

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0167014
(43) 공개일자 2022년12월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/7072 (2006.01) *A23L 33/125* (2016.01)*A61K 36/8962* (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/7072 (2013.01)*A23L 33/125* (2020.05)

(21) 출원번호 10-2021-0076030

(22) 출원일자 2021년06월11일

심사청구일자 2022년07월12일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

김승현

서울특별시 서초구 고무래로 94, 101동 203호(서초동, 서초4차현대아파트)

오미라

인천광역시 남동구 논고개로 93, 1603호(논현동)

박선주

서울특별시 동작구 상도로 346-1, 115동 806호(상도동, 힐스테이트 상도 센트럴파크)

(74) 대리인

특허법인(유한)아이시스

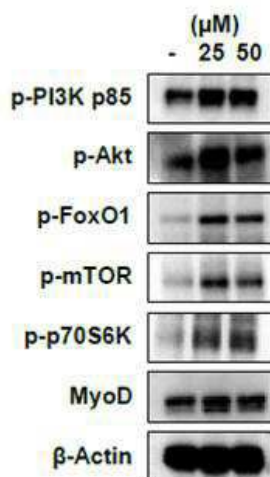
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 부추 유래 화합물을 포함하는 근감소증 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 근감소증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 부추에서 분리된 화합물 또는 이의 염을 포함하는 근감소증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기 화합물이 PI3K/Akt/mTOR 경로를 조절하는 조절인자로 작용하여 근육세포의 성장과 분화를 유의적으로 유도함으로써 근감소증 예방 및 치료를 위한 의약품, 식품, 의약외품으로 널리 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도3a



(52) CPC특허분류

A61K 36/8962 (2013.01)

A61P 21/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/316 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711133251
과제번호	2020R1A2C1012632
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	식물-미생물 상호작용을 이용한 화학적 구조 다양성 확보 및 신규활성물질 발굴
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2023.02.28

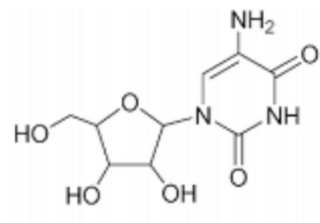
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 근감소증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 근손실 억제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 근육세포의 성장 및 분화를 유도시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 PI3K/Akt/mTOR 신호 전달 경로의 활성화를 통해 근육세포의 성장 및 분화를 유도시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

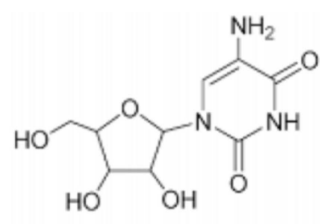
제1항에 있어서,

상기 화합물은 부추로부터 추출 및 분리된 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 근감소증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

[화학식 1]



청구항 7

제6항에 있어서,

상기 조성물은 근손실 억제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 조성물은 근육세포의 성장 및 분화를 유도시키는 것을 특징으로 하는, 건강기능식품 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 조성물은 PI3K/Akt/mTOR 신호 전달 경로의 활성화를 통해 근육세포의 성장 및 분화를 유도시키는 것을 특징으로 하는, 건강기능식품 조성물.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 화합물은 부추로부터 추출 및 분리된 것을 특징으로 하는, 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 근감소증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 부추에서 분리된 화합물 또는 이의 염을 포함하는 근감소증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 노화에 따라 골격근 질량과 근력의 손실이 발생하게 되는데, 이를 근감소증 (sarcopenia)이라고 한다. 근감소증은 대략 30 세에 시작되어 평생 진행되는 과정으로 근육 조직량과 금섬유 수 및 크기가 점진적으로 감소하여 근육량과 근력의 손실이 발생한다. 이로 인해 운동성의 소실, 낙상, 골다공증, 골절로 인한 삶의 질 저하 및 신체 활동 감소를 초래한다. 최근 고령 인구의 증가로 유병률이 높아지고 있으며 이로 인한 의료비 부담이 증가함에 따라 이를 낮출 수 있는 연구의 필요성이 강조되고 있다. 따라서 많은 연구자들이 천연물로부터 골격근 질량을 늘리고 유지하는 데 도움이 될 수 있는 성분을 찾는 연구를 활발히 진행하고 있다.

