(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0098067
(43) 공개일자 2025년07월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/01 (2006.01) *A23L 33/18* (2016.01)
A61P 21/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/012 (2013.01)
A23L 33/18 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0188561
(22) 출원일자 2023년12월21일
심사청구일자 2023년12월21일

(71) 출원인
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
조철훈
서울특별시 관악구 관악로 1, 서울대학교(신림동)
김혜진
서울특별시 관악구 관악로 1, 서울대학교(신림동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인지평

전체 청구항 수 : 총 9 항

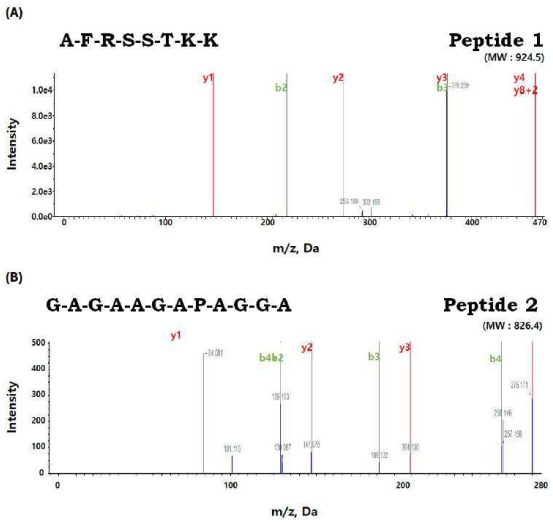
(54) 발명의 명칭 **소고기 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드를 포함하는 근위축증 또는 근감소증 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 소고기 가수분해물, 특히 소고기 유래 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드의 근위축증 또는 근감소증 예방, 개선 또는 치료 효과에 대한 것이다.

본 발명의 소고기 가수분해물 및 소고기 유래 펩타이드(BP)는 덱사메타손으로 인한 세포 생존력, 근관세포 직경 및 근육 성숙의 감소를 용량 의존적으로 효과적으로 대응했다. 또한, BP에서 분리된 펩타이드 1(AFRSSTKK) 및 펩타이드 2(GAGAAGAPAGGA) 서열은 모 물질에 비해 상당한 항위축 및 항산화 특성을 나타냈다. 따라서 본 발명의 소고기 가수분해물 및 그 유래 펩타이드는 모두 근육 위축을 해결하기 위한 천연 식이 치료제로서 유망한 잠재력을 나타낸다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류
A61P 21/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/316 (2013.01)
A23V 2250/55 (2013.01)
(72) 발명자
허현진
서울특별시 관악구 관악로 1, 서울대학교(신림동)
이동헌
서울특별시 관악구 관악로 1, 서울대학교(신림동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395077432
과제번호	RD010179
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	2025축산현안대응기술개발
연구과제명	소비수요 다양화 대응 재래소 유래 축산물 부가가치 향상 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서울대학교산학협력단
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

소고기 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드를 포함하는 근위축증 또는 근감소증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 소고기는 소의 갈비(Beef Rib), 안심(Beef Tenderloin), 등심(Beef Loin), 목심(Beef Chuck), 앞다리(Beef Brisket), 사태(Beef Shank), 양지(Beef Flank), 설도(Beef Rump), 우둔(Beef Round) 및 꼬리(Beef Tail) 로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 가수분해물은 소고기에 알칼라아제 (Alcalase), 프로티악스(ProteAX) 및 트립신(Trypsin)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 효소를 처리하여 제조된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 펩타이드의 분자량(Mw)은 200 ~ 2500 Da 인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 1 의 염기서열을 포함하는 펩타이드 1 및/또는 서열번호 2 의 염기서열을 포함하는 펩타이드 2 인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

소고기 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드를 포함하는 근위축증 또는 근감소증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

i) 소고기를 균질화하는 단계;

ii) 상기 균질화환 균질액에 알칼라아제 (Alcalase), 프로티악스(ProteAX) 및 트립신(Trypsin) 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 효소를 처리하여 가수분해 하는 단계; 및

iii) 상기 가수분해된 가수분해물을 한외여과 하는 단계;

를 포함하는 근위축증 또는 근감소증의 예방, 개선 또는 치료를 위한 소고기 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 제조방법은,

iv) 상기 한외여과된 여과물을 크기 배제 크로마토그래피로 펩타이드 크기별로 분류하는 단계;

를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 제조방법은,

v) 상기 분류된 여과물을 RP-HPLC로 펩타이드 극성별로 분획하는 단계;

를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 소고기 유래 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드의 근위축증 또는 근감소증 예방, 개선 또는 치료 효과에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 전체 체중의 약 40%를 차지하는 골격근은 운동 촉진, 열 생성, 장기 보호, 글리코겐 저장 및 혈액 순환 보조에 중요한 역할을 한다. 골격근량의 감소를 특징으로 하는 골격근 위축은 일상생활에 현저한 영향을 미치고 다양한 대사 문제를 일으킬 수 있다. 노화는 골격근 위축의 주요 원인으로, 근육량과 기능의 상당한 손실을 초래한다. 특히, 60세 이상 인구의 증가가 예상되면서(2013년 11%에서 20504년 22%로 증가할 것으로 예상됨), 연령 관련 근육 위축(근육 감소증)이 공중 보건 문제로 대두되고 있다. 일반적으로 근육 위축은 기아, 악액질, 심한 인슐린 감소증 및 대사성 산증과 같은 상태에서도 만연하며, 이는 종종 글루코코르티코이드(GC, glucocorticoids) 수치의 상승을 동반한다. 골격근의 GC 수치가 상승하면 여러 경로를 통해 단백질 분해가 합성을 능가하는 불균형이 발생할 수 있다. 최근 연구에서는 단백질 분해와 근육량 조절에서 유비퀴틴-프로테아좀 시스템의 중추적인 역할을 강조한다. 근육 RING 핑거 1(MuRF1) 및 근육 위축 Fbox(Atrogin-1)와 같은 근육 특이적 E3 유비퀴틴 리가제는 근육 위축 중에 높게 발현되며 골격근 조직에서 단백질 분해를 유도하는 것으로 알려져 있다. 반면에 Akt/포유류 라파마이신 표적(mTOR) 경로는 골격근 비대를 조절하고 근육 위축을 완화하는데 중요한 역할을 한다. p70S6K 및 4E-BP1과 같은 mTOR의 다운스트림 이펙터는 번역을 시작하고 단백질 합성을 촉진한다. 또한, 독립적으로 발생하거나 다른 경로와 결합하여 발생하는 골격근의 산화 스트레스 증가는 단백질 분해를 촉진하고 근육 위축에 기여하는 것으로 나타났다. 최근에는 의약품에 비해 부작용이 적으면서도 근육발달을 강화할 수 있는 천연물질 및 식품원에 대한 수요가 증가하고 있다. 단백질 가수분해물은 다양한 유익한 특성을 지닌 단백질 및 펩타이드의 잠재적 공급원으로 인식되어 왔다. 지난 40년 동안 소고기 가수분해물의 건강 증진 잠재력은 암세포에 대한 항증식 효과, 안지오텐신 전환 효소에 대한 억제 효과 및 항균 활성에 대한 보고를 통해 문서화되었다. 소고기 추출물은 C2C12에서 근모세포의 증식과 근관세포의 비대를 촉진하는 것으로 나타났다. 또한 소고기는 분지사슬아미노산(BCAA) 섭취에 중요한 기여자 중 하나이다. 류신, 이소류신, 발린과 같은 BCAA는 Atrogin-1 및 MuRF1 mRNA의 발현을 억제하고 단백질 합성을 자극하여 근육 위축을 감소시키는 효과가 있는 것으로 나타났다. 소고기에는 약 23.2%의 높은 단백질 함량이 포함되어 있으며 BCAA 농도가 높다. 콩에서 발견되는 것보다 약 2.4배 더 많다. 이러한 유망한 특성에도 불구하고 소고기 또는 소고기 유래 펩타이드의 잠재적인 항근육 위축 효과는 아직 조사되지 않았다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) KR 10-2019-0147895 (2019-11-18)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에 본 발명자들은 소고기 유래 펩타이드의 골격근 위축에 대한 효과를 제공하고자 예의 노력한 결과 소고기 가수분해물, 특히 소고기 유래 가수분해물 및 그 유래의 정제된 펩타이드의 잠재적인 항위축 효과를 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 소고기 유래 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드의 근위축증 또는 근감소증 예방, 개선 또는 치료 효과를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 소고기 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드를 포함하는 근위축증 또는 근감소증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 소고기는 소의 갈비(Beef Rib), 안심(Beef Tenderloin), 등심(Beef Loin), 목심(Beef Chuck), 앞다리(Beef Brisket), 사태(Beef Shank), 양지(Beef Flank), 설도(Beef Rump), 우둔(Beef Round) 및 꼬리(Beef Tail) 로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것이다.

[0011] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 가수분해물은 소고기에 알칼라아제 (Alcalase), 프로티악스(ProteAX) 및 트립신(Trypsin) 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 효소를 처리하여 제조된 것이다.

[0012] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 펩타이드의 분자량(Mw)은 200 ~ 2500 Da 인 것이다.

[0013] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 펩타이드는 서열번호 1 의 염기서열을 포함하는 펩타이드 1 및/또는 서열번호 2 의 염기서열을 포함하는 펩타이드 2 인 것이다.

[0014] 본 발명은 또한, 소고기 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드를 포함하는 근위축증 또는 근감소증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한 i) 소고기를 균질화하는 단계;

[0016] ii) 상기 균질화환 균질액에 알칼라아제 (Alcalase), 프로티악스(ProteAX) 및 트립신(Trypsin) 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 효소를 처리하여 가수분해 하는 단계; 및

[0017] iii) 상기 가수분해된 가수분해물을 한외여과 하는 단계;

[0018] 를 포함하는 근위축증 또는 근감소증의 예방, 개선 또는 치료를 위한 소고기 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드의 제조방법을 제공한다.

[0019] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 제조방법은,

[0020] iv) 상기 한외여과된 여과물을 크기 배제 크로마토그래피로 펩타이드 크기별로 분류하는 단계;

[0021] 를 추가적으로 포함하는 것이다.

[0022] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 제조방법은,

[0023] v) 상기 분류된 여과물을 RP-HPLC로 펩타이드 극성별로 분획하는 단계;

[0024] 를 추가적으로 포함하는 것이다.

발명의 효과

[0026] 본 발명의 소고기 가수분해물 및 소고기 유래 펩타이드(BP)는 덱사메타손으로 인한 세포 생존력, 근관세포 직경 및 근육 성숙의 감소를 용량 의존적으로 효과적으로 대응했다. 또한, BP에서 분리된 펩타이드 1(AFRSSTKK) 및 펩타이드 2(GAGAAGAPAGGA) 서열은 모 물질에 비해 상당한 항위축 및 항산화 특성을 나타냈다. 따라서 본 발명의 소고기 가수분해물 및 그 유래 펩타이드는 모두 근육 위축을 해결하기 위한 천연 식이 치료제로서 유망한 잠재력을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1 은 소고기 펩타이드(BP)의 항산화 활성(μM trolox 등가물)을 나타낸다. ABTS, 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, FRAP, ferric reducing antioxidant power. 데이터는 세 번의 독립적인 시험의 평균 ± SE로 표시된다.

