 분주하고 약 90-100% confluence가 되었을 때 2% horse serum(HS; Gibco)이 함유된 분화배지(DM)로 교체하여 4일간 배양함으로써 미분화 상태의 근아세포 (myoblasts)를 근관세포 (myotube)로 분화시켰다. 그 후, 근위축을 유도하기 1시간 전 샘플을 농도별 (#1-#6: 0, 50, 500nM; #7: 0, 10, 25, 50, 100 µM)로 처리하고, 텍사메타손을 100 µM 농도로 24시간 동안 처리하였다. 이후 배지 제거 및 PBS 세척 후 trizol을 이용하여 RNA를 분리하였다. RNA 순도 및 정량은 Varioskan™ LUX multimode microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하여 측정하였다. cDNA는 high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 합성하였으며, Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystem)과 QuantStudio 3 Real-Time PCR (Applied Biosystems)기기를 이용, 증폭되는 DNA를 검출하였다.

[0253] 그 결과 도 15 및 표 24-25에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 7개의 펩타이드 후보군 중 #4, #5 펩타이드 후보군의 경우 텍사메타손 처리 단독 처리 (DEX) 대비 근육 감소와 관련한 유전자 (Atrogin-1, MuRF-1)의 mRNA발현을 유의적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

표 24

[0255] 본 발명의 #1-6의 펩타이드 후보군의 농도별 처리에 따른 근감소 유전자의 mRNA발현 수준 (평균±표준오차)

후보군	유전자	대조군	텍사메타손	펩타이드 농도 (nM)	
				50	500
#1	Atrogin-1	1.01±0.05	3.17±0.18	3.37±0.11	3.21±0.17
	MuRF-1	1.01±0.06	1.65±0.11	1.83±0.07	1.80±0.13
#2	Atrogin-1	1.01±0.05	3.94±0.33	3.74±0.20	3.49±0.19
	MuRF-1	1.01±0.06	1.65±0.11	1.83±0.07	1.80±0.13

#3	MuRF-1	1.00±0.03	1.90±0.10	1.79±0.10	1.67±0.11
	Atrogin-1	1.01±0.06	3.53±0.37	3.53±0.28	3.91±0.45
#4	MuRF-1	1.00±0.03	1.60±0.11	1.52±0.09	1.57±0.14
	Atrogin-1	1.01±0.04	3.28±0.21	2.63±0.16	2.68±0.17
#5	MuRF-1	1.01±0.04	1.48±0.06	1.24±0.09	1.17±0.10
	Atrogin-1	1.01±0.06	3.22±0.28	2.77±0.15	2.52±0.12
#6	MuRF-1	1.02±0.06	1.62±0.14	1.39±0.06	1.16±0.04
	Atrogin-1	1.01±0.04	3.34±0.16	3.04±0.15	3.15±0.14
#6	MuRF-1	1.02±0.06	1.65±0.10	1.52±0.08	1.69±0.11

표 25

[0257]

본 발명의 #7의 펩타이드 후보군의 농도별 처리에 따른 근감소 유전자의 mRNA발현 수준 (평균±표준오차)

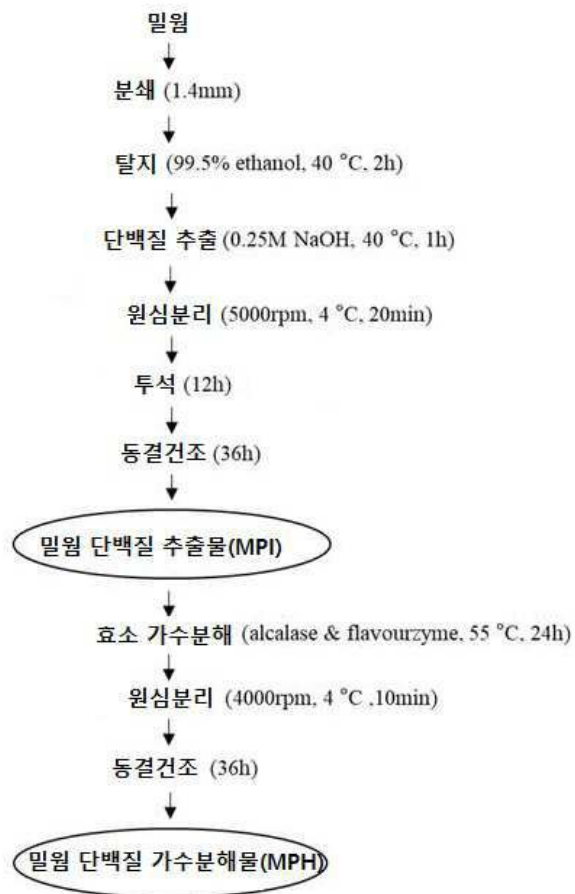
후보군	유전자	대조군	텍사메타손	펩타이드 농도 (μM)			
				10	25	50	100
7	Atrogin-1	1.01±0.05	2.59±0.13	2.26±0.17	2.51±0.04	2.37±0.18	2.23±0.18
	MuRF-1	1.01±0.06	1.52±0.11	1.37±0.10	1.54±0.06	1.53±0.06	1.46±0.10

[0259]

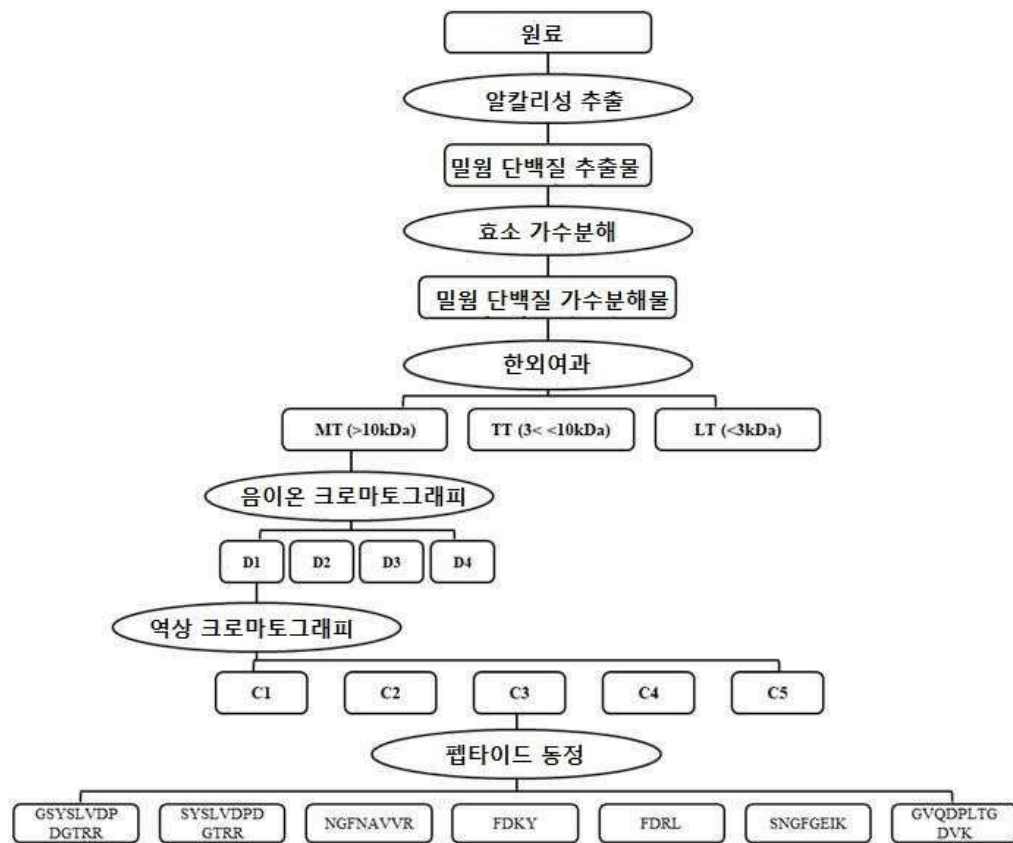
이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