[0003] 한편, 부추 (*Allium tuberosum*)는 백합과 (Liliaceae)에 속하는 여러해살이 풀로서, 주로 동아시아와 동남아시아에서 재배하고 소비되며 중국에서는 복통, 설사, 토혈, 천식의 치료를 위해 사용되어왔다. 부추의 약리활성에 대한 연구로는 항 당뇨 및 간 보호 효과, 혈청 콜레스테롤, 트리글리세리드, 저밀도 지단백 콜레스테롤 및 동맥 경화지표 감소에 의한 지질개선효과, 세포사멸을 통한 암세포 증식 억제 효과(KOREAN J.FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 34. No.4 pp. 688~693 (2002)) 등이 보고되어 있으나 골격근 세포 분화 효과에 대한 보고는 아직 없어, 이에 대한 연구가 필요한 실정이다.

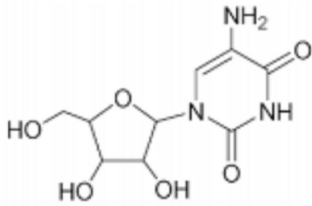
발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명자들은 근감소증을 치료를 위한 천연물을 예의 연구한 결과, 부추로부터 화합물을 분리하였고, 상기 화합물이 PI3K/Akt/mTOR 조절하는 조절인자로 작용하여 근육세포의 성장과 분화를 유의적으로 유도함으로써 근감소증 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0005] 이에, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 근감소증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0006] [화학식 1]



[0007]

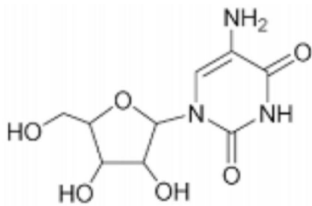
[0008] 또한, 본 발명은 상기 화합물 또는 이들의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 근감소증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 근감소증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] [화학식 1]



[0013]

[0015] 또한, 본 발명은 상기 화합물 또는 이들의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 근감소증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일구현예로, 상기 화합물은 근손실 억제 활성을 가질 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 화합물은 근육세포의 성장 및 분화를 유도할 수 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 화합물은 PI3K/Akt/mTOR 신호 전달 경로의 활성화를 통해 근육세포의 성장 및 분화를 유도시킬 수 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 화합물은 부추로부터 추출 및 분리된 것일 수 있다.

발명의 효과

[0020] 상기 화합물이 PI3K/Akt/mTOR 경로를 조절하는 조절인자로 작용하여 근육세포의 성장과 분화를 유의적으로 유도함으로써 근감소증 예방 및 치료를 위한 의약품, 식품, 의약외품으로 널리 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 부추 추출물로부터 본 발명에 따른 화합물을 분리하는 과정을 모식도로 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 따른 화합물의 골격근 세포 분화 활성을 확인한 것으로, 도 2a는 본 발명의 화합물의 세포 독성을 확인한 결과를 나타낸 것이고, 도 2b는 myoblast 세포 분화를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명에 따른 화합물의 골격근 성장과 관련한 PI3K/Akt/mTOR 신호 전달 경로의 활성화를 확인한 것으로, 도 3a는 Western blot을 이용하여 골격근 분화와 관련된 6개의 단백질의 발현 수준의 변화를 확인한 결과를 나타낸 것이고, 도 3b 내지 3g는 도 3a에 개시된 각 단백질 발현 수준의 정도를 정량화한 결과를 나타낸

것이다.