도 2 는 덱사메타손(DEX)과 소고기 펩타이드(BP)가 C2C12 근관세포의 생존 가능성에 미치는 영향을 나타낸다. (A) C2C12 근관세포의 생존 가능성에 대한 BP의 영향. (B) DEX가 C2C12 근관세포의 생존 가능성에 미치는 영향. (C) DEX로 처리된 C2C12 근관세포의 생존 가능성에 대한 BP의 영향. 교류 다른 문자는 유의미한 차이를 나타냈다($p < 0.05$).

도 3 은 덱사메타손(DEX)으로 처리한 C2C12 근관세포의 단백질 분해 관련 마커에 대한 소고기 펩타이드(BP)의 효과를 나타낸다. 분화 6일째에 C2C12 근관세포를 24시간 동안 100 μM DEX 및 BP 농도(10-100 μg/mL)에 노출시켰다. 아무런 처리 없이도 조절이 유지되었다. A-F: 인산화된 Akt, FoxO1, 총 Akt, FoxO1 및 MuRF1 및 Atrogin-1의 mRNA 발현 수준을 각각 웨스턴 블롯팅 및 RT-qPCR로 측정하고 이를 β-actin으로 표준화했다. a-d 다른 문자는 유의미한 차이를 나타냈다($p < 0.05$).

도 4 는 덱사메타손(DEX) 처리된 C2C12 근관세포의 형태에 대한 소고기 펩타이드(BP)의 효과를 나타낸다. 분화 6일째에 C2C12 근관세포를 100 μM DEX 및 BP 농도(10-100 μg/mL)에 24시간 동안 노출시켰으며 대조군은 아무런 처리 없이 유지했다. 처리 후, 근관세포는 미오신 중쇄(빨간색)와 Hoechst 33342(파란색)로 염색되었다. (A)염색된 근관세포의 대표적인 사진을 형광 현미경(스케일 바 = 100 μm)으로 촬영했다. (B) 각 이미지에서 10개의 근관세포 직경을 측정하고 Image J 소프트웨어를 사용하여 평균값을 정량화했다(n = 10/웰, 각 그룹에서 3개의 웰을 측정했다. (C) 분화 지수 및 (D) 융합 지수를 측정했다. 무작위로 선택된 10개 필드에서 Image J 소프트웨어를 사용하여 정량화되었다. a-d 다른 문자는 유의미한 차이를 나타냈다($p < 0.05$).

도 5 는 덱사메타손(DEX)으로 처리한 C2C12 근관세포의 단백질 합성 관련 마커에 대한 소고기 펩타이드(BP)의 효과를 나타낸다. 분화 6일째에 C2C12 근관세포를 24시간 동안 100 μM DEX 및 BP 농도(10-100 μg/mL)에 노출시켰다. 아무런 처리 없이도 조절이 유지되었다. A-D: 인산화된 mTOR, 4EBP-1 및 p70S6K1의 수준은 웨스턴 블롯팅으로 측정되었으며 이는 β-actin으로 정규화되었다. a-d 다른 문자는 유의미한 차이를 나타냈다($p < 0.05$).

도 6 은 덱사메타손(DEX)으로 처리한 C2C12 근관세포의 항산화 효소에 대한 소고기 펩타이드(BP)의 효과를 나타낸다. 분화 6일째에 C2C12 근관세포를 100 μM DEX 및 BP 농도(10, 25, 50, 100 μg/mL)에 24시간 동안 노출시켰다. 아무런 처리 없이도 조절이 유지되었다. A-C: SOD1, GPx1 및 CAT에 대한 mRNA 수준을 RT-qPCR로 측정하고 β-actin으로 정규화했다. a-c 다른 문자는 유의미한 차이를 나타냈다($p < 0.05$).

도 7 은 덱사메타손(DEX)으로 처리된 C2C12 근관세포에서 일차 위축 마커 및 항산화 효소의 mRNA 발현에 대한 첫번째 펩타이드 분획(F1-F4)의 효과를 나타낸다. 분화 6일째에 C2C12 근관세포를 100 μM의 DEX와 50 μg/mL의 F1-F4에 24시간 동안 노출시켰다. 대조군(CON)은 아무런 처리 없이 유지되었다. B-F: MuRF1, Atrogin-1, SOD1, GPx1 및 CAT에 대한 mRNA 수준을 RT-qPCR로 측정하고 β-actin으로 정규화했다. a-d 다른 문자는 유의미한 차이를 나타냈다($p < 0.05$).

도 8 은 덱사메타손(DEX)으로 처리된 C2C12 근관세포에서 1차 위축 마커 및 항산화 효소의 mRNA 발현에 대한 F(FF1-FF9)의 두번째 펩타이드 분획의 효과를 나타낸다. 분화 6일째에 C2C12 근관세포를 100 μM의 DEX와 50 μg/mL의 FF1-FF9에 24시간 동안 노출시켰다. 대조군(CON)은 아무런 처리 없이 유지되었다. B-F: MuRF1, Atrogin-1, SOD1, GPx1 및 CAT에 대한 mRNA 수준을 RT-qPCR로 측정하고 β-actin으로 정규화했다. a-h 다른 문자는 유의미한 차이를 나타냈다($p < 0.05$).

도 9 는 FF2로부터 정제된 펩타이드의 분자량과 아미노산 서열을 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0031] 본 발명의 '예방'이란, 본 발명의 소고기 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드로 인해 근위축증 또는 근감소증 질환 내지 관련 질환이 억제되거나 그 발병이 지연되도록 하는 모든 행위를 의미한다.

[0032] 본 발명의 '개선' 또는 '치료'란, 본 발명의 소고기 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드로 인해 근위축증 또는 근감소증 질환 내지 관련 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도가 호전되거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.

[0034] 본 발명은 덱사메타손(DEX, dexamethasone)에 의해 유발된 근육 위축을 완화하는 데 있어 소고기 펩타이드(BP, beef peptides)의 잠재력을 조사하고 단백질 분해, 단백질 합성 및 산화 스트레스 경로에 초점을 맞춰 기본 세 가지 메커니즘을 확인했다. 마지막으로 정제 및 분리를 통해 BP의 항위축 효과를 강화 처리하였다. BP는 각각 0.67% 농도의 알칼라아제/프로티악스/트립신(Alcalase/ProteAX/Trypsin)으로 가수분해된 소고기 등심을 사용하여 생성되었으며, 3kDa를 통해 한외여과되었다. BP(10-100 μg/mL)는 근관세포(myotube) 직경, 분화 융합 및 성숙 지수의 DEX 유발 감소를 용량 의존적으로 중화했다($p < 0.05$). 또한 BP는 FoxO1 단백질 탈인산화를 크게 감소시켜 C2C12 근관세포의 단백질-1을 함유한 근육 RING-finger 및 근육 위축 F-box 단백질과 같은 근육 특이적 E3 유비퀴틴 리가제를 25 μg/mL($p < 0.05$)를 초과하는 농도로 억제했다. BP는 또한 mTOR, 4E-BP1 및 p70S6K1을 포함한 단백질 합성 마커의 인산화를 용량 의존적으로 향상시켰으며($p < 0.05$) 항산화 효소의 mRNA 발현을 증가시켰다. 크기 배제 및 극성 기반 분류를 통해 BP에서 파생된 분류된 펩타이드도 BP에 비해 향상된 항위축 효과를 입증했다. 이들 펩타이드는 일차 근육 위축 마커의 mRNA 발현을 하향 조절하는 반면 항산화 효소의 발현은 상향 조절했다. 구체적으로, BP의 분별된 펩타이드로부터 펩타이드 1(AFRSSTKK, 서열번호 1, MW 826.4) 및 펩타이드 2(GAGAAGAPAGGA, 서열번호 2, MW 924.5) 가 확인되었다. 이러한 발견은 BP, 특히 펩타이드 분획인 펩타이드 1 및 2가 E3 유비퀴틴 리가제 활성을 감소시켜 글루코코르티코이드 유발 골격근 위축을 완화하는 잠재적인 전략이 될 수 있음을 시사한다.

[0036] 따라서, 본 발명은 소고기 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드를 포함하는 근위축증 또는 근감소증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0037] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 소고기는 소의 갈비(Beef Rib), 안심(Beef Tenderloin), 등심(Beef Loin), 목심(Beef Chuck), 앞다리(Beef Brisket), 사태(Beef Shank), 양지(Beef Flank), 설도(Beef Rump), 우둔(Beef Round) 및 꼬리(Beef Tail) 로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 소고기는 소의 등심인 것일 수 있다.

[0038] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 가수분해물은 소에 알칼라아제 (Alcalase), 프로티악스(ProteAX) 및 트립신(Trypsin) 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 효소를 처리하여 제조된 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 가수분해물은 소에 알칼라아제 (Alcalase), 프로티악스(ProteAX) 및 트립신(Trypsin)을 순차적으로 처리하여 제조된 것일 수 있다.

[0039] 상기 각 효소들은 1 ~3 시간동안 처리될 수 있으며, 총 3 ~ 9 시간동안 처리될 수 있다.

[0040] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 펩타이드의 분자량(Mw)은 200 ~ 2500 Da 인 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 펩타이드의 분자량(Mw) 은 800 ~ 1000 Da 인 것일 수 있다.

[0041] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 펩타이드는 서열번호 1 의 염기서열을 포함하는 펩타이드 1 및/또는 서열번호 2 의 염기서열을 포함하는 펩타이드 2 인 것일 수 있다.

[0042] 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), 충진제, 증량제, 결합제, 아쥬반트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제 습윤제, 붕해제 또는 계면활성제, 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0043] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분(옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분 등 포함), 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 덱스트로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 말티톨, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오즈 및 하이드록시프로필 메틸-셀룰로즈 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.

[0044] 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 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, 항응집제, 향료, 유화제, 가용화제, 분산제, 향미제, 항산화제, 포장제, 안료 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0045] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제 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 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0046] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 복강내, 직장, 정맥, 근육, 피하 또는 자궁내 경막에 주사하는 주사제; 의 형태로 당업계에 공지된 방법에 따라 제형화할 수 있다.

[0047] 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 행크스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS (phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 덱스트로즈와 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.

[0048] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 약제학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 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. 본 발명의 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 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.

[0049] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양할 수 있다.

[0050] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0052] 본 발명은 또한, 소고기 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드를 포함하는 근위축증 또는 근감소증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공할 수 있다.

[0053] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 소고기는 소의 갈비(Beef Rib), 안심(Beef Tenderloin), 등심(Beef Loin), 목심(Beef Chuck), 앞다리(Beef Brisket), 사태(Beef Shank), 양지(Beef Flank), 설도(Beef Rump), 우둔(Beef Round) 및 꼬리(Beef Tail) 로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 소고기는 소의 등심인 것일 수 있다.

[0054] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 가수분해물은 소에 알칼라아제 (Alcalase), 프로티악스(ProteAX) 및 트립신(Trypsin) 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 효소를 처리하여 제조된 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 가수분해물은 소에 알칼라아제 (Alcalase), 프로티악스(ProteAX) 및 트립신(Trypsin)을 순차적으로 처리하여 제조된 것일 수 있다.

[0055] 상기 각 효소들은 1 ~3 시간동안 처리될 수 있으며, 총 3 ~ 9 시간동안 처리될 수 있다.

[0056] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 펩타이드의 분자량(Mw)은 200 ~ 2500 Da 인 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 펩타이드의 분자량(Mw) 은 800 ~ 1000 Da 인 것일 수 있다.

[0057] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 펩타이드는 서열번호 1 의 염기서열을 포함하는 펩타이드 1 및/또는 서열번호 2 의 염기서열을 포함하는 펩타이드 2 인 것일 수 있다.