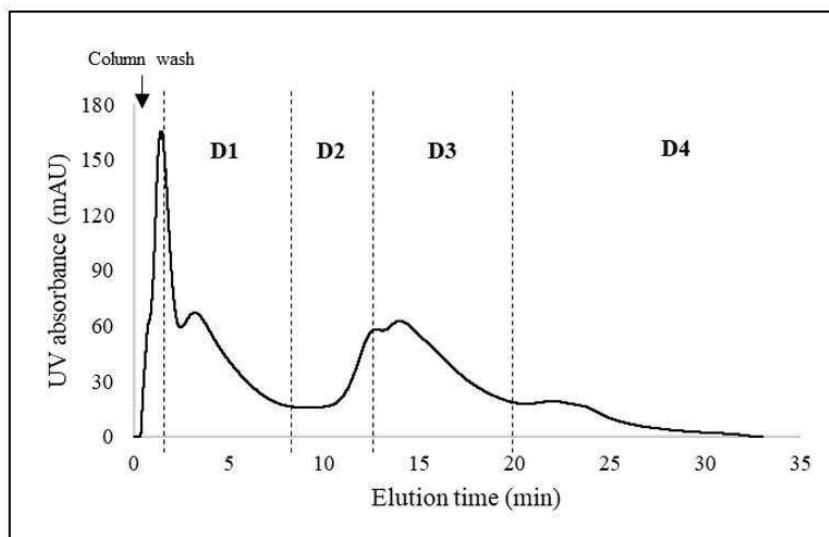
도면1



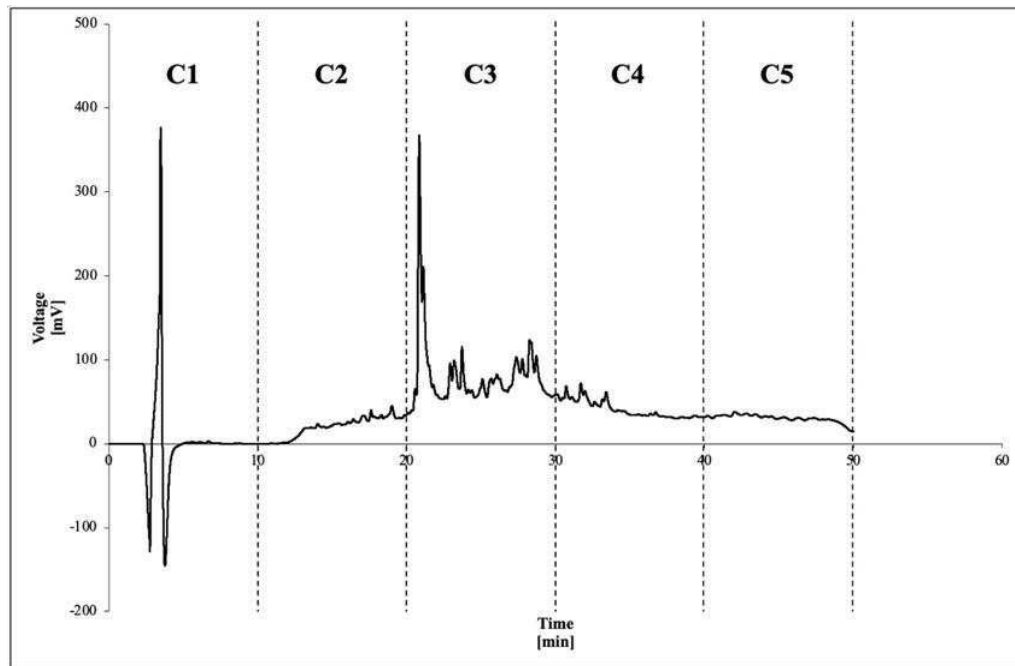
도면2



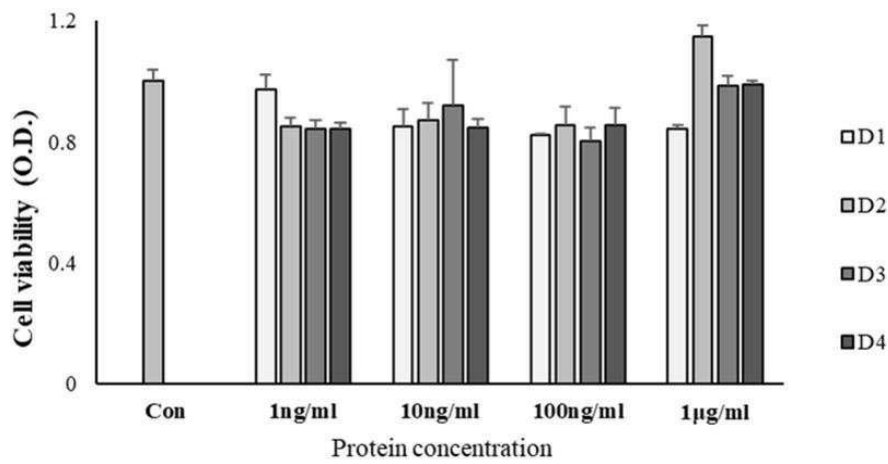
도면3



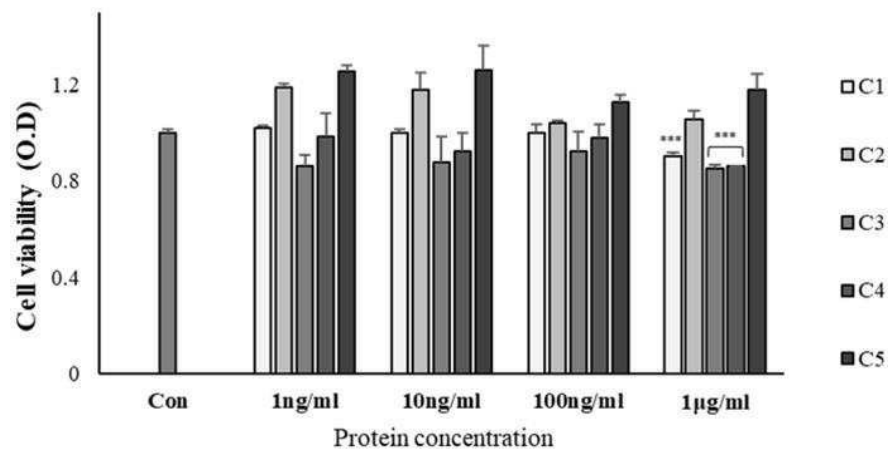
도면4



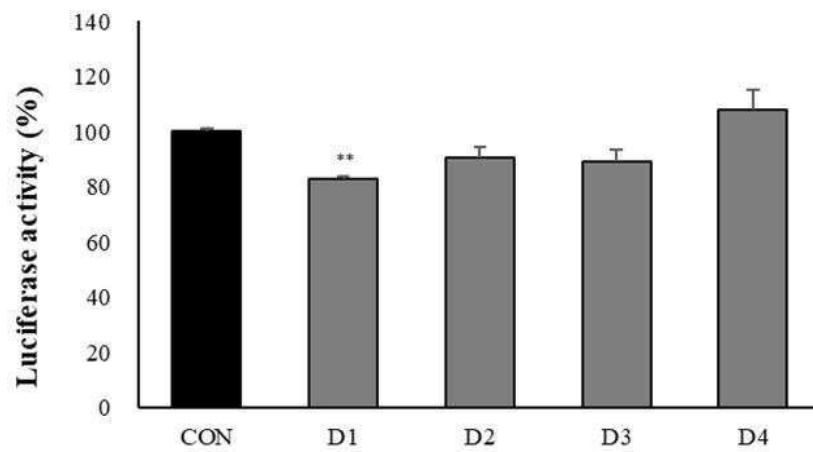
도면5a



