



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년12월19일
(11) 등록번호 10-1474260
(24) 등록일자 2014년12월12일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/137 (2006.01) A61K 9/08 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2012-0095344</p> <p>(22) 출원일자 2012년08월30일 심사청구일자 2013년05월31일</p> <p>(65) 공개번호 10-2014-0028653</p> <p>(43) 공개일자 2014년03월10일</p> <p>(56) 선행기술조사문헌 KR1020100093621 A* KR1020080031062 A JP60061523 A *는 심사관에 의하여 인용된 문헌</p> | <p>(73) 특허권자 한국생명공학연구원 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)</p> <p>(72) 발명자 박성섭 대전광역시 유성구 과학로 125 권기선 대전광역시 유성구 과학로 125 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인 최규환</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 4 항

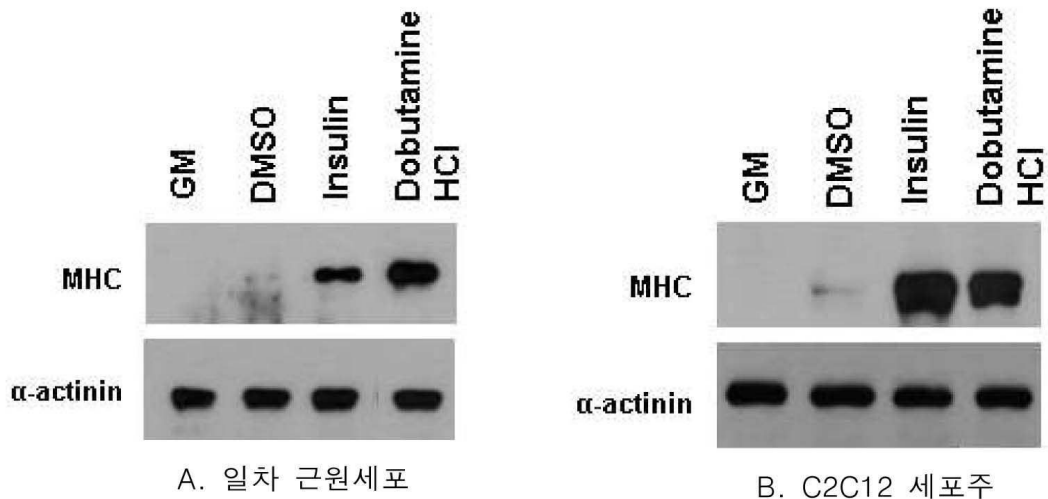
심사관 : 박제현

(54) 발명의 명칭 **도부타민 염산염을 유효성분으로 함유하는 근원세포 분화 촉진용 약학조성물**

(57) 요약

본 발명은 도부타민 염산염 (Dobutamine hydrochloride)을 유효성분으로 함유하는 근원세포 (myoblast)의 근육 분화 촉진용 조성물, 도부타민 염산염을 유효성분으로 함유하는 근원세포의 근육 분화 촉진용 배지 조성물, 도부타민 염산염을 유효성분으로 함유하는 근육 장애 예방 또는 치료용 약학조성물 및 도부타민 염산염을 유효성분으로 포함하는 근육 장애 예방 또는 개선용 식품조성물을 제공한다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

성혜영

대전광역시 유성구 과학로 125

이광표

대전광역시 유성구 과학로 125

반영재

대전광역시 유성구 과학로 125

하중성

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-0009081

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발사업-융합바이오닉스기술개발사업

연구과제명 노화성 근육 감소 제어 원천기술 개발

기여율 1/1

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

도부타민 염산염 (Dobutamine hydrochloride)을 유효성분으로 함유하는 근원세포 (myoblast)의 근육 분화 촉진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 도부타민 염산염의 농도는 0.2~2 μ M인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