[0058] 본 발명에 따른 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다. 일반 식품으로는 이에 한정되지 않지만 음료(알콜성 음료 포함), 과실 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지 콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게이트, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 버터, 치이즈 등), 식용식물 유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 소고기 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드를 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 영양보조제로는 이에 한정되지 않지만 캡슐, 타블렛, 환 등에 본 발명의 소고기 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드를 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 건강기능식품으로는 이에 한정되지 않지만 예를 들면, 본 발명의 소고기 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드 자체를 차, 쥬스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용(건강음료)할 수 있도록 액상화, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 본 발명의 소고기 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드를 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 소고기 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드와 근위축증 또는 근감소증 질환 예방 또는 개선 효과가 있다고 알려진 공지의 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다.

[0059] 본 발명의 소고기 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드를 건강음료로 이용하는 경우, 상기 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드; 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

[0060] 또한, 본 발명의 소고기 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드는 근위축증 또는 근감소증 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물의 유효성분으로 함유될 수 있는데, 그 양은 근위축증 또는 근감소증 질환 예방 또는 개선 작용을 달성하기에 유효한 양으로 특별히 한정되는 것은 아니나, 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%인 것이 바람직하다. 본 발명의 건강기능식품 조성물은 소고기 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드와 함께 근위축증 또는 근감소증 질환에 효과가 있는 것으로 알려진 다른 활성 성분과 함께 혼합하여 제조될 수 있다.

[0061] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강기능식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다.

[0063] 본 발명은 또한 i) 소고기를 균질화하는 단계;

[0064] ii) 상기 균질화환 균질액에 알칼라아제 (Alcalase), 프로티악스(ProteAX) 및 트립신(Trypsin) 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 효소를 처리하여 가수분해 하는 단계; 및

[0065] iii) 상기 가수분해된 가수분해물을 한외여과 하는 단계;

[0066] 를 포함하는 근위축증 또는 근감소증의 예방, 개선 또는 치료를 위한 소고기 가수분해물 또는 그 유래 펩타이드의 제조방법을 제공할 수 있다.

[0067] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 제조방법은,

[0068] iv) 상기 한외여과된 여과물을 크기 배제 크로마토그래피로 펩타이드 크기별로 분류하는 단계;

[0069] 를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

[0070] 상기 크기 배제 크로마토그래피는 여과물을 100~300 nm 의 파장으로 10 ~ 60분 동안 펩타이드 크기별로 분류하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 상기 크기 배제 크로마토그래피는 여과물을 200~250 nm 의 파장으로 35 ~ 45분 동안 펩타이드 크기별로 분류하는 것일 수 있다.

[0071] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 제조방법은,

[0072] v) 상기 분류된 여과물을 RP-HPLC로 펩타이드 극성별로 분획하는 단계;

[0073] 를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

[0074] 상기 RP-HPLC 는 여과물을 100~300 nm 의 파장으로 1 ~ 35분 동안 극성도에 따라 분류하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 상기 RP-HPLC 는 여과물을 200~250 nm 의 파장으로 1 ~ 5 분 및/또는 25~ 30분 동안 펩타이드 극성도에 따라 분류하는 것일 수 있다.

[0075] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 소고기는 소의 갈비(Beef Rib), 안심(Beef Tenderloin), 등심(Beef Loin), 목심(Beef Chuck), 앞다리(Beef Brisket), 사태(Beef Shank), 양지(Beef Flank), 설도(Beef Rump), 우둔(Beef Round) 및 꼬리(Beef Tail) 로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 소고기는 소의 등심인 것일 수 있다.

[0076] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 단계 ii) 의 효소는 소고기에 알칼라아제 (Alcalase), 프로티악스(ProteAX) 및 트립신(Trypsin)을 순차적으로 처리하여 제조된 것일 수 있다.

[0077] 상기 각 효소들은 1 ~3 시간동안 처리될 수 있으며, 총 3 ~ 9 시간동안 처리될 수 있다.

[0078] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 펩타이드의 분자량(Mw)은 200 ~ 2500 Da 인 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 펩타이드의 분자량(Mw) 은 800 ~ 1000 Da 인 것일 수 있다.

[0079] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 펩타이드는 서열번호 1 의 염기서열을 포함하는 펩타이드 1 및/또는 서열번호 2 의 염기서열을 포함하는 펩타이드 2 인 것일 수 있다.

[0081] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석하지 않는 것은 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명한 것이다.

실 시 예 1

[0083] **소고기 펩타이드의 제조**

[0084] 본 발명에서는 57개월령, 도체중량 373kg, 품질등급 2등급의 암컷 칡소(Chikso, 한우)를 사용하였다. 등심(M. longissimus lumborum)은 도드람 LPC(Anseong, Gyeonggi-do) 도축장에서 사후 24시간에 채취하여 냉장(4℃) 상태로 실험실로 운반되었다. 효소적 가수분해 과정은 10g의 등심을 40mL의 이중 증류수(DDW)로 균질화하는 것으로 시작되었다. 균질액에 0.67% 알칼라아제 (Alcalase; pH 8.0, 50℃), 0.67% 프로티악스(ProteAX; pH 7.0, 50℃및 0.67% 트립신(Trypsin; pH 8.0, 37℃)의 세 가지 효소를 순차적으로 첨가했다. 각 효소는 2시간 동안 작용하여 총 가수분해 과정은 6시간이 소요된다. 농도와 다음 공정은 실험실에서의 예비 연구를 통해 개발되었다. 효소 가수분해 후, 혼합물을 95℃에서 10분 동안 가열하여 효소를 불활성화시켰다. 가수분해물을 한외여과관(Vivaspin 20, Sartorius, Goettingen, Germany)에 넣고 4000 xg에서 30분간 원심분리(Combi R515, Hanil Co. Ltd., Daejeon, Korea)하여 펩타이드 분획물 수집을 용이하게 했다. 3 kDa 미만의 분자량을 갖는 "소고기 펩타이드(BP, beef peptides)"라고 한다. 샘플을 동결건조(PVTFD-10K, Ilshin Lab Co. Ltd., Seoul, Korea)하고 향후 분석을 위해 냉동고에 보관했다.

실 시 예 2

[0086] **BP의 항산화 활성 및 아미노산 조성**

[0087] <2-1> 항산화력

[0088] BP의 항산화력은 ABTS, DPPH 라디칼 소거 활성 및 FRAP 분석을 사용하여 평가되었다.

[0089] 구체적으로, DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 라디칼 소거 활성은, 총 150㎕의 샘플을 메탄올에 용해된 150㎕의 0.2mM DPPH 용액에 첨가했다. 이어서, 혼합물을 암실에서 25℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 517 nm에서의 흡광도는 항산화 표준물질로 트롤록스(trolox)를 사용하여 분광광도계(Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 측정되었다. 흡광도는 표준 곡선을 기반으로 trolox 등가 활성(㎛ol TE)으로 변환되었다.

[0090] ABTS(2,2-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonate)) 라디칼 소거 능력은 14mM ABTS+ 용액을 4.5mM 과황산칼륨과 1:1(v/v) 비율로 혼합하고 암실에서 25℃ 에서 16시간 동안 배양했다. 이어서, 생성된 혼합물을 734 nm에서의 흡광도가 0.70±0.02에 도달할 때까지 에탄올로 희석하였다. 이어서, 시료 50 ㎕와 ABTS 용액 950 ㎕를 혼합하고 25℃ 에서 30분간 반응시켰다. 734 nm에서의 흡광도는 UV/Vis 분광광도계(X-ma 3100, Human Co. Ltd., Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다. 흡광도는 항산화 활성으로 표준 곡선을 기준으로 트롤록스 등가 활성(㎛ol TE)으로 변환되었다.

[0091] FRAP(Ferric reducing antioxidant power) 활성 분석을 위해, FRAP 용액은 300mM 아세테이트 완충액(pH 3.6), 40mM HCl에 용해된 10mM 2,4,6-트리피리딜-S-트리아진, 20mM 염화제2철 6수화물을 10:1:1(v/v/v) 비율로 혼합하여 제조되었다. 이어서, 2.7 mL의 FRAP 용액, 270 ㎕의 DDW 및 90 ㎕의 샘플을 혼합하고 암실에서 37℃ 에서 30분간 배양했다. 593 nm에서의 흡광도는 UV/Vis 분광광도계(Human Co. Ltd.)를 사용하여 측정하였다. 흡광도는 표준 곡선을 기반으로 트롤록스(trolox) 등가 활성(㎛ol TE)으로 변환되었다.

[0092] 그 결과, [도 1]에 나타난 바와 같이, 항산화 활성은 ABTS의 경우 395.71 ㎛ol TE, DPPH의 경우 2.93 ㎛ol TE, FRAP의 경우 5.5 ㎛ol TE 였다. BP는 ABTS 분석에서 눈에 띄게 강력한 라디칼 소거 활성을 보여주었으며 계란 오브알부민, 우유 및 콩 가수분해물과 같은 물질보다 성능이 뛰어났다. 이는 전자를 기증하여 ABTS 라디칼을 중화하는 BP의 실질적인 능력을 나타냈다.

[0094] <2-2> 아미노산 조성

[0095] 등심(Beef lion)과 BP의 아미노산 조성은 6 N HCl을 사용하여 130℃ 에서 20시간 동안 산 가수분해를 수행했다. 아미노산 프로파일은 형광 검출기(1260FLD, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)가 장착된 HPLC 시스템(Ultimate3000, Thermo-Dionex, Sunnyvale, CA, USA)을 사용하여 측정했다. [표 1] 에서, BCAA는 이소류신, 류신, 발린의 총합이다. EAA는 히스티딘, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트레오닌 및 발린의 합계이다. ab 서로 다른 문자는 유의미한 차이를 나타낸다($p < 0.05$).

표 1

[0096]

Amino acids	Content (mg/ g dry matter)			Percentage (% of total)		
	BL	BP	SEM	BL	BP	SEM
Asp	77.60^a	61.55^b	1.344	9.90^a	8.00^b	0.100
Glu	149.60^a	114.75^b	1.964	19.10^a	14.90^b	0.000
Ser	32.85^b	36.05^a	0.335	4.20^b	4.70^a	0.000
His	29.9^b	31.95^a	0.215	3.80^b	4.15^a	0.035
Gly	33.30^a	29.15^b	0.177	4.25^a	3.80^b	0.035
Thr	41.00^b	45.05^a	0.146	5.25^b	5.85^a	0.050
Arg	59.15^a	54.90^b	0.530	7.55^a	7.15^b	0.050
Ala	48.75^b	54.05^a	0.626	6.20^b	7.05^a	0.035
Tau	1.40	1.55	0.035	0.20	0.20	0.000
Tyr	30.30^b	33.90^a	0.412	3.90^b	4.40^a	0.000
Val	40.50^b	48.05^a	0.715	5.15^b	6.25^a	0.050
Met	19.50	19.15	1.647	2.50	2.50	0.212
Phe	34.55^b	42.90^a	0.530	4.40^b	5.55^a	0.035
Ile	40.75^b	47.40^a	0.675	5.20^b	6.15^a	0.035
Leu	68.95^b	85.30^a	0.895	8.80^b	11.10^a	0.071
Lys	58.80^a	49.00^b	1.177	7.50^a	6.35^b	0.106
Pro	17.10	14.65	1.028	2.20	1.90	0.100
Total	783.95	769.33	11.091	100.00	100.00	0.000
BCAAs	150.18^b	180.74^a	2.263	19.16^b	23.50^a	0.146
EAAs	333.94^b	368.76^a	4.983	42.60^b	47.93^a	0.071

[0098] [표 1]은 소고기 등심(BL)과 BP의 단백질이 모두 17개의 아미노산으로 구성되어 있으며 글루탐산과 류신이 가장 풍부하다는 것을 보여준다. 특히 식물 기반 단백질은 일반적으로 동물 유래 단백질보다 류신 함량과 소화율이 낮다. 이는 동일한 용량의 동물 유래 단백질에 비해 열등한 근육 동화작용 효과를 나타냈다. 본 발명에서는 혈압의 BCAA 및 필수 아미노산(EAA) 농도가 각각 180.74 mg/g 및 368.76 mg/g인 것으로 나타났다. 이 값은 150.18 mg/g 및 333.94 mg/g인 BL의 값보다 현저히 높았다($p < 0.05$). BL이 가수분해되면 BP의 발린, 이소류신 및 류신 함량이 각각 48.0, 47.4 및 85.3 mg/g으로 크게 증가하여 BCAA가 전체적으로 4.3% 증가했다. 특히 혈압에서 두 번째로 풍부한 아미노산인 류신은 8.8%에서 11.1%로 2.3%로 가장 큰 폭의 증가세를 보였다. 류신은 S6K 및 4E-BP131로 mTOR의 인산화를 자극하여 단백질 합성을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 결과는 근육 위축에 대응하기 위해 BP, 특히 류신의 증가된 BCAA 함량의 잠재력을 강조했다.