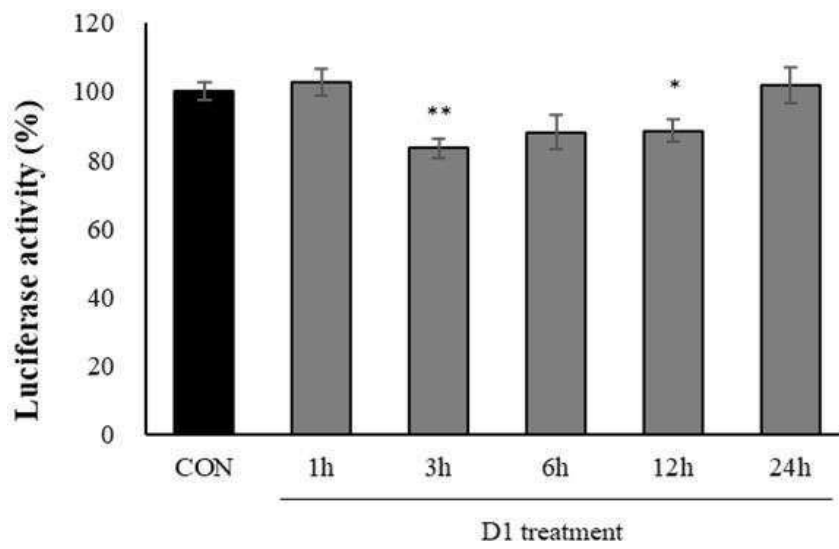
도면5b



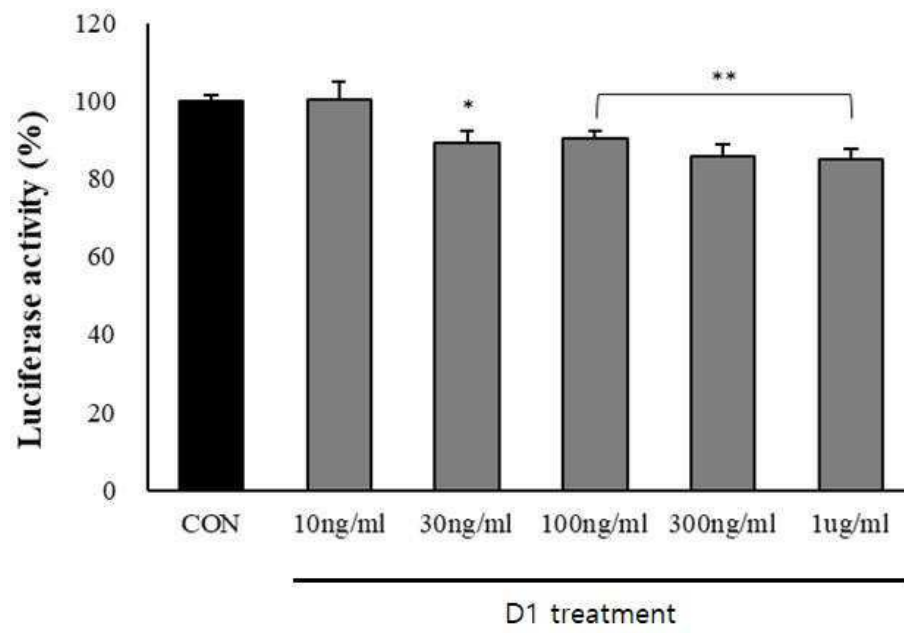
도면6a



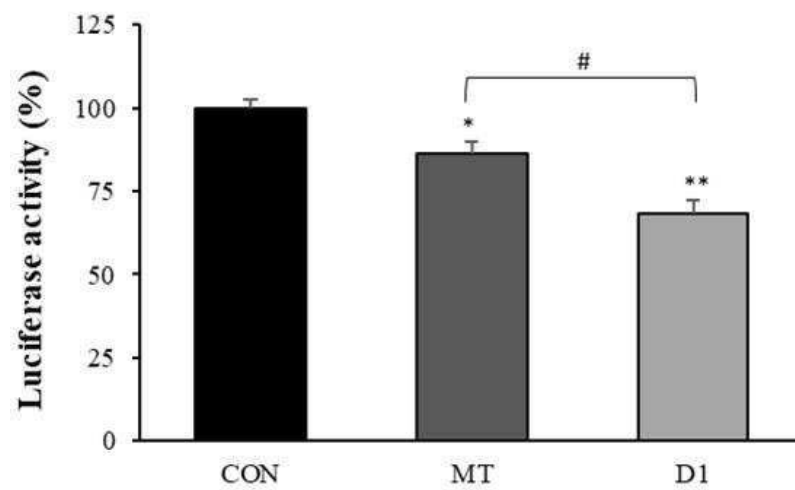
도면6b



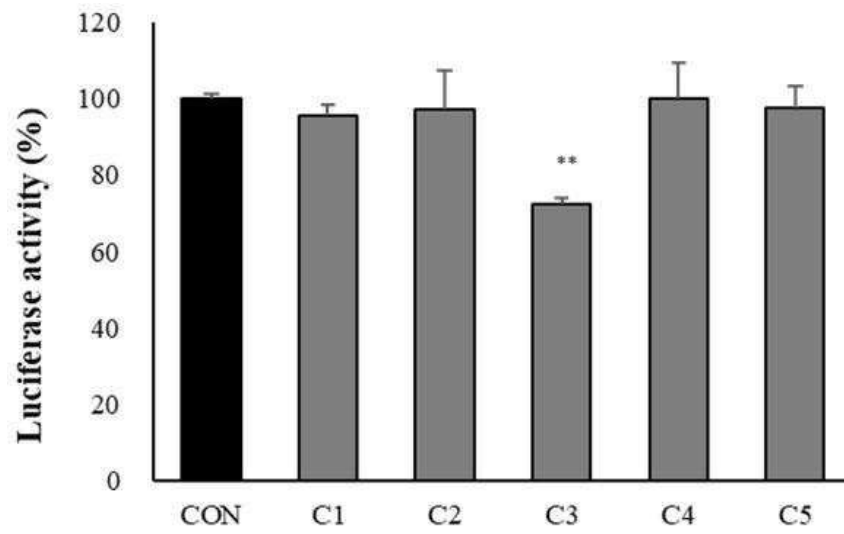
도면6c



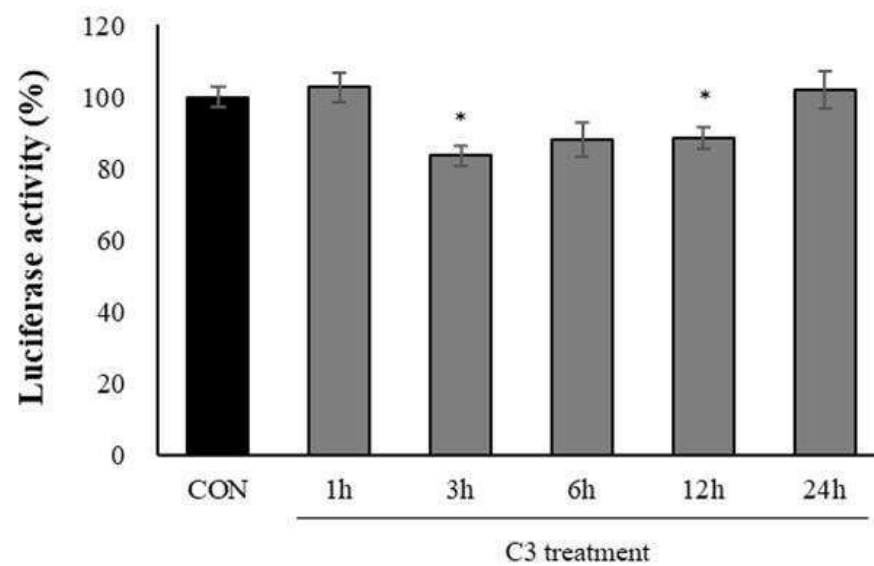
도면6d