도부타민 염산염 (Dobutamine hydrochloride)을 유효성분으로 함유하는 근원세포 (myoblast)의 근육 분화 촉진용 배지 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 도부타민 염산염의 농도는 0.2~2 μ M인 것을 특징으로 하는 배지 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 도부타민 염산염을 유효성분으로 함유하는 근원세포의 근육 분화 촉진용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 도부타민 염산염 (Dobutamine hydrochloride)을 유효성분으로 함유하는 근원세포 (myoblast)의 근육 분화 촉진용 조성물, 도부타민 염산염을 유효성분으로 함유하는 근원세포의 근육 분화 촉진용 배지 조성물, 도부타민 염산염을 유효성분으로 함유하는 근육 장애 예방 또는 치료용 약학조성물 및 도부타민 염산염을 유효성분으로 포함하는 근육 장애 예방 또는 개선용 식품조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

근력의 약화는 노화와 함께 진행되는 근육 감소증 (sarcopenia), 단백질 대사의 불균형이나 근육 사용 감소에서 유발되는 근육 위축증 (atrophy) 등에 의해 유발된다. 근육 감소증은 노화가 진행되는 동안 근육량 (skletal muscle mass) 감소에 따른 근력의 저하를 일컬으며, 근육 감소증의 특징으로 근육량의 감소뿐만 아니라, 근섬유의 종류 변화도 관찰된다. 일반적으로 근섬유는 나이가 들면서 타입 1 (지근섬유)과 타입 2 (속근섬유)가 비슷한 비율로 감소하는데 반해, 근육 감소증이 발생하면 타입 2의 두께에는 큰 변화가 없지만 타입 1 근섬유의 두께가 눈에 띄게 감소하게 된다. 이러한 근육 감소증은 노인들에게 노쇠와 기능 장애를 유발한다고 보고되고 있다 (Roubenoff R., *Can J Appl Physiol* 26, 78-89, 2001).

[0003]

근육 감소증은 성장 호르몬의 감소 또는 신경학적 변화 (neurological change), 신체 활동의 변화, 대사의 변화, 성호르몬 또는 지방의 증가, 이화 사이토카인 (catabolic cytokine)의 증가 및 단백질 합성과 분해의 균

형 변화에 의해 유발되나, 각각의 요인들에 대한 연구는 아직 미진한 상태이다. 근육 감소증의 특징인 근육 양 감소는 위성 세포의 활성화 (satellite cell activation) 감소가 가장 큰 원인으로 여겨진다. 위성 세포는 기저막 (basement membrane)과 근섬유의 근초 (sarcolemma) 사이에 위치하고 있는 작은 단핵 세포이며, 이들은 부상 또는 운동과 같은 자극에 의해 활성화되어 근원세포 (myoblast)로 증식하며, 분화가 진행되면 다른 세포와 융합되어 다핵의 근섬유를 형성한다. 따라서 위성 세포의 활성이 감소함에 따라 손상된 근육을 재생하는 능력이나 분화 신호에 대한 반응이 떨어지게 되고 그 결과 근육 형성이 저하된다.

[0004] 근육 위축증 (atrophy)은 영양 결핍이나 장기간 근육을 사용하지 않은 경우에 유발되는데, 정상적인 단백질의 합성과 분해의 균형이 깨지면서 단백질이 분해됨으로써 나타나게 된다.

[0005] 근육 감소의 치료 방법에는 크게 3가지가 있다. 첫 번째로 운동은 단기적으로 골격근의 단백질 합성 능력을 증가시키며, 근육의 힘이나 운동성을 증가시킨다고 보고되고 있다. 그러나 장기적 치료방법으로는 부적절하다. 두 번째는 약물 치료로서 테스토스테론 또는 단백질 동화 스테로이드 (anabolic steroid) 등의 사용이 가능하나, 이는 여성에게는 남성화를 유도하며, 남성의 경우 전립선 증상 등의 부작용을 나타낸다. 다른 승인된 처방법으로는 DHEA (dehydroepiandrosterone) 와 성장 호르몬을 사용하는 방법이 있는데, SARM (Selective Androgen Receptor Modulators)을 포함하는 부위에 사용 가능하다는 연구가 보고된 바 있다 (D.D. Thompson. *et al.*, *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6, 344-346, 2007). 마지막으로 총체질량 (total body mass)을 유지하기에 부적절한 현대인의 식습관을 조절할 수 있는 식이요법의 사용이 있다.