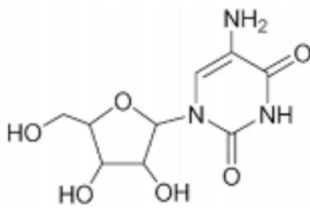
도 4는 Myostatin 및 IGF-1의 메커니즘에 따른 골격근 분화 조절 경로를 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명자들은 부추로부터 화합물을 분리하였고, 상기 화합물이 PI3K/Akt/mTOR 신호 전달 경로를 조절하는 조절 인자로 작용하여 근육세포의 성장과 분화를 유의적으로 유도함으로써 근감소증 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0023] 이에, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 근감소증 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0024] [화학식 1]



[0025]

[0026] 본 발명에 따른 화합물은 화학식 $C_9H_{14}N_3O_6$ 로 구성되고, 5-aminouridine 로 명명되는 화합물을 의미한다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 근감소증을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0028] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"이란 본 발명의 따른 조성물의 투여로 근감소증의 정도를 감소시키거나, 근감소증에 의한 합병증 등의 증상을 경감시키는 모든 행위를 의미한다

[0029] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 근감소증에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0030] 본 발명에서 상기 화합물은 근손실 억제 활성을 가질 수 있으며, 구체적으로 근육세포의 성장 및 분화를 유도시킴으로써 근손실 억제 활성을 나타낼 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명의 화합물은 특정 신호전달경로의 활성화 또는 하향조절을 통해 근육세포의 성장 및 분화를 유도할 수 있으며, 바람직하게는 PI3K/Akt/mTOR 신호 전달 경로의 활성화를 통해 근육세포의 성장 및 분화를 유도할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명의 화합물은 부추로부터 추출 및 분리된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명에 따른 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적 또는 식품학적으로 허용되는 다양한 유기산 또는 무기산에 의해 형성된 산부가염을 사용할 수 있다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 다이카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻을 수 있다. 이러한 무독성 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피온산, 옥살산, 말론산, 숙신산, 수베레이트, 세바케이트, 푸마렐트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디온산, 벤조산, 클로로벤조산, 메틸벤조산, 디니트로 벤조산, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조산, 프탈산, 테레프탈레이트, 벤젠설폰산, 톨루엔설폰산, 클로로벤젠설폰산, 크실렌설폰산, 페닐아세트산, 페닐프로피온산, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설폰에이트, 프로판설폰에이트, 나프탈렌-1-설폰에이트, 나프탈렌-2-설폰에이트, 만델레이트, 트라이플루오로아세트산 등을 사용하여 제조할 수 있다.

[0034] 이때, 본 발명에 따른 상기 산 부가염은 통상의 방법, 예를들면 [화학식 1]의 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기용매, 예를들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시

켜서 제조할 수 있다. 또한 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0035] 또한, 본 발명에 따른 [화합식 1]로 표시되는 화합물은 염기를 사용하여 약학적 또는 식품학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면, 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 리튬, 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 농약학상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예를들면, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0036] 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통해 본 발명에 따른 화합물의 근감소증 예방, 개선 및 치료 용도를 규명하였다.

[0037] 구체적으로, 본 발명의 일실시예에서는 본 발명에 따른 화합물이 50 μ M 농도에서 C2C12 세포에 대한 독성을 나타내지 않으며, myoblast 세포의 분화를 유의적으로 증가시킴으로써, 골격근 성장 조절 효과를 나타낸다는 것을 확인하였다(실시예 2 참조).

[0038] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서는 본 발명에 따른 화합물이 p-PI3K, p-Akt, p-FoxO1, p-mTOR 및 p-70S6K 단백질의 발현수준을 증가시킴으로써 PI3k/Akt/mTOR 신호 전달 경로를 활성화시켜 근육세포의 성장을 유도시킬 수 있음을 확인하였다(실시예 3 참조).

[0039] 상기 실시예 결과를 종합해보면, 본 발명에 따른 화합물은 골격근의 생성 및 분화를 유도함으로써 근감소증 개선에 효과가 있으며, 근감소증의 예방, 개선 및 치료를 위한 의약품, 식품, 의약외품으로 널리 활용될 수 있음이 기대된다.

[0040] 본 발명에 따른 조성물이 약학적 조성물의 형태인 경우, 약학적으로 유효한 양으로 [화합식 1]의 화합물을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이때, 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성 셀룰로스, 폴리비닐 피로리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0041] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여 (예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0042] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 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. 본 발명에 따른 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. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

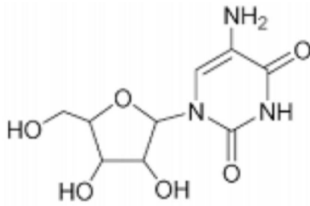
[0043] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 1 내지 500 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감 될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0044] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 근감소증 치료 방법을 제공한다.