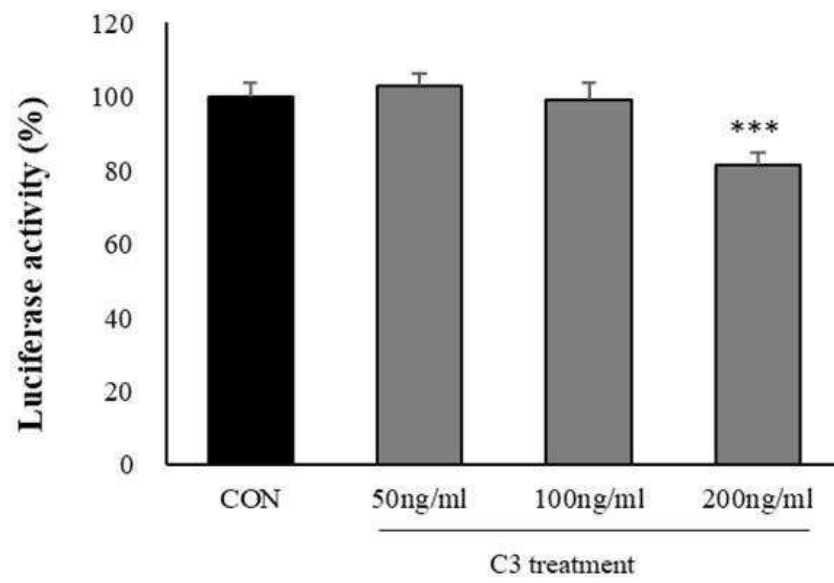
도면7a



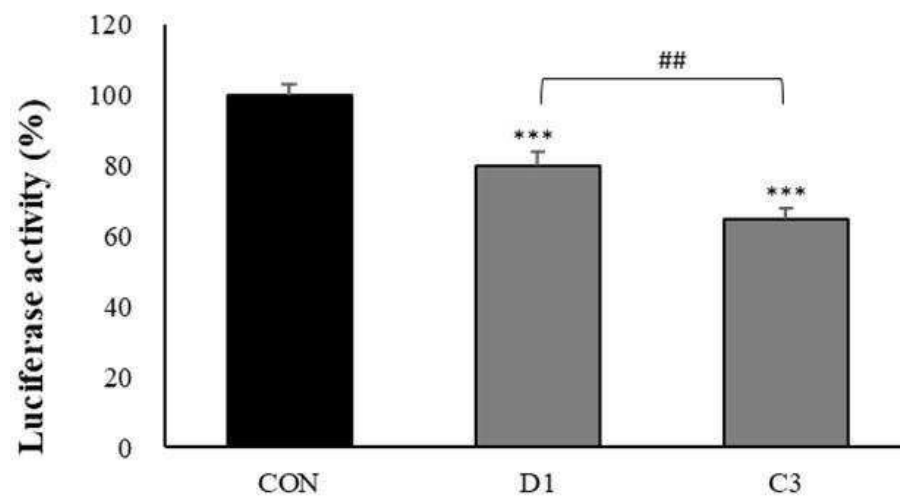
도면7b



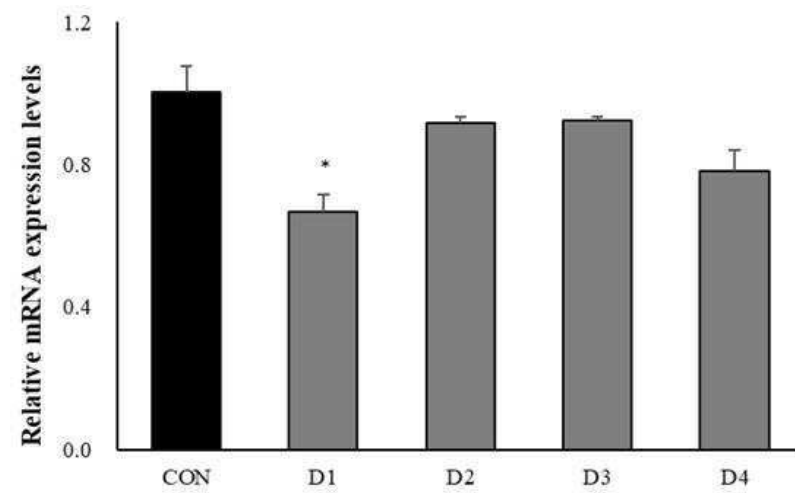
도면7c



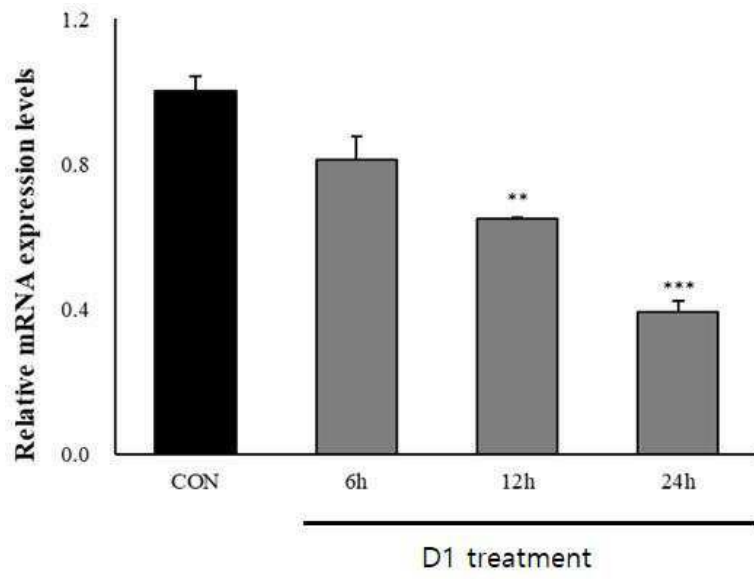
도면7d



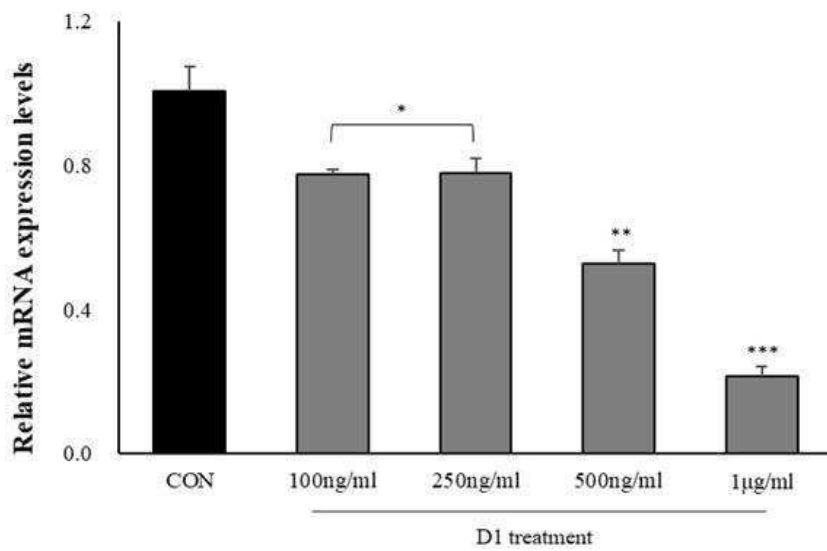
도면8a