[0006] 최근에는 위성 세포를 분리하여 체외에서 분화시킨 후 체내에 도입시키는 줄기세포 치료법 (stem cell therapy)과 직접 체내의 위성 세포를 활성화하여 근육분화 (myogenesis)를 촉진시켜 근육을 유지하거나 강화시키는 방법이 근육 감소증과 같은 근력약화를 치료할 수 있는 방법으로 대두되고 있다.

[0007] 근육분화는 단핵인 근원세포가 융합을 통해 다핵의 근관 (myotube)를 형성하는 과정이다. 근육 전구체 세포에 해당하는 근원세포는 자기복제 (self-renewal) 하는 경우에는 Pax7+ 마커를 나타내며, 증식하는 경우 Pax7+ 및 MyoD+ 마커를 나타낸다. 근관을 형성하는 분화단계의 세포는 Pax7-, MyoD+ 및 MyoG+ 마커를 이용하여 구분할 수 있다. 분화 초기에는 MyoD와 같은 근원성 전사인자 (myogenic transcription factor)의 발현이 증가하며, 중기에는 MyoG (myogenin)가 증가한다. 분화가 거의 끝나는 후기에는 미오신 중쇄 (Myosin Heavy Chain)의 발현이 증가한다 (Yablonka Reuveni Z. *et al.*, *J Anim Sci* 86, 207-216, 2008).

[0008] 도부타민 (dobutamine)의 IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) 명칭은 4-(2-((4-(4-하이드록시페닐)부탄-2-일)아미노)에틸)벤젠-1,2-디올 (4-(2-((4-(4-hydroxyphenyl)butan-2-yl)amino)ethyl)benzene-1,2-diol)이며, 화학식은 $C_{18}H_{23}NO_3$ 이고 분자량은 301.38이다. 합성 카테콜아민 계열의 도부타민은 산이 부가된 도부타민 염산염 형태로 판매되며, 교감신경 흥분제로 사용된다. 교감신경 β -작용제 (Adrenergic β -Agonist)로써 혈관수축이나 빈맥 없이 심장 수축을 촉진하는 목적으로 사용되며, 약리학적으로 도부타민은 심장의 β -아드레날린수용체 (β -adrenoceptor)를 자극해 비교적 가벼운 심장 박동수 변화와 고혈압, 혈관수축을 유발한다. 도부타민 β -1 교감신경 수용기에만 주로 작용하며, β -2 또는 α 수용기에는 작용 효과가 미미하다. 심혈관 수술이나 유기적 심장 질환에 의한 심근 수축력 약화를 일시적으로 치료하기 위해 사용된다 (RR Ruffolo Jr., *The American journal of the medical sciences* 294, 244-248, 1987). 부작용으로는 심박 급속증, 고혈압, 부정맥, 협심증과 같은 심혈관 이상뿐만 아니라, 메스꺼움, 구토, 두통이 유발한다고 알려져 있다.

[0009] 한편, 한국등록특허 제0694181호에는 '근원세포 또는 근원세포로부터 신경세포 분화를 유도하는 화합물, 이를 포함하는 약학적 조성물, 신경 세포 분화를 유도하는 방법 및 신경세포 분화를 유도하는 화합물을 검색하는 스크리닝 방법'이 개시되어있고, 한국공개특허 제2012-0009726호에는 '근육세포 분화 또는 재생 촉진제'가 개시되어있다. 그러나 본 발명에서와 같이 도부타민 염산염을 유효성분으로 함유하는 근원세포의 근육 분화 촉진용 조성물에 대해서는 개시된 바가 전혀 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 심근 수축력 약화 치료제로 알려진 합성 카테콜아민 계열의 도부타민 염산염을 마우스 일차 근원세포 (primary myoblast) 및 근원세포주 C2C12에 처리했을 때, 대조구인 DMSO (dimethyl sulfoxide)보다 높은 분화 효과를 나타내며, 근원세포 분화에 효과가 있는 것