실 시 예 3

[0100] **세포 생존율에 대한 BP의 영향**

[0101] BP가 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

[0102] C2C12 마우스 세포주(CRL-1772)는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassa, VA, USA)에서 구입했다. 세포를 10% Fetal Bovine Serum(FBS; Gibco, NY, USA)이 보충된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Welgene, Gyeongsan, Korea)으로 구성된 성장배지를 사용하여 37℃, 5% CO2 배양기에서 배양하였다. 1% 항생제-항진균제(AA; Gibco, Gaithersburg, MD, USA). 세포 배양이 100% 컨플루언시(confluency)에 도달하면 배양 배지를 2% 말 혈청(HS; Biowest, Nuaille, France)과 1% AA가 포함된 DMEM으로 구성된 분화 배지로 교체했다. 분화 배지는 2일마다 새로 고쳐졌다. 6일 간의 분화 후, 근관세포가 완전히 형성되면, 추가 실험을 위해 분화 배

지를 1% AA를 함유하는 무혈청 DMEM 배지로 교체했다. 실험에 사용된 세포는 계대번호 4~6번 이내였다.

[0103] C2C12 근관세포의 세포 생존능력에 대한 BP의 영향은 수용성 테트라졸륨염-8(WST-8) 분석 키트(Biomax, SEOUL, Korea)를 사용하여 평가되었다. C2C12 세포를 48-웰 플레이트에 5 x 10^4 세포/웰의 밀도로 시딩하고 5% CO2와 37℃ 의 성장 배지에서 배양했다. 컨플루언시(confluency)에 도달하면 배양배지를 분화배지로 교체하고, 세포를 6일 동안 추가로 배양하였다. 이어서, BP(0, 10, 50, 100, 250, 500 μg/mL), DEX(0-100 μM), DEX(100 μM) 및 BP 처리를 웰에 첨가했다. 대조군은 처리를 받지 않은 상태로 유지되었다. 24시간 배양 후, 50 μL의 WST-8 시약을 각 웰에 첨가했다. 추가로 2시간 동안 인큐베이션한 후, 분광광도계를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 결정했다. 처리된 세포의 흡광도를 대조군과 비교하여 세포 생존율의 백분율을 계산했다.

[0104] BP 단독(0, 10, 50, 100 μg/mL)의 세포 생존력을 초기에 평가한 결과, BP는 테스트한 모든 농도에서 C2C12 근관세포에 세포 독성이 없는 것으로 나타났다(도 2A). 예상한 대로 DEX는 용량 의존 방식으로 세포 생존력을 감소시켰다(도 2B). 관찰된 DEX에 의한 세포 생존력 감소를 바탕으로 DEX의 농도는 100 μM로 설정되었으며, 이 농도에서 단백질 분해가 효과적으로 유도되었다. 다양한 농도의 BP(0, 10, 25, 50, 100 μg/mL)로 처리한 경우 100 μg/mL의 BP 농도는 DEX에 의해 유발된 세포 생존력 감소를 효과적으로 완화했다(도 2C). DEX는 활성 산소종을 생성하여 DNA 가닥의 손상을 시작하여 골격근의 세포 사멸과 근육 소모에 기여한다. 따라서 이러한 결과는 BP에 의한 C2C12 근관세포의 세포 생존력 증가가 근육 근관세포에 대한 DEX 유발 손상을 효과적으로 완화할 수 있는 잠재력을 가질 수 있음을 시사한다. 더욱이, 이러한 경향은 항위축 특성을 갖는 다른 생리활성 화합물에서도 관찰되었다.

실 시 예 4

[0106] **근관세포 특성 및 성숙에 대한 BP의 영향**

[0107] 정상적인 상황에서 근모세포가 근관세포로 분화되면 세포 융합으로 인해 근섬유 수가 증가하여 근섬유 직경이 증가한다. 그러나 근육 위축은 근육 단백질 분해로 인해 섬유의 수와 직경이 모두 감소하여 궁극적으로 근육량 손실로 이어진다. 근관세포 직경, 분화 지수, 융합 지수 및 성숙 지수와 같은 매개 변수에 초점을 맞춰 근육 위축을 완화하는 데 BP의 잠재력을 평가하기 위해 면역 세포 염색법을 사용했다 (도 3A).

[0108] 구체적으로, 상기 <실시예 3> 에서의 세포주에서, 근육 위축은 합성 글루코코르티코이드인 덱사메타손(DEX; Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA)을 사용하여 유도되었다. 본 발명에서 세포는 24시간 동안 100 μM의 DEX 농도에 노출되었다. C2C12 근관세포를 DEX와 함께 다양한 농도의 BP(0, 10, 25, 50, 100 μg/mL)로 24시간 동안 처리했다. 처리되지 않은 샘플(대조군)은 DEX 또는 BP로 처리되지 않은 분화된 근관세포로 구성된다. 근육 위축과 관련된 형태학적 변화는 Nikon 현미경(Nikon, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰되었다.

[0109] 면역형광은 C2C12 근관세포를 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline(DPBS; Welgene, Gyeongsan, Korea)에서 4% 파라포름알데히드로 4℃ 에서 30분간 고정시켰다. 고정 후, 세포를 DPBS로 2회 세척하고 0.2% Triton X-100(Sigma-Aldrich)을 사용하여 15분 동안 투과화시켰다. 비특이적 결합을 최소화하기 위해 세포를 처음에 10% 염소 혈청(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)과 함께 1시간 동안 배양했다. 그런 다음 세포를 미오신 중쇄에 대한 1차 항체(MAB 4470, 1:200으로 희석; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)로 처리하고 4℃ 에서 밤새 배양했다. 결합되지 않은 1차 항체를 제거하기 위해 세척한 후, 근관세포를 2차 항체(A-11001, 1:500 희석; Invitrogen, Waltham, MA, USA)로 처리하고 4℃ 에서 밤새 배양했다. 핵은 Hoechst 33342(1:1,000 희석; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 사용하여 4℃ 에서 10분간 염색되었다. 그런 다음 세포를 세척하고 배지를 DPBS로 교체했다. 염색된 C2C12 근관세포의 이미지는 디지털 카메라(Nikon, Japan)가 장착된 역형광현미경을 사용하여 200× 배율로 촬영되었다.

[0110] 근관세포의 형태학적 평가를 위해 각 처리 그룹의 총 150개 근관세포의 평균 직경을 5개의 서로 다른 무작위 필드에 걸쳐 측정했다. 측정은 NIH ImageJ 소프트웨어(Bethesda, MD, USA)를 사용하여 수행되었다. 분화지수: Hoechst로 염색된 핵을 갖는 세포의 전체 수에 대한 미오신 중쇄로 염색된 세포 내 핵의 수의 비율로 계산하였다. 융합지수 : 총 핵수 25에 대하여 2개 이상의 핵을 갖는 미오신 중쇄로 염색된 근관세포 내의 핵 수의 비율을 구하여 결정하였다. 성숙지수 : 5개 또는 그 이상의 핵을 갖는 근관세포의 수로 정의하였다.

[0111] 그 결과, 본 발명에서 DEX 처리된 C2C12 근관세포에서 성숙한 근관세포 직경과 지표의 현저한 감소가 관찰되었다. 대조군과 비교하여 100 μM DEX에 의한 근관세포 위축이 성공적으로 유도되었음을 나타냈다(도 3B-E). 대조

적으로, 50 μg/mL 이상의 농도에서 BP는 C2C12 근관세포에서 이러한 모든 DEX 유발 감소를 효과적으로 역전시켰다($p < 0.05$). 따라서 결과는 근육 위축에 대한 근관세포 형태학적 매개변수에 대한 BP의 보호 효과를 시사했다.

[0112] 근육 위축 유도 동안 DEX는 근육 분화에 관여하는 전사 인자로서 미오겐(myogenin)과 MyoD1(myogenic differentiation 1)을 저하시켜 근육 위축 동안 근육 질량 손실을 초래한다. 따라서 미오겐과 MyoD를 상향 조절하면 성숙한 근관세포 직경과 C2C12 근관세포 지수의 감소를 방지하는 데 도움이 될 수 있다. 그러나 본 발명에서 BP는 미오겐과 MyoD의 mRNA 발현 수준을 크게 변경하지 않았다. 소고기 추출물은 C2C12 세포에서 근모세포 증식과 근관세포 성장을 촉진했지만 MyoD 및 미오겐과 같은 분화 마커에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 근육 분화에 대한 무시할 만한 효과에도 불구하고 BP는 근육 세포 성장을 촉진하고(도 2C) 근관세포 직경과 융합 지수를 증가시켰다(도 3). DEX 유발 근육 위축은 여러 가지 방법으로 억제될 수 있으므로 BP는 근육 세포 분화의 직접적인 조절 이외의 경로를 통해 잠재적인 항위축 효과를 가질 수 있다.

실 시 예 5

[0114] **근관세포의 단백질 분해에 대한 BP의 효과**

[0115] DEX는 PI3K/Akt/mTOR 경로를 억제하여 근육 위축을 유도하는 능력으로 널리 알려져 있다. Akt는 mTOR 및 그 다운스트림 효과기(4E-BP1 및 S6K1)를 통해 단백질 번역을 촉진하여 동화작용 조절제 역할을 한다. 이는 또한 근육 위축 동안 단백질 분해를 시작하는 데 관여하는 Forkhead Box O(FoxO) 전사 인자의 상향 조절을 차단하기 위해 단백질 분해를 억제하는 데에도 관여한다. FoxO 계열의 탈인산화는 일차 근육 위축 유전자인 MuRF1 및 Atrogin-1의 전사 활성화를 상향 조절한다. DEX 유발 근육 위축 모델에서 BP의 효과를 평가하기 위해 먼저 Akt의 단백질 발현을 조사했다.