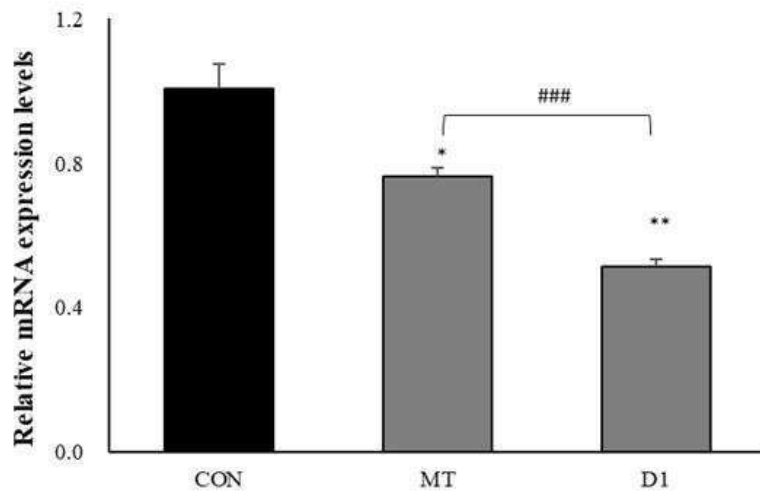
도면8b



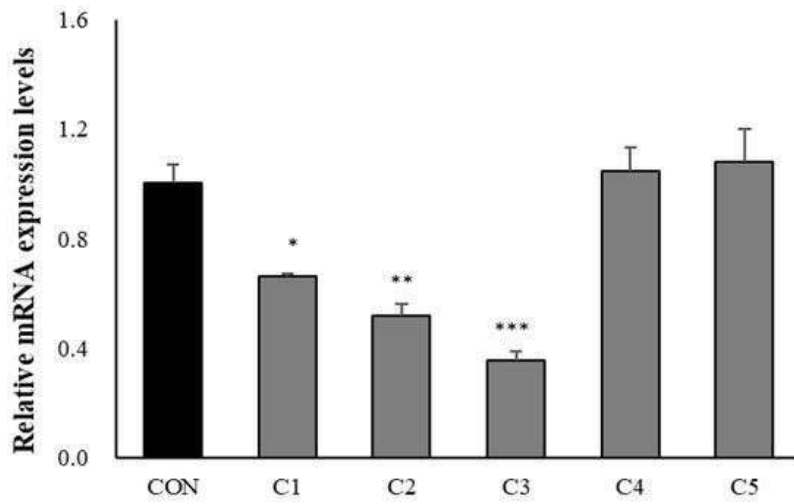
도면8c



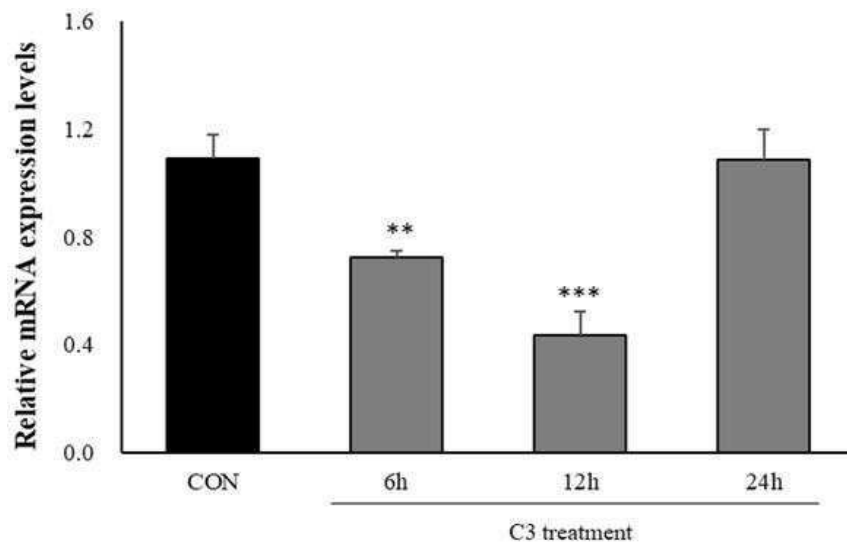
도면8d



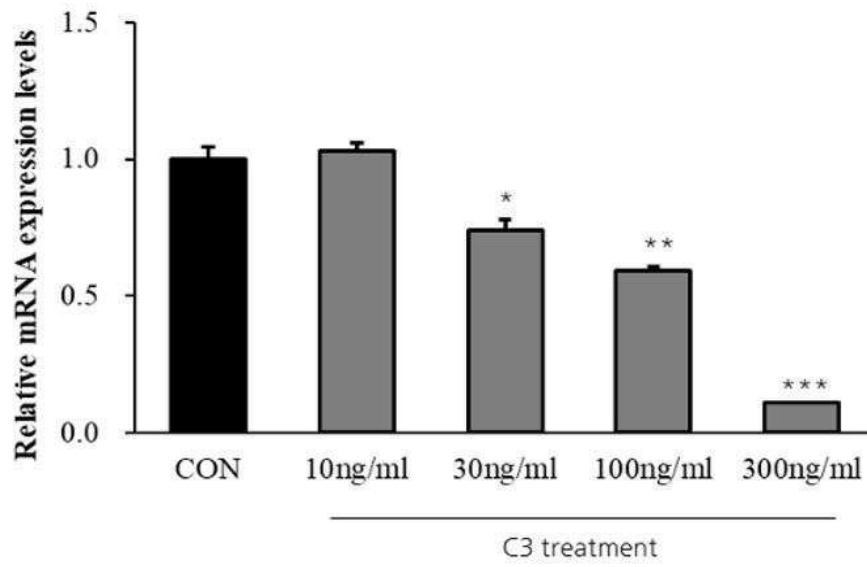
도면9a



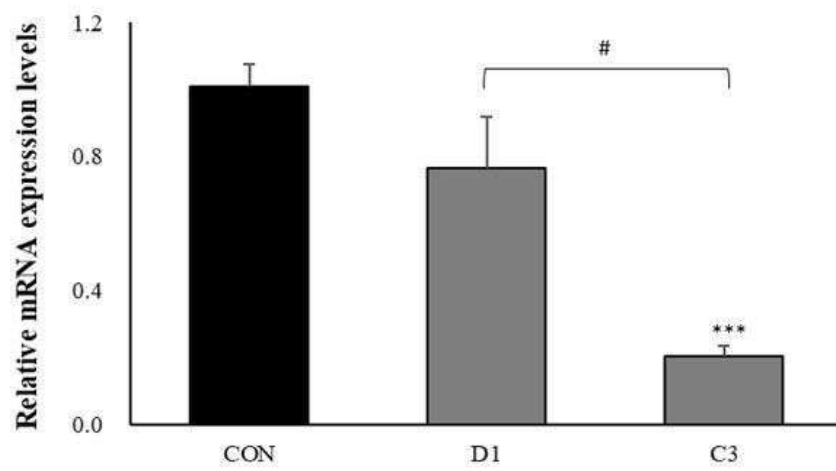
도면9b