으로 알려진 인슐린과 유사한 분화 촉진 효과를 나타내는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 도부타민 염산염 (Dobutamine hydrochloride)을 유효성분으로 함유하는 근원세포 (myoblast)의 근육 분화 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 도부타민 염산염을 유효성분으로 함유하는 근원세포의 근육 분화 촉진용 배지 조성물을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 도부타민 염산염을 유효성분으로 함유하는 근육 장애 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 도부타민 염산염을 유효성분으로 포함하는 근육 장애 예방 또는 개선용 식품조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따르면, 합성 카테콜아민 계열의 도부타민 염산염은 교감신경 흥분제로 심근 수축력 약화를 일시적으로 치료하기 위해 사용되어 왔으나, 본 발명에서 마우스 일차 근원세포 및 근원세포주 C2C12에 도부타민 염산염을 처리했을 때 근원세포의 분화를 촉진하는 효과가 확인되었으므로 근육 감소증 (sarcopenia)이나 근육 위축증 (atrophy) 등의 근육 장애 예방 또는 치료에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 도부타민 염산염의 근원세포 분화 촉진 효과를 확인하기 위해 근원세포의 분화 후기에 나타나는 미오신 중쇄 3 (myosin heavy chain 3, MYH3) 단백질의 발현을 일차 근원세포 및 근원세포주 C2C12에서 In-Cell ELISA로 측정된 결과를 나타낸다.
- 도 2는 도부타민 염산염을 농도별로 일차 근원세포에 처리하여 근원세포의 분화 촉진 효과를 측정된 결과를 나타낸다.
- 도 3은 도부타민 염산염을 근원세포 배양 배지 및 분화 배지에 처리했을 때 세포독성을 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 4는 도부타민 염산염을 처리한 근원세포주 C2C12의 분화를 위상차 현미경으로 관찰한 사진이다.
- 도 5는 도부타민 염산염을 처리한 근원세포주 C2C12의 분화를 면역세포화학법 (Immunocytochemistry)으로 확인한 사진이다.
- 도 6은 일차 근원세포 및 근원세포주 C2C12에서 MYH3의 발현을 웨스턴 블롯으로 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 도부타민 염산염 (Dobutamine hydrochloride)을 유효성분으로 함유하는 근원세포 (myoblast)의 근육 분화 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 특징은 근원세포의 분화를 유발하는 인자로서 도부타민 염산염을 이용하는 것을 포함한다. 이러한 효과를 획득하기 위한 근원세포의 치료는 근원세포를 도부타민 염산염과 접촉시킴으로써 이루어질 수 있으며, 이들 인자들은 척추동물에 유효량의 도부타민 염산염 또는 관련 화합물들을 투여함으로써 척추동물, 바람직하게는 포유동물에서 근원세포의 분화를 일으키도록 이용될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 근원세포 (myoblast)는 분화되지 않은 상태에 있는 근육 세포이며, 단핵 세포인 위성 세포 (satellite cell)가 활성화되면 근원세포로 증식한다. 근원세포의 분화가 진행되면 다른 세포와 융합하여 다핵의 가늘고 긴 근관 (myotube)을 형성하여 근섬유 (muscle fiber)를 만든다. 근육분화 (myogenesis)는 근관을 만들어 내기 위한 근원세포의 모든 융합을 의미하고, 근원세포의 분화 촉진 효과는 골격근, 심근 및 평활근 내에서 유도될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 일 구현 예에서, 근원세포의 분화를 촉진하는 도부타민 염산염의 농도는 0.001~2.0 μM, 바람직하게는 0.1~2.0 μM, 더욱 바람직하게는 0.2~2.0 μM일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0021] 또한, 본 발명은 도부타민 염산염을 유효성분으로 함유하는 근원세포의 근육 분화 촉진용 배지 조성물을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일 구현 예에 따른 배지 조성물에서, 근원세포의 분화를 촉진하는 도부타민 염산염의 농도는 0.001~2.0 μM, 바람직하게는 0.1~2.0 μM, 더욱 바람직하게는 0.2~2.0 μM일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 본 발명에 따른 근원세포의 근육 분화 촉진용 배지 조성물은 미분화 상태의 근원세포를 '융합'하거나, 근관 및 근섬유로 '분화 유도'하거나 또는 '배양'하는데 사용될 수 있으며, 특히 근원세포로부터 근관 및 근섬유로 분화를 유도하는 데에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 사용된 용어 '배지'는 당, 아미노산, 각종 영양물질, 혈청, 성장인자, 무기질 등의 세포의 성장 및 증식 등에 필수적인 요소를 포함하는 시험관 내 (in vitro)에서 근원세포 등의 세포의 성장 및 증식을 위한 혼합물을 말한다. 