[0045] 본 발명에서 "개체"는 쥐, 가축, 생쥐, 인간 등 포유류일 수 있으며, 구체적으로 항암치료가 필요한 반려견, 경주마, 인간 등일 수 있고, 바람직하게는 인간일 수 있다.

- [0046] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물의 근감소증 치료 용도를 제공한다.
- [0047] 본 발명에 따른 조성물이 건강기능식품 조성물의 형태로 이용되는 경우, 특정보건용 식품, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학 및 의료효과가 높은 식품으로 제조 될 수 있으며, 상기 식품은 경우에 따라, 기능성식품, 건강식품, 건강보조식품으로 혼용될 수 있으며, 유용한 효과를 얻기 위하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 건강기능식품은 식품 조성물에 통상적으로 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 디히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시 톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(돌신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기조제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 첨가할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 건강기능식품을 식품 첨가물로 사용할 경우, 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 건강기능식품에 있어서, 본 발명에 따른 [화학식 1]의 화합물 함량은 특별히 제한되지 않으며, 투여 대상의 상태, 구체적인 병증의 종류, 진행 정도 등에 따라 다양하게 변경될 수 있다. 필요한 경우, 식품의 전체 함량으로도 포함될 수 있다.
- [0052] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0054] **[실시예]**
- [0055] **실시예 1. 부추 유래 화합물의 분리 및 실험방법**
- [0056] **1-1. 부추 추출물 제조**
- [0057] 전라도 나주 지방 원산지의 부추를 구매하여 사용하였으며, 부추의 지상부 4.0kg을 40℃에서 하루 동안 건조하여 건조 중량 450g을 수득하였다. 수득된 건조중량을 메탄올로 30℃에서 3시간씩 3회 초음파 추출하여 감압 농축기로 농축하여 용매를 제거한 후 83.7g의 농축물을 수득하였다.
- [0059] **1-2. 부추 추출물로부터 화합물 분리**
- [0060] 실시예 1-1에서 수득한 83.7 g의 부추 메탄올 추출물을 물에 현탁한 후 분획 깔대기를 이용하여 Hexane, CH₂Cl₂, 및 EtOAc 로 분획한 뒤 남은 물 분획물을 감압 농축하여 총 71.5g 의 물 분획 농축물을 수득하였다. 물 분획물은 25%, 50%, 그리고 75% 메탄올로 Diaion HP-20 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 3개의 소 분획으로 구분되었으며, 이중 W2B분획을 다시 CHCl₃-MeOH-Water(2:1:0.2)로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시한 후 7% acetonitrile로 prep-HPLC를 실시하여 하기 [화학식 1]의 화합물(3.3 mg)을 분리하였다. (white amorphous powder; C₉H₁₃N₃O₆, HR-ESI-MS m/z 260.0873 [M + H]⁺ (calcd for C₉H₁₄N₃O₆, 260.0883); for ¹H (CD3OD, 400 MHz) and ¹³C NMR (CD3OD, 100 MHz) spectroscopic data).

[0061] [화학식 1]



[0062]

[0064] 1-3. 골격근 세포 배양

[0065] 마우스의 myoblasts 세포 라인인 C2C12 세포를 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 또한, DMEM, 소 태아 혈청(FBS), 말 혈청(HS), 페니실린-스트렙토마이신, 트립신-EDTA 및 DPBS는 Gibco-BRL(Burlington, Ont, Canada)에서 구입하였다. C2C12 세포는 10%의 heat-inactivated FBS, 스트렙토마이신(100 mg/mL) 및 페니실린(100 unit/mL)을 포함하는 DMEM에서 37℃, 5% CO₂ 가습 배양 조건하에서 유지되었다. 분화를 유도하기 위해 격일로 배지를 변경하면서 80 % confluent 배양액을 6일 동안 2% HS를 포함하는 DMEM으로 전환하였다.