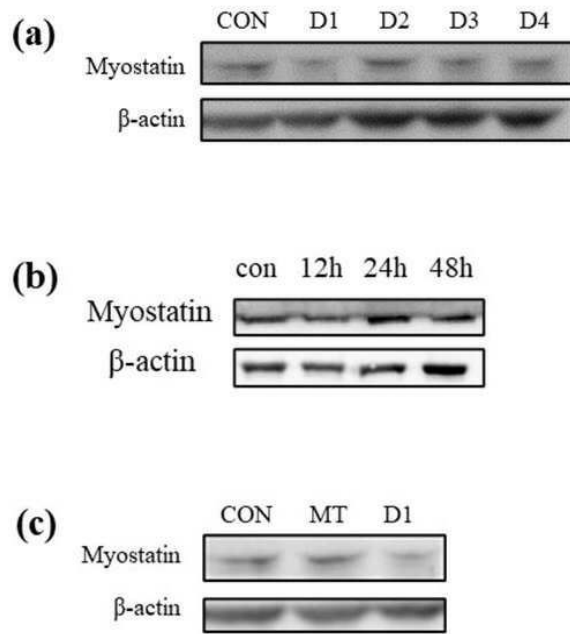
도면9c



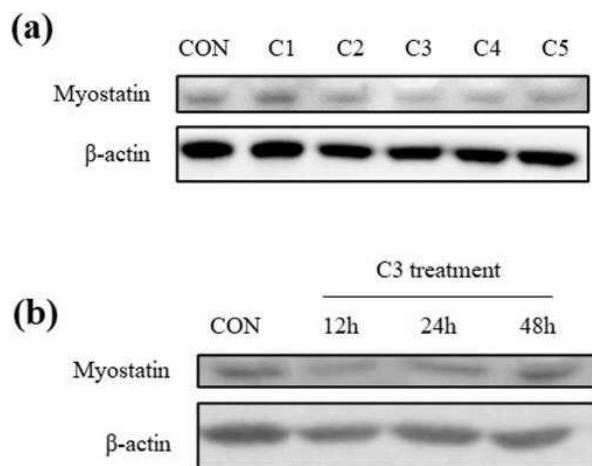
도면9d



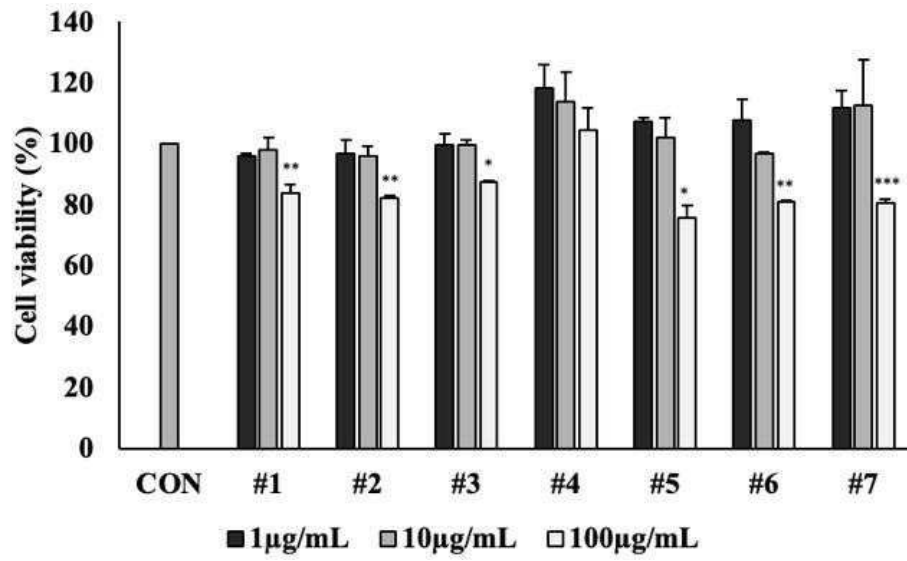
도면10



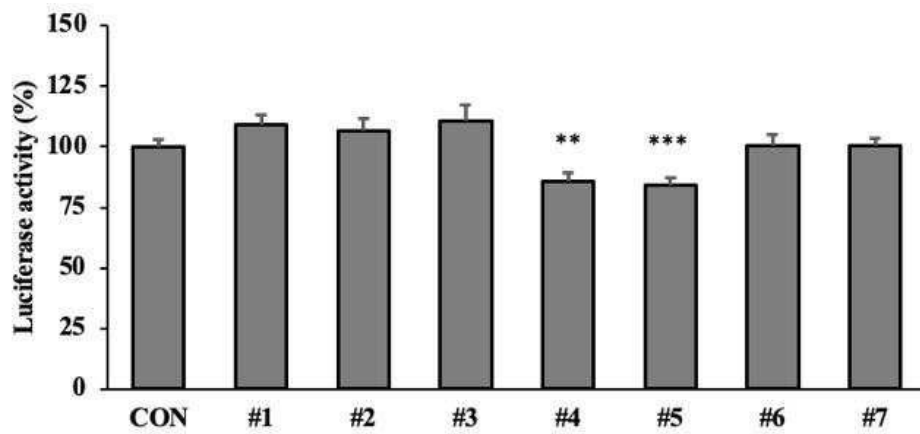
도면11



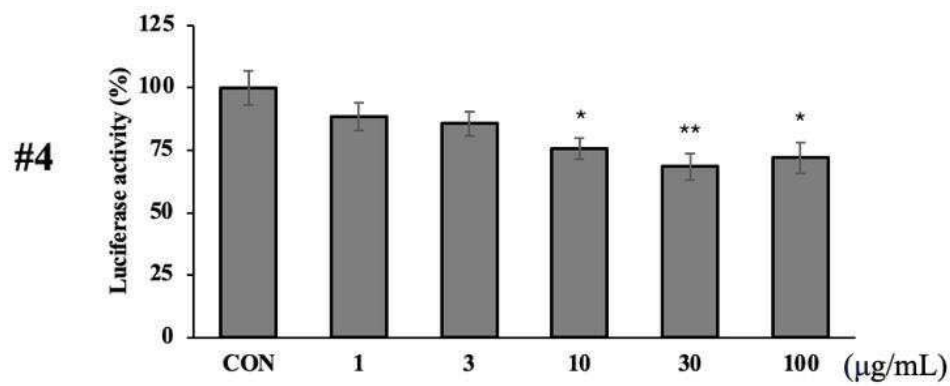
도면12



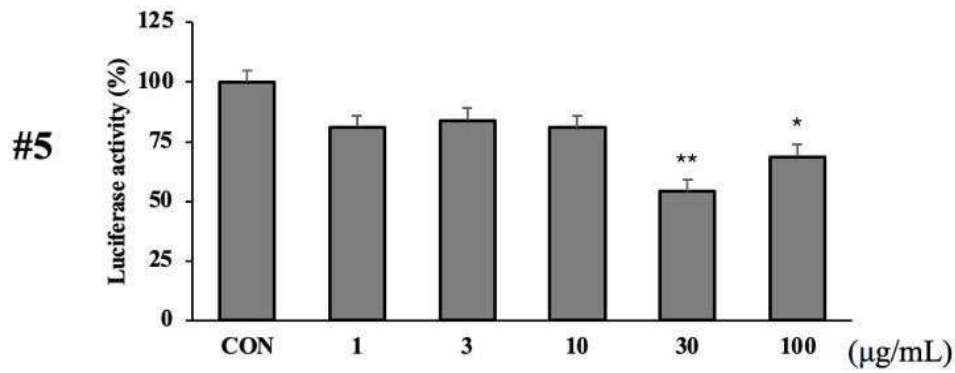