[0116] 구체적으로, RT-qPCR에 의한 mRNA 발현 분석은 전체 RNA는 제조사의 프로토콜에 따라 EcoPURE total RNA 분리 키트(E2075; EcoTech Biotechnology, Hanam, Korea)를 사용하여 분리하였다. 추출된 RNA의 순도는 260 nm와 280 nm에서의 흡광도비를 측정하여 결정하였다. Applied Biosystems(Framingham, MA, USA)의 High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit를 사용하여 동일한 양의 고품질 총 RNA를 cDNA 합성했다. RTqPCR에는 SYBR™ Green PCR Master Mix(Applied Biosystems)를 사용했다. 유전자 증폭은 ABI 7300 Real-Time PCR System(Applied Biosystems)을 사용하여 수행되었다. 사이클링 조건은 40사이클에 걸쳐 95℃ 에서 15초(denaturation), 58.3~61.3℃ 에서 15초(annealing), 72℃ 에서 15초(extension)로 설정되었다. 상대적인 mRNA 발현 수준을 정량화하고 β-액틴으로 정규화했다.

[0117] 그 결과, [도 4] A-B는 Akt의 전체 단백질 수준은 영향을 받지 않았지만 p-Akt의 발현은 DEX에 의해 감소되었음을 보여준다. 그러나 BP는 p-Akt 단백질 발현의 용량 의존적 증가를 가져왔고($p < 0.05$), 이는 근관세포에서 Akt의 활성화를 나타냈다. FoxO1의 활성은 p-FoxO1 수준에서 알 수 있듯이 인산화 상태에 의해 영향을 받았다. FoxO1의 단백질 발현은 DEX에 의해 크게 증가한 반면, p-FoxO1 발현은 대조군에 비해 감소했다(도 4A, C 및 D). 그러나 BP는 FoxO1의 단백질 발현을 감소시켰으며 동시에 DEX에 의해 유도된 p-FoxO1 수준을 증가시켰다($p < 0.05$).

[0118] 또한 DEX 처리된 C2C12 근관세포에서 근육 위축을 완화하는 데 BP의 역할을 확인하기 위해 MuRF 및 Atrogin-1의 mRNA 발현을 검사했다. MuRF1과 Atrogin-1의 mRNA 발현 패턴은 근육 위축 유발 조건에서 강화되어 주요 근육 위축 마커 역할을 한다는 것이 잘 알려져 있다. MuRF1과 Atrogin-1의 상류 조절자 역할을 하는 FoxO1은 이들의 상향 조절을 유발하여 근육 단백질 분해와 그에 따른 근육 위축을 유발한다. [도 4] E-F는 MuRF1과 Atrogin-1의 mRNA 수준이 DEX에 의해 크게 증가했음을 보여준다. 그러나 BP는 이러한 근육 위축 마커의 mRNA 수준을 용량 의존적으로 감소시켰다($p < 0.05$). 이러한 결과는 BP가 MuRF1과 Atrogin-1에 의해 매개되는 단백질 분해를 억제함으로써 근육 위축을 약화시킨다는 것을 시사한다. 이 결과는 [도 3]의 DEX 처리 근관세포에서 관찰된 향상된 성숙과도 상관관계가 있었다.

실 시 예 6

[0120] **근관세포에서 단백질 합성(비대)에 대한 BP의 효과**

[0121] 단백질 합성에 대한 BP의 조절 효과는 C2C12 근관세포에서 Akt의 하류 마커인 mTOR를 상기 <실시예 5> 와 같은 방법으로 조사하였다.

[0122] 그 결과, DEX는 pmTOR의 단백질 발현을 감소시켰다. 그러나 BP는 특히 100㎍/mL의 BP 농도에서 DEX에 의해 감소된 p-mTOR 수준의 단백질 발현을 회복했다(도 5B). 또한, BP는 p-4EBP1의 단백질 발현을 용량 의존적으로 유의하게 증가시켰으며, 50 ㎍/mL에서는 p-p70S6K1의 수준도 증가시켰다(도 5C 및 D) ($p < 0.05$). 4E-BP1과 p70S6K1의 인산화는 단백질 번역 개시와 리보솜 단백질 S638의 인산화를 조절하여 단백질 합성을 촉진한다. 따라서 이러한 결과는 BP가 DEX로 인한 단백질 합성 감소를 완화하여 근육 위축에 대응할 뿐만 아니라 단백질 비대를 촉진할 수도 있음을 의미했다. 이 해석은 [도 3] A-E에 제시된 면역염색 이미지에서 관찰된 패턴에 의해 추가로 입증된다.

실 시 예 7

[0124] **근관세포의 항산화 효소에 대한 BP의 효과**

[0125] SOD1, GPX1 및 CAT으로 구성된 1차 항산화 효소 시스템은 근육 위축으로 유발된 산화 스트레스 상황에서 ROS 독성을 공동으로 중화한다. 본 발명에서 BP는 특히 50㎍/mL보다 높은 농도에서 DEX에 의해 감소된 이러한 항산화 효소의 mRNA 발현을 크게 상향 조절했다(도 6A-C). 이러한 결과는 BP(395.71 ㎛ol TE, 도 1)의 강력한 라디칼 소거 활성에 의해 뒷받침된다. 이러한 발견을 고려할 때, BP는 항산화제로 작용하여 C2C12 근관세포에서 DEX로 유발된 근육 위축을 막을 수 있다고 제안된다.

실 시 예 8

[0127] **혈압 정화 및 항위축 효과**

[0128] 펩타이드 분리 및 정제는 복잡한 혼합물을 개별 구성 요소로 분리할 수 있게 하고, 정확한 특성 분석과 뚜렷한 생물 활성의 조사를 촉진하므로 생물 분석 연구에서 중요한 단계이다. 이 프로세스는 얻은 결과의 신뢰성과 특이성을 크게 향상시켜 각각의 차등 효과를 드러냈다. 펩타이드는 주어진 생물학적 과정을 가질 수 있다. 이러한 이해를 바탕으로 BP는 펩타이드 크기에 따라 분류되어 구성 펩타이드 전반에 걸친 생체 활성의 잠재적 변화를 조사했다.

[0129] 50 ㎍/mL 농도의 BP는 단백질 분해 감소, 단백질 합성 강화 및 항산화 효소 활성 증가와 같은 관찰된 중요한 효과로 인해 BP와 비교하여 펩타이드의 효능을 검증하기 위한 추가 분석을 위해 선택되었다. 구성 펩타이드 전반에 걸친 생체 활성의 차이를 평가하기 위해 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 펩타이드 크기를 기준으로 BP를 분류하여 [도 7] A에 표시된 대로 F1, F2, F3 및 F4로 표시된 4개의 분획을 생성했다.

[0130] 구체적으로, 겔 여과 크로마토그래피로서 크기 배제 크로마토그래피는 SuperdexTM 30 증가 10/300 GL 컬럼(10 x 300 mm, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)을 사용하여 정제 프로토콜에 따라 수행되었다. BP를 150mg/mL으로 준비 후 용출 완충액으로 DDW를 사용하여 실온에서 0.5 mL/min의 유속으로 용출했다. 용출된 용액은 자동 분획 수집기를 사용하여 자동으로 분획으로 수집되었다. 이들 분획의 흡광도는 215nm의 파장에서 측정되었다. 추가 분별을 위해 4개 분획(F1-F4)을 동결건조한 후 <실시예 5>에 설명된 방법을 사용하여 DEX 처리 C2C12 근관세포에 대한 항위축 효과를 평가하는 데 사용했다.

[0131] 그 결과, 펩타이드 분획 F2, F3 및 F4는 BP에 비해 일차 근육 위축 마커(MuRF1 및 Atrogin-1)의 mRNA 발현이 더 크게 감소한 것으로 나타났다($p < 0.05$; 도 7B-C). 항산화 활성과 관련하여 F2와 F3 모두 SOD1의 mRNA 발현이 증가한 것으로 나타났다(도 7D). 특히 F3은 GPx1의 mRNA 발현이 가장 높았으며(도 7E), BP를 능가했다. 또한 BP와 F3 모두 CAT의 가장 높은 mRNA 발현을 보여주었다(도 7F). 이러한 결과는 F3가 BP에 비해 항위축 효과와 높은 항산화 특성에 대한 강력한 잠재력을 제공할 수 있음을 시사한다. 결과적으로 본 발명자들은 분획 F3에 대한 자세한 분석을 수행하기로 결정했다.

실 시 예 9

[0133] **BP 유래 분획의 정제 및 항위축 효과**

[0134] 추가 조사에는 RP-HPLC를 사용한 F3의 극성 기반 정제가 포함되어 FF1-FF9로 표시된 9개 분획으로 분리되었다(도 8A).

[0135] 가장 강력한 항위축 및 항산화 효소 활성을 나타내는 겔 여과 크로마토그래피에서 선택된 분획 F3을 RP-HPLC(Ultimate 3000, Thermo Dionex)에서 SynergiTM 4 μm Hydro-RP(80 Å, 250 × 4.6 mm; Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA)를 사용하여 추가로 정제했다. 샘플(100 mg/mL)을 DDW에 용해시키고 컬럼에 로딩했다. 유속은 1mL/분으로 설정되었고, 컬럼은 이동상 A(DDW 내 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA))로 평형을 이루었다. 용출은 이동상 B(아세토니트릴 중 0.1% TFA)부터 시작하여 0~40%의 구배로 35분 동안 수행되었다. 215 nm에서의 흡광도는 UV 검출기를 사용하여 기록되었다. 분획을 자동으로 수집하고 동결건조했다. 이어서, 동결건조된 RP-HPLC 분획(FF1-FF9)을 사용하여 <실시예 5>에 설명된 방법을 사용하여 DEX 처리 C2C12 근관세포에 대한 항위축 효과를 평가했다.

[0136] 그 결과, FF1-FF3 및 FF7-FF9는 BP 및 F3과 비교할 때 일차 근육 위축 마커의 수준이 감소한 것으로 나타났다($p < 0.05$). 모든 분별된 펩타이드 중에서 FF2와 FF9는 일차 근육 위축 마커의 발현 수준이 가장 감소한 것으로 나타났다(도 8B-C). 또한 항산화 특성 측면에서 FF2는 다른 분획(FF1, FF3-FF9)에 비해 SOD1 및 GPx1에 대해 가장 높은 mRNA 수준을 나타냈다($p < 0.05$)(도 8D-E). DEX에 비해 분수 간 CAT 수준에는 눈에 띄는 차이가 없었다(도 8F). 따라서 상당한 항위축 및 항산화 특성을 고려하여 FF2의 펩타이드 서열에 대해 추가 조사를 실시했다.

실 시 예 10

[0138] **BP에서 분리된 항위축 잠재력이 높은 펩타이드의 아미노산 서열 분석**

[0139] 200~2500 범위의 전체 스캔 질량 스펙트럼 내에서 다중 하전 이온의 디콘볼루션을 통해 확인된 펩타이드의 분자량이 결정되었다(도 9). 마지막으로, LC-MS/MS는 FF2에서 두 개의 펩타이드를 식별했다. 구체적으로, 선별된 RP-HPLC 분획의 아미노산 서열은 HPLC(Ultimate 3000, Thermo Dinex) 시스템에 연결된 질량분석기(Triple TOF ®5600+ system, AB SCIEX, Framingham, MA, USA)를 이용하여 분석하였다. 컬럼 C8(Zorbax 300SB-C8 RP, Agilent Technologies)에서 이동상 A(물 중 0.1% 포름산)와 이동상 B(아세토니트릴 중 0.1% 포름산)를 사용하여 0.3mL/min의 유속을 유지하면서 분리를 수행했다. 자동 샘플러 온도는 4℃ 로 유지되었으며 각 샘플에는 5μL의 주입량이 사용되었다. 질량 스펙트럼은 이온 스프레이 전압을 5500V로 설정한 포지티브 전기 스프레이 이온화 조건에서 얻었다. 소스 온도는 500℃ 로 고정하고 커튼 가스, 이온 소스 가스 1 및 이온 소스 가스 2 압력은 50으로 설정했다. 각각 50psi와 25psi 이었다. 200~2500의 m/z 범위에 대한 질량 스펙트럼을 획득하기 위해 MS 전체 스캔 모드가 사용되었다. 데이터 수집은 Analyst TF 1.7 소프트웨어를 사용하여 실행되었으며 후속 데이터 분석은 ProteinPilot 4.5 소프트웨어를 사용하여 수행되었다.