[0067] 1-4. 골격근 세포 독성 및 세포 증식 활성 분석

[0068] 세포독성평가는 96 웰 플레이트에 1 X 10⁵로 세포를 파종하고 24 시간 후 상기 실시예 1-2에 분리된 [화학식 1]의 화합물을 24 시간 동안 처리하고, MTT 분석을 사용하여 세포 독성 평가를 수행하였다. 포르마잔 결정(formazan crystals)을 DMSO에 용해시키고, 540nm에서 ELISA plate reader(BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 화합물이 처리되지 않은 대조군 세포에서 생성된 포르마잔의 광학 밀도는 100 % 생존력을 나타내는 것으로 간주하였다.

[0069] 골격근 세포 증식활성을 평가하기 위해 BrdU 분석(Millipore, Billerica, MA, USA)을 사용하였다. 96 웰 플레이트에 5 X 10⁴로 세포를 파종하고 파종 48 시간 후, 성장 배지 (10% FBS를 포함하는 DMEM)를 분화 배지 (2% HS를 포함하는 DMEM)로 교체하고 분화 기간 동안 격일로 실시예 1-2에서 분리된 화합물을 처리하였다. 마지막으로 분화 유도 6 일 후 BrdU assay를 이용하여 세포 증식 활성을 측정 하였다.

[0071] 1-5. Western blot 분석

[0072] 본 발명에 따른 화합물의 근 신생 신호 전달 캐스케이드에 관련된 단백질의 발현 분석을 확인하기 위해 Western blot 분석을 수행하였다. 본 발명에 따른 화합물은 세포분화기간 동안 분화 배지 (2% HS를 함유하는 DMEM)로 처리되었다. 이후 세포질 및 핵 단백질을 수집하고 세포 단백질을 12% 소듐 도데실 설페이트 (SDS)-폴리 아크릴 아미드 겔 전기 영동 (PAGE)으로 분리하여 니트로 셀룰로오스 막으로 옮겼다. 막을 5% 탈지유 (0.2% Tween-20을 함유하는 Tris 완충 식염수에서)로 차단하고 관련 1 차 항체(1 : 5% 탈지유에 1000 희석)와 함께 4 °C에서 밤새 배양하고, 골격근 세포 합성을 억제하거나 활성화하는 단백질을 분석하였다. 다음으로, HRP- 접합된 2차 항체 (5% 탈지유에서 1 : 3000 희석)를 막에 첨가하고 실온에서 90분 동안 배양하였다. 밴드는 화학 발광 기판을 사용하여 개발되었고 eVo-6 카메라가 장착된 FUSION FX Spectra 프로그램(Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, France)을 사용하여 촬영하였다. 밴드 강도는 Image J 프로그램을 사용하여 정량화되었다.

[0074] 실시예 2. 본 발명에 따른 화합물의 골격근 세포 분화 활성 확인

[0075] 상기 실시예 1에서 분리한 [화학식 1]로 표기되는 화합물에 대한 C2C12 myoblasts의 cell viability를 3-(4-5-dimethyl-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 분석으로 측정된 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이 [화학식 1]로 표기되는 화합물은 50 μM의 농도에서 C2C12 세포에 대한 세포 독성 효과를 나타내지 않았다.

[0076] 이에 더하여, 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 세포 증식 분석방법을 사용하여 [화학식 1]로 표기되는 화합물의

골격근 세포 분화 활성을 평가하였다. 그 결과, 도 2b에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 화합물은 대조군(control)에 비해 myoblast의 분화를 유의하게 증가시키는 것을 확인하였다. 상기 결과로부터 부추에서 새롭게 분리 한 화합물은 골격근 성장 조절 효과를 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