도면13a



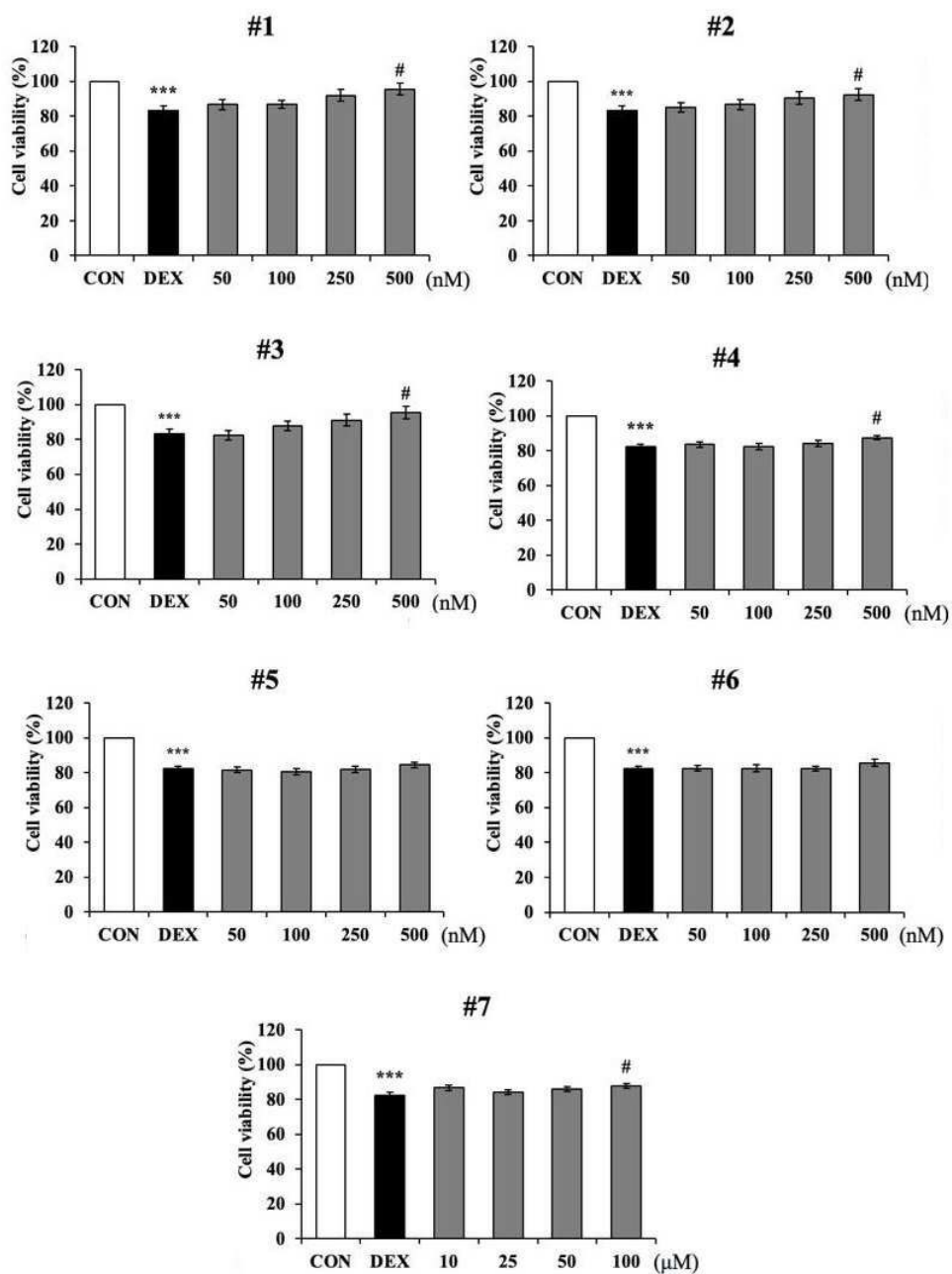
도면13b



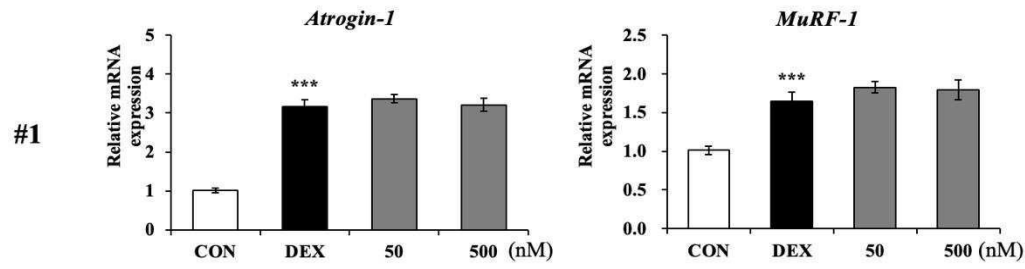
도면13c



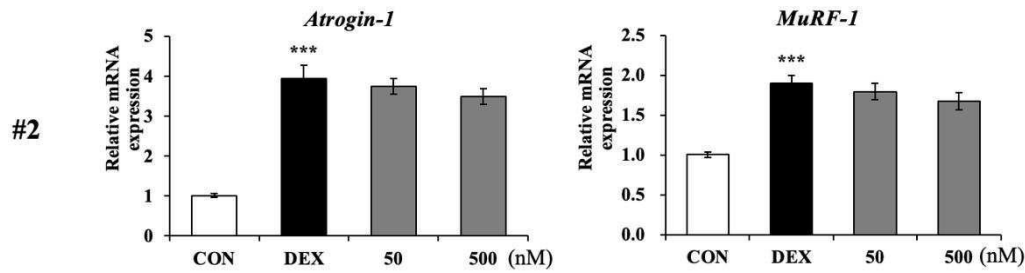
도면14



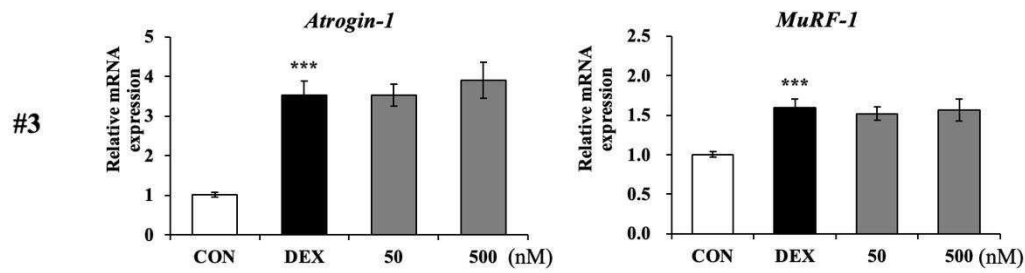
도면15a



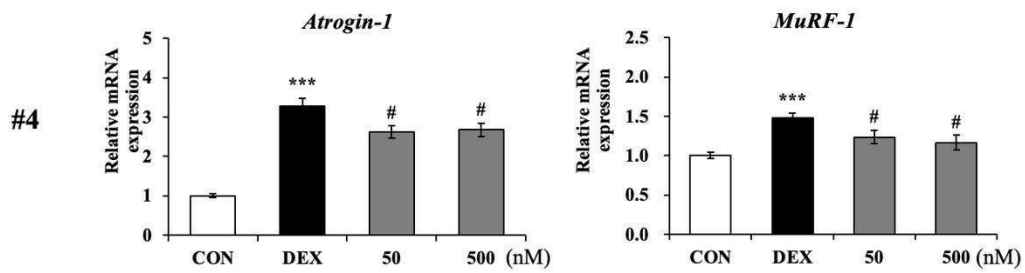