[0140] 그 결과, 서열은 펩타이드 1; AFRSSTKK(MW 924.5; 도 9A) 및 펩타이드 2; GAGAAGAPAGGA(MW 826.4; 도 9B)이다. 펩타이드의 생체활성과 기능성은 아미노산 조성, 구조, 극성 및 길이에 따라 달라진다.

[0141] 본 발명에서 분리된 펩타이드 1과 2도 각각 8개와 12개의 아미노산을 가지고 있다. 이러한 짧은 펩타이드는 시험관 내에서 근모세포 또는 근관세포의 증식 또는 분화를 향상시키는 잠재력을 보여주었다. 펩타이드 1의 N-말단에 있는 'AF' 서열은 알라닌과 페닐알라닌의 존재에 의한 소수성 특성으로 인해 효과적인 막 상호작용에 대한 잠재력을 나타낼 수 있다. 더욱이, 펩타이드 1의 상당 부분(75%)은 친수성 경향을 나타내며, 이는 수성 매질에서의 용해도를 향상시키고 극성 세포막 구성 요소와의 상호 작용을 촉진할 수 있다. 펩타이드 1이 나타내는 이러한 양친매성 특성은 세포 투과 펩타이드(CPP) 능력으로서의 잠재력을 암시할 수 있다. 1차 양친매성 CPP의 개념은 핵 국소화 신호와 함께 세포막에 부착하기 위한 소수성 도메인을 보유하는 키메라 펩타이드를 의미한다. 더욱이, 아르기닌(R)과 두 개의 라이신(K) 잔기의 존재는 잠재적으로 다음과 상호작용을 가능하게 할 수 있다. 음으로 하전된 세포막은 펩타이드 1에 양이온 특성을 부여한다. 따라서 펩타이드 1의 소수성과 친수성 특성의 독특한 조합은 세포 시스템에서 효과적인 막 상호 작용 및 용해도에 대한 잠재력을 강조할 수 있다.

[0142] 대조적으로, 펩타이드 2는 친수성 잔기와 소수성 잔기가 균형 있게 혼합되어 있으며 글리신이 특히 널리 퍼져 있다. 글리신은 이전에 보고된 항위축성 펩타이드에서 자주 발견된다. 연구에서는 또한 근육 위축을 예방하는 데 글리신의 효과가 입증되었다. 특히 영양 섭취가 제한된 조건에서 더 높은 농도의 글리신이 근육 분해를 예방하는 데 유익한 요인이 될 수 있다고 보고된 바 있다. 이용 가능한 발견에 기초하여, 펩타이드 2, 특히 높은 글

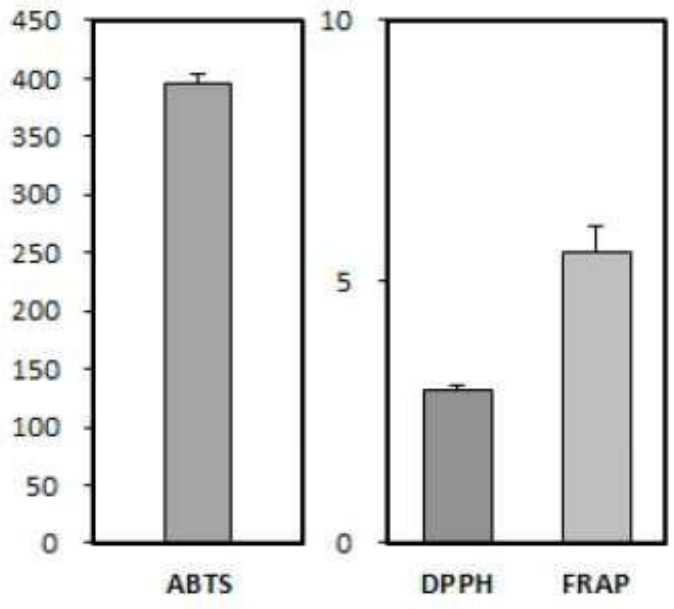
리신 함량을 특징으로 하는 펩타이드 2는 근육 위축을 표적으로 하는 치료 중재를 위한 유망한 후보로서 역할을 할 수 있는 잠재력을 갖고 있는 것으로 판단하였다.

[0144] **[통계분석]**

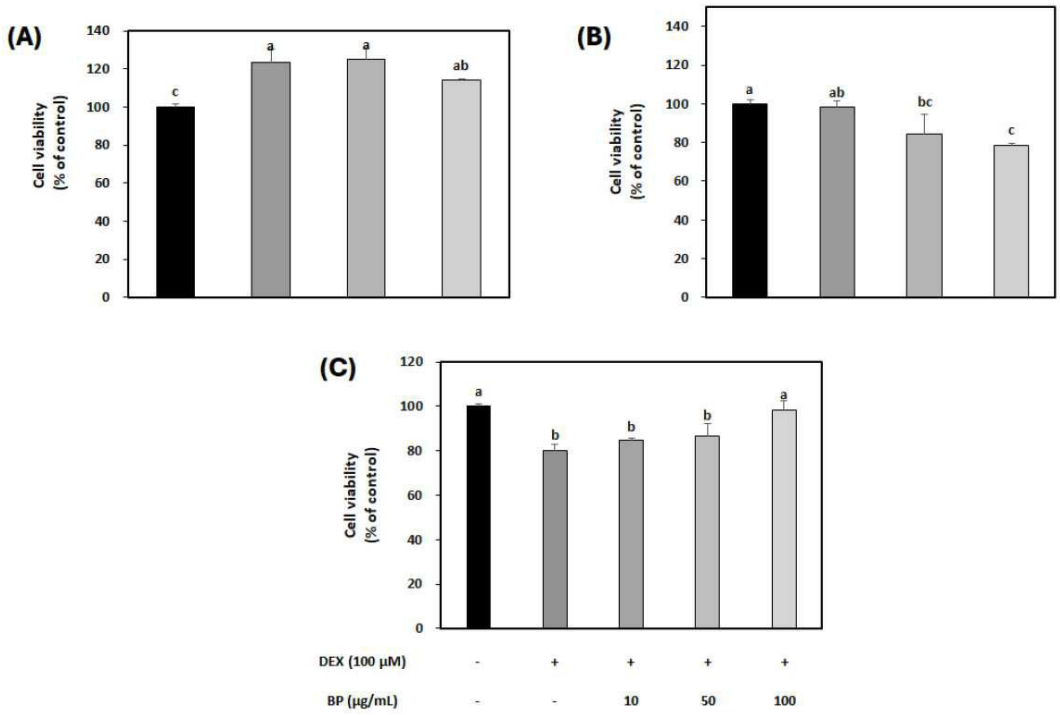
[0145] 실험 결과는 개별적으로 3회 반복하였고, SAS 프로그램(ver. 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)의 일반 선형 모델 절차를 사용하여 분석하여 분산 분석을 수행하였다. 평균값 간의 차이의 중요성을 평가하기 위해 Tukey의 다중 범위 테스트를 $p < 0.05$의 신뢰 수준으로 수행했다. 결과는 평균값±표준오차로 나타내었다.