[0078] 실시예 3. 본 발명의 화합물 처리에 따른 골격근 성장 관련 신호 전달 경로 조절 확인

[0079] 3-1. PI3K/Akt/mTOR 신호 전달 경로 상향 조절

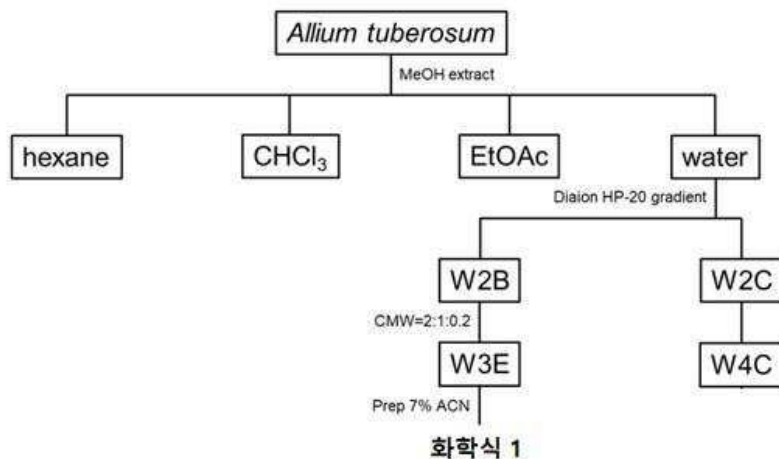
[0080] 실시예 1-5에 개시된 바와 같이 Western blot을 통해 골격근 성장 관련 신호 전달 경로를 확인한 결과, 도 3a 내지 3g에 나타난 바와 같이 본 발명의 화합물은 대조군(control)에 비해 p-PI3K, p-Akt, p-FoxO1, p-mTOR, p-70S6K 및 MyoD 단백질 발현 수준을 유의하게 증가시켰다. 즉, 본 발명에 따른 화합물은 p-PI3K/Akt를 통한 p-mTOR/p70S6K를 통해 근육 세포 성장을 유도하였다고 유추할 수 있다.

[0082] 상기 결과들로부터, 본 발명에 따른 화합물이 PI3K/Akt/mTOR 신호 전달 경로를 활성화하는 것을 알 수 있으며, 이에 따라, 골격근 발달에 관여하는 핵의 인자인 MyoD의 발현에 더 많은 영향을 미친 것으로 추론 할 수 있다. 따라서, 부추에서 분리된 [화학식 1]의 화합물이 PI3K/Akt/mTOR 경로를 촉진함으로써 골격근 성장 및 발달 효과를 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

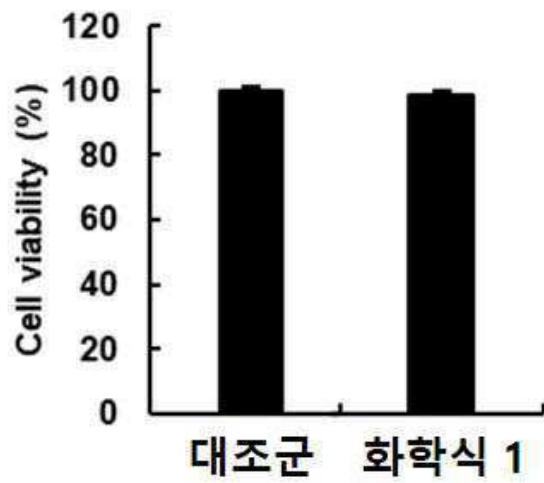
[0084] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