도면15b



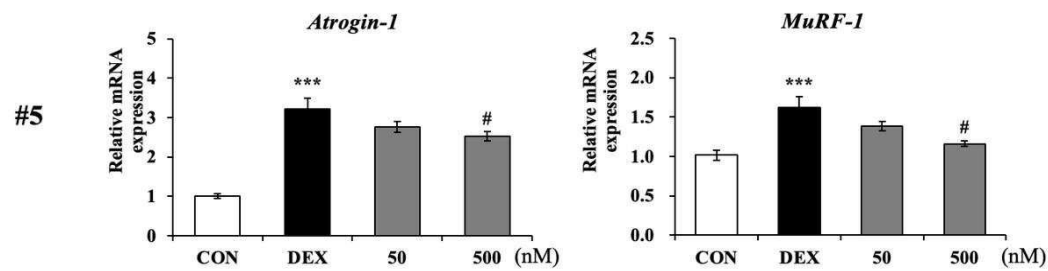
도면15c



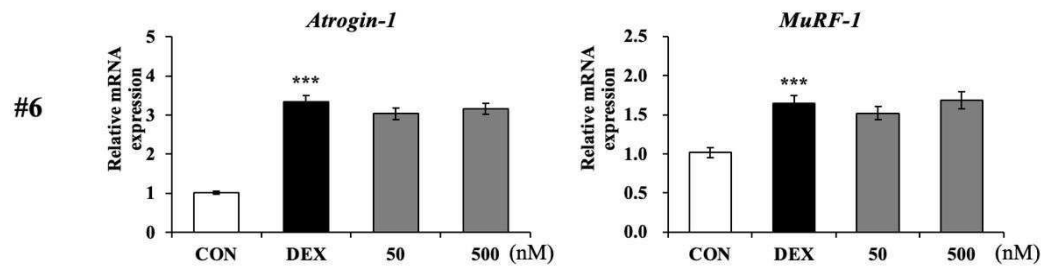
도면15d



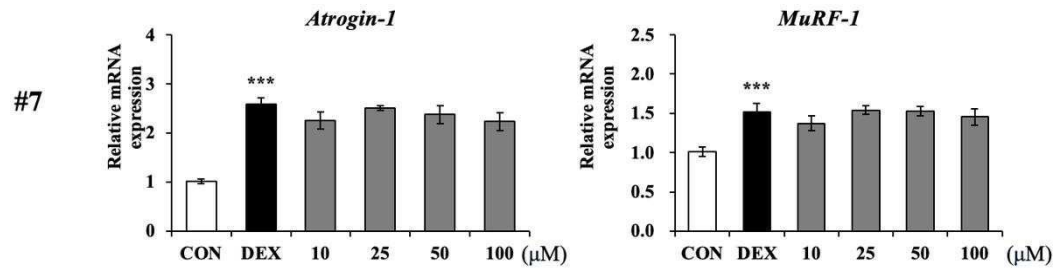
도면15e



도면15f



도면15g



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.