도면

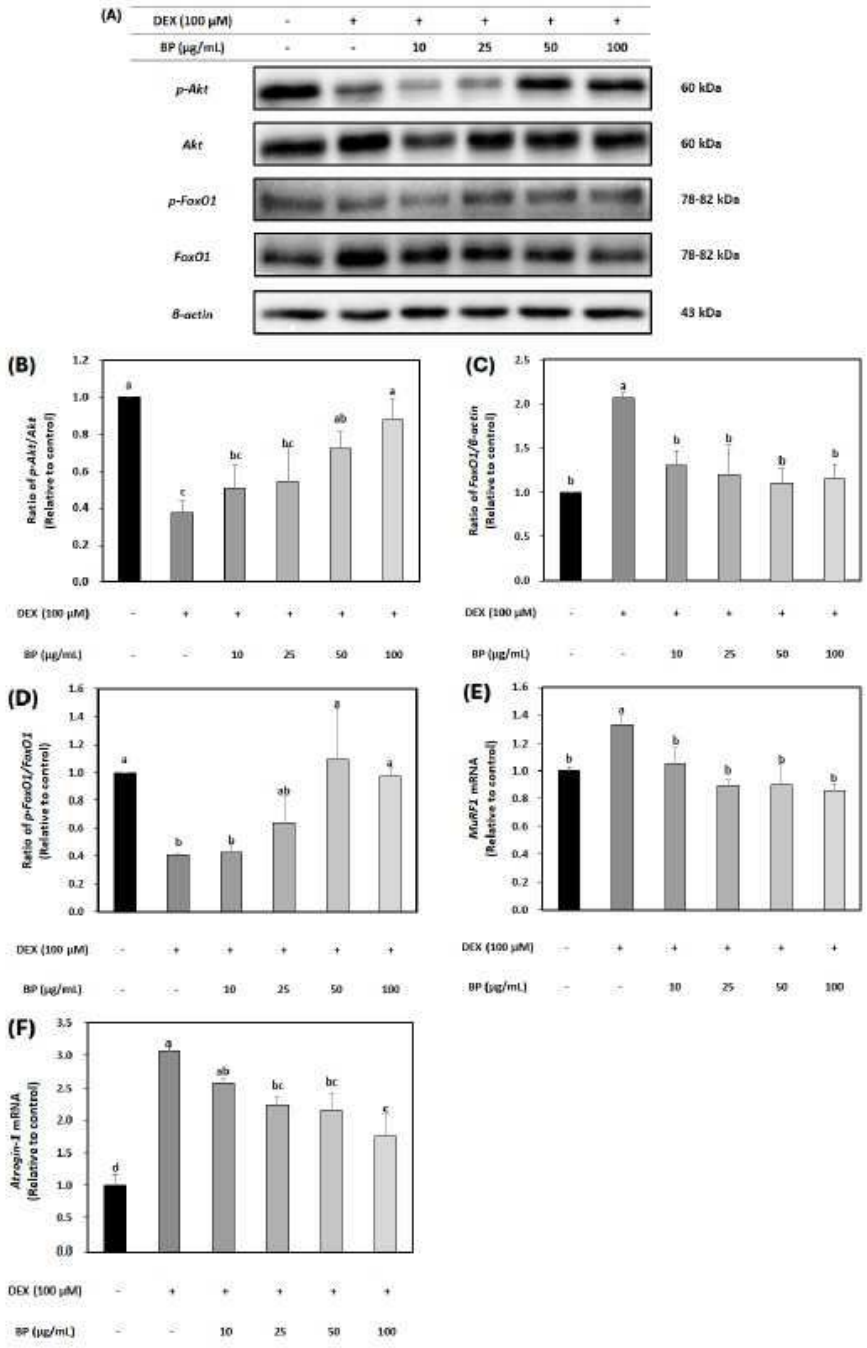
도면1



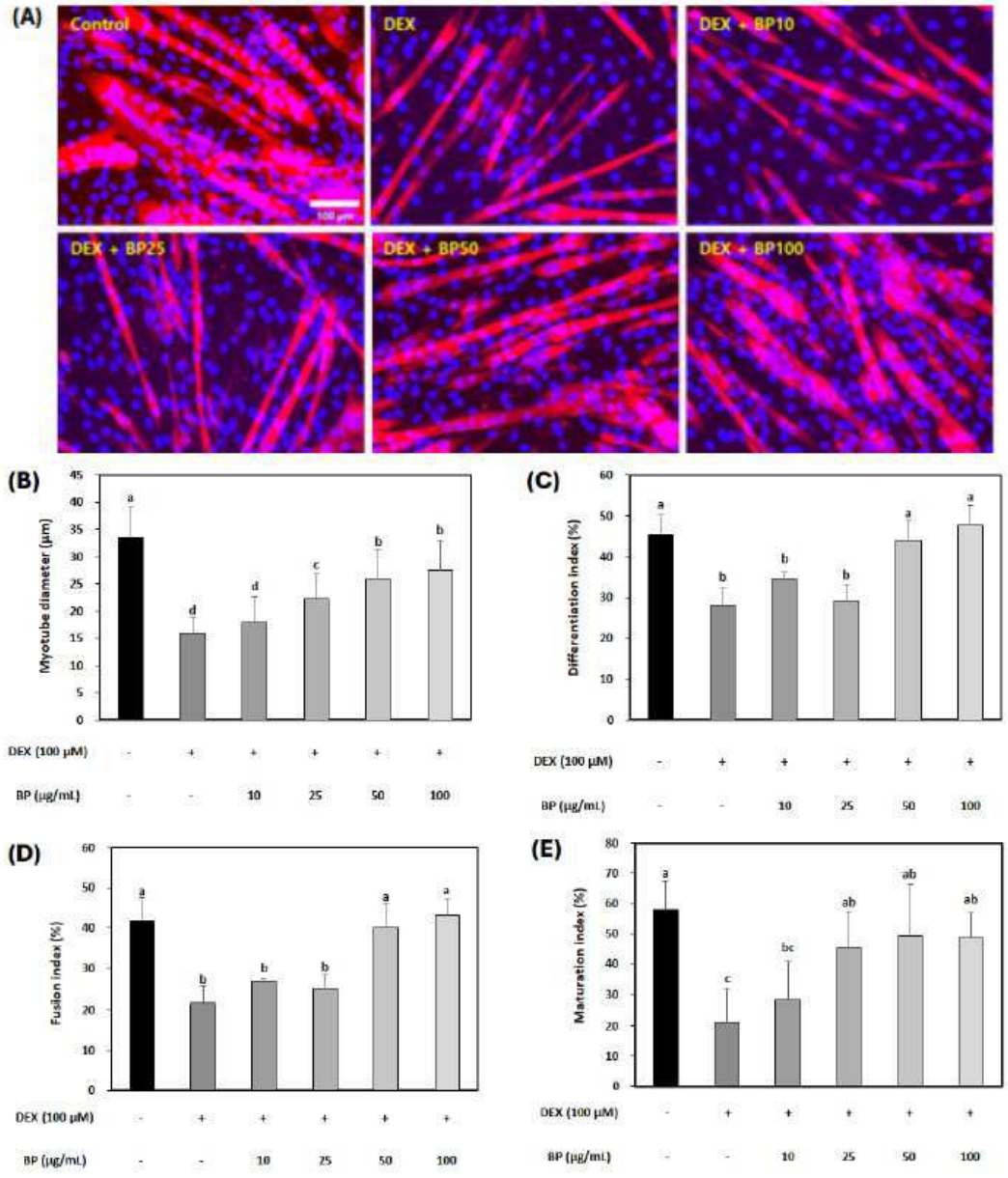
도면2


(A)
Cell viability (% of control)
140
120
100
80
60
40
20
0
c
a
a
ab
(B)
Cell viability (% of control)
140
120
100
80
60
40
20
0
a
ab
bc
c
(C)
Cell viability (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
a
b
b
b
a
DEX (100 μM) - + + + +
BP (μg/mL) - - 10 50 100

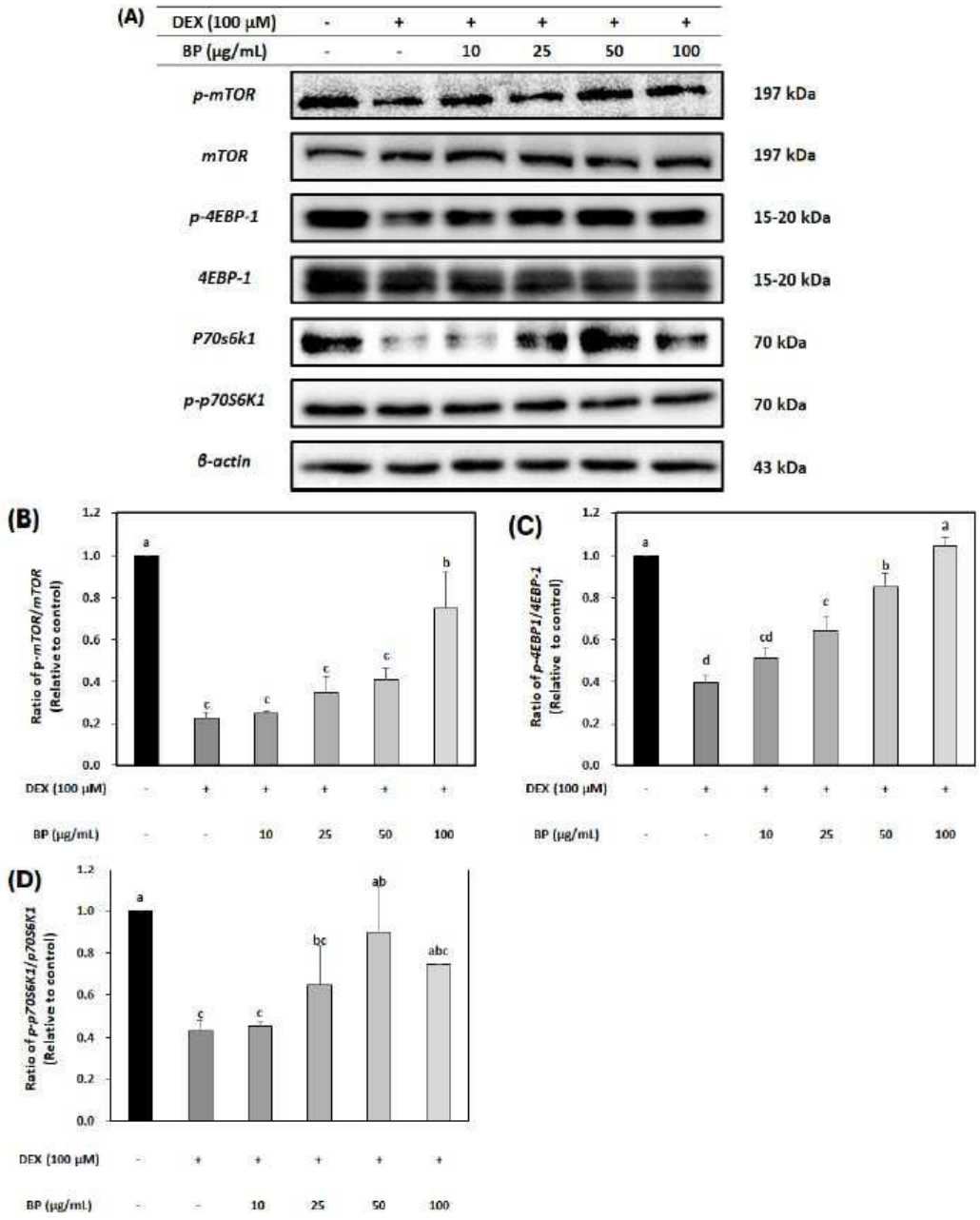
도면3


(A)
DEX (100 μM)
BP (μg/mL)
p-Akt
Akt
p-FoxO1
FoxO1
β-actin
60 kDa
60 kDa
78-82 kDa
78-82 kDa
43 kDa
(B)
Ratio of p-Akt/Akt (Relative to control)
(C)
Ratio of FoxO1/β-actin (Relative to control)
(D)
Ratio of p-FoxO1/FoxO1 (Relative to control)
(E)
MuRF1 mRNA (Relative to control)
(F)
Atrogin-1 mRNA (Relative to control)

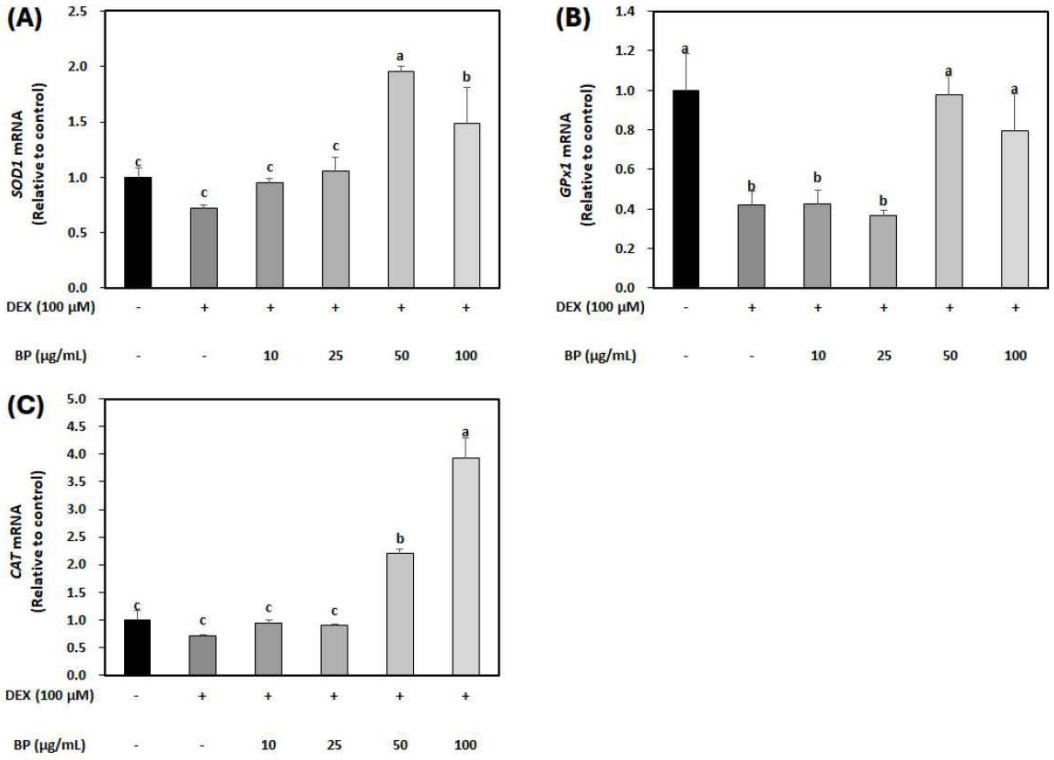
도면4


(A)
Control
DEX
DEX + BP10
DEX + BP25
DEX + BP50
DEX + BP100
(B)
Myotube diameter (μm)
(C)
Differentiation index (%)
(D)
Fusion index (%)
(E)
Maturation index (%)
DEX (100 μM)
BP (μg/mL)
10
25
50
100