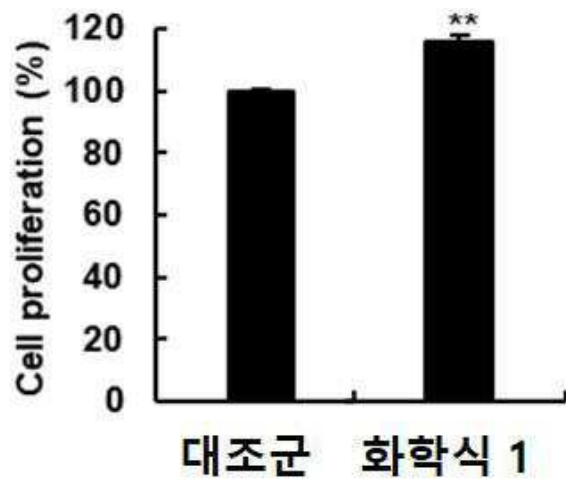
도면1



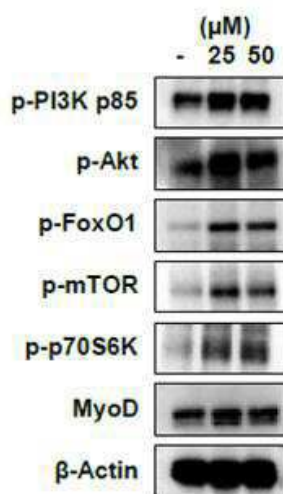
도면2a



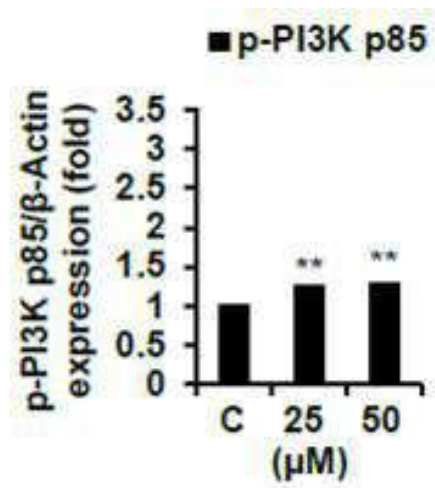
도면2b



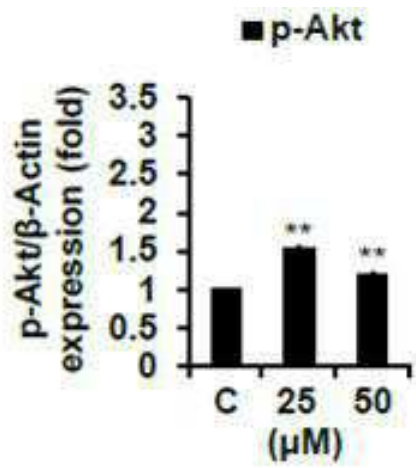
도면3a



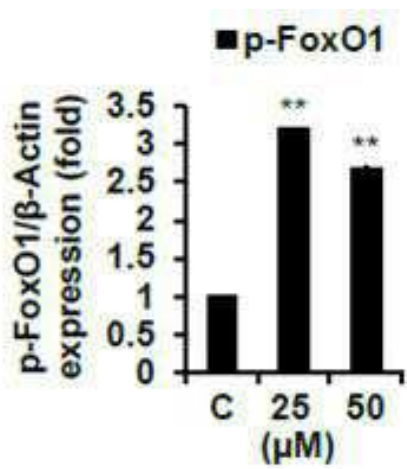
도면3b



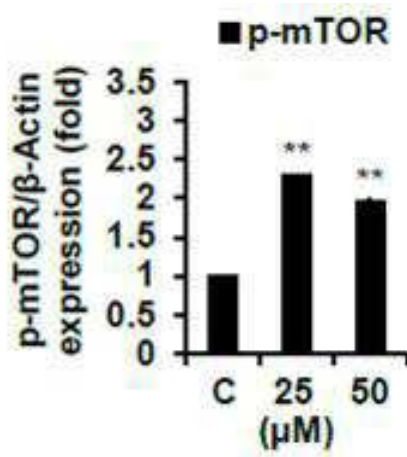
도면3c



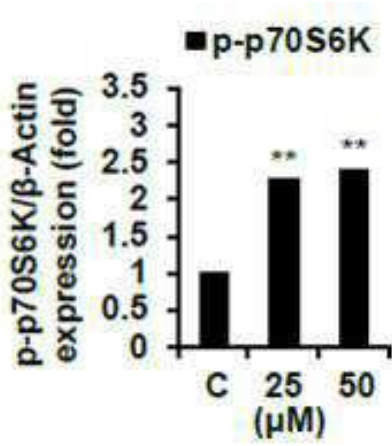
도면3d



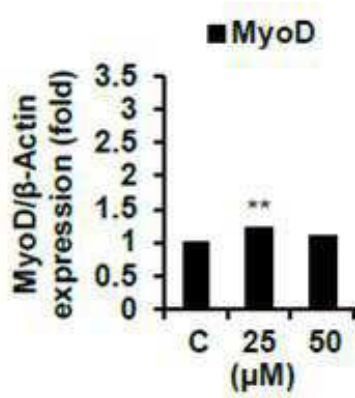
도면3e



도면3f



도면3g



도면4