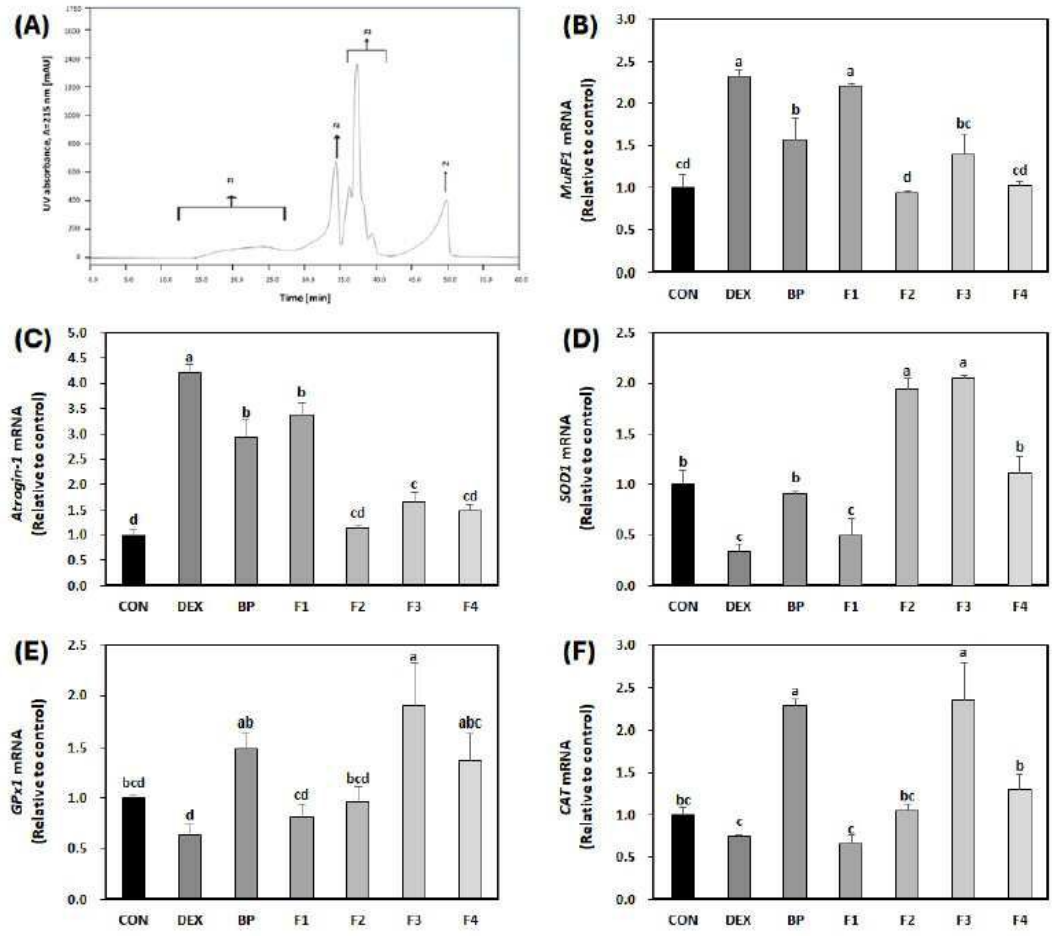
도면5


(A)
DEX (100 μM) - + + + + +
BP (μg/mL) - - 10 25 50 100
p-mTOR
mTOR
p-4EBP-1
4EBP-1
P70s6k1
p-p70S6K1
β-actin
197 kDa
197 kDa
15-20 kDa
15-20 kDa
70 kDa
70 kDa
43 kDa
(B)
Ratio of p-mTOR/mTOR (Relative to control)
(C)
Ratio of p-4EBP1/4EBP-1 (Relative to control)
(D)
Ratio of p-p70S6K1/p70S6K1 (Relative to control)
DEX (100 μM)
BP (μg/mL)

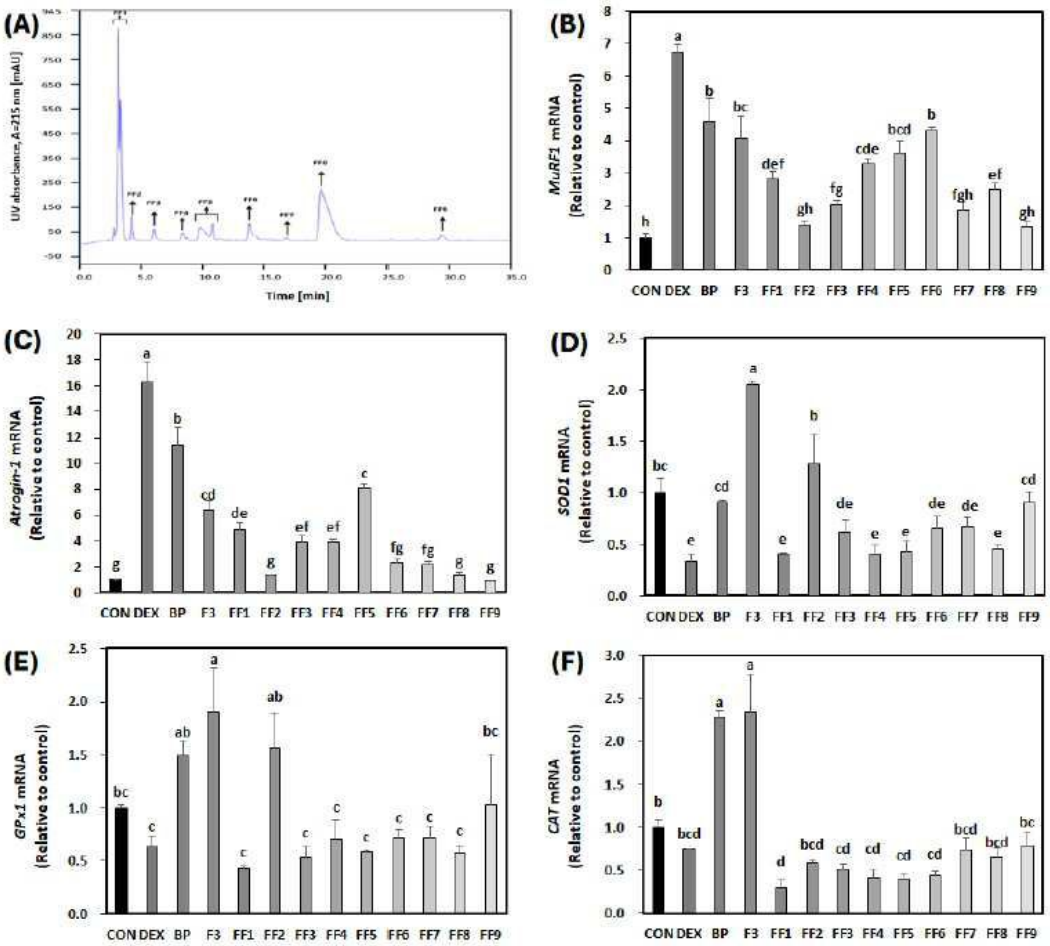
도면6


(A)
SOD1 mRNA (Relative to control)
(B)
GPx1 mRNA (Relative to control)
(C)
CAT mRNA (Relative to control)
DEX (100 μM)
BP (μg/mL)
- - 10 25 50 100

도면7

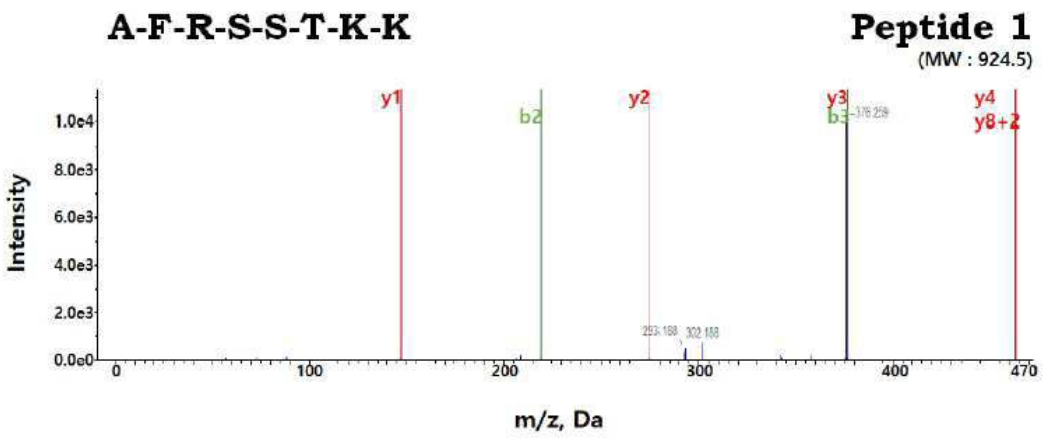

(A)
UV absorbance, λ=215 nm [mAU]
Time [min]
(B)
MuRF1 mRNA (Relative to control)
(C)
Atrogin-1 mRNA (Relative to control)
(D)
SOD1 mRNA (Relative to control)
(E)
GPx1 mRNA (Relative to control)
(F)
CAT mRNA (Relative to control)
CON DEX BP F1 F2 F3 F4

도면8

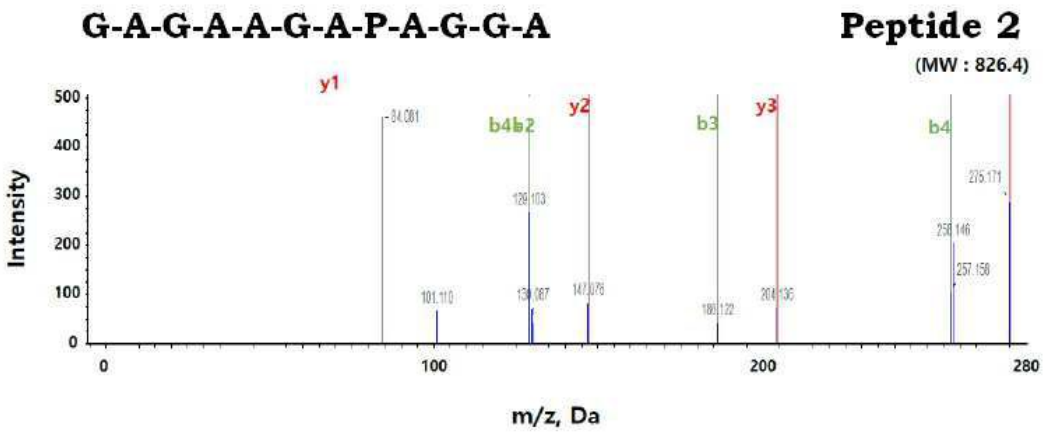

(A)
Time [min]
(B)
MuRF1 mRNA (Relative to control)
(C)
Atrogin-1 mRNA (Relative to control)
(D)
SOD1 mRNA (Relative to control)
(E)
GPx1 mRNA (Relative to control)
(F)
CAT mRNA (Relative to control)
CON DEX BP F3 FF1 FF2 FF3 FF4 FF5 FF6 FF7 FF8 FF9

도면9

(A)


A-F-R-S-S-T-K-K
Peptide 1
(MW : 924.5)
y1
b2
y2
y3
b3
y4
y8+2
Intensity
1.0e4
8.0e3
6.0e3
4.0e3
2.0e3
0.0e0
0
100
200
300
400
470
m/z, Da

(B)


G-A-G-A-A-G-A-P-A-G-G-A
Peptide 2
(MW : 826.4)
y1
b4
b2
y2
b3
y3
b4
Intensity
500
400
300
200
100
0
0
100
200
280
m/z, Da

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.