특히, 본 발명의 배지는 근원세포의 배양을 위한 배지이다. 상기의 '배양'은 근원세포의 성장 및 증식을 포함하는 의미이다.
- [0025] 본 발명의 배양 배지 조성물은 여러 기본 배지에 도부타민 염산염이 첨가되어 만들어질 수 있다. 본 발명에서 상기 '기본배지'는 세포가 살아가기 위해 필요한 필수적인 당, 아미노산, 물 등이 포함되어 있는 혼합물로서 본 발명의 기본 배지는 인위적으로 합성하여 제조하거나 상업적으로 제조된 배지를 사용할 수 있다. 상업적으로 제조된 배지는 예를 들면, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM (Minimal Essential Medium), BME (Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, α-MEM (α-Minimal Essential Medium), G-MEM (Glasgow's Minimal Essential Medium) 및 Iscove's Modified Dulbecco's Medium 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 본 발명의 배양 배지는 영양혼합물 (Nutrient Mixture)을 추가로 포함할 수 있다. 상기 영양 혼합물은 세포 배양에 일반적으로 사용되는 각종 아미노산, 비타민, 무기염 등을 포함하는 혼합물로서, 상기 아미노산, 비타민, 무기염 등을 혼합하여 제조하거나 상업적으로 제조된 영양 혼합물을 사용할 수 있다. 상업적으로 제조된 영양혼합물은 예를 들면, F-12, M199, MCDB110, MCDB202, MCDB302 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 또한, 본 발명은 도부타민 염산염을 유효성분으로 함유하는 근육 장애 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 '근육 장애 (muscle disorder)'는 타박상 (contusion), 열상 (laceration), 압좌 (crush)와 같은 외적 요인, 갑작스럽거나 심한 낙상 또는 스포츠 활동 중의 근육 긴장 (muscle strain)과 같은 내적 요인, 치료 중 발생할 수 있는 혈액 공급이 중단될 때 발생하는 근육 손상, 근육 소모 및/또는 그로 인한 근육 기능의 손실, 및 노화에 의한 근육 감소 등을 포함하는 의미이며, 그 원인은 유전적 인자 및/또는 환경적 인자에 의할 수 있다. 상기 근육 장애는 근육 위축증 (muscle atrophy), 근질환 (myopathy), 근육 손상 (muscle injury), 근이영양증 (muscle dystrophy), 근육 감소증 (sarcopenia), 근신경 전도성 질환 (myoneural conductive diseases) 및/또는 신경 손상 (nerve injury)과 같은 골격근 질병 및 장애들을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 근육 위축증은 소아마비 후 근위축 (PPMA; post-polio muscle atrophy) 및/또는 X-연관 척수구근 근위축 등을 포함한다. 상기 근육 손상은 외상성 근육 손상 등을 포함할 수 있다. 상기 근이영양증은 뒤센형 근이영양증 (Duchenne muscular dystrophy), 근긴장성 이영양증 (myotonic dystrophy) 및/또는 선천성 근이영양증 등을 포함할 수 있다. 상기 근신경 전도성 질환 및/또는 신경 손상은 근육 손상에 의해 유도되는 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 '예방'은 경미한 근육손상 등에 의해 질병으로 전이되기 전단계에서 질병화하는 것을 차단하는 효과를 포함하는 의미이며, '치료'는 근원세포의 분화를 증가시키거나 근원세포 위축 및 퇴행을 감소시키거나 근육 손실을 서행 또는 정지시키거나 척추동물에 존재하는 근육의 양 또는 질을 증가시키는 효과를 포함하는 의미이다. 근육의 증가 및/또는 성장은 근섬유 크기 (fiber size)의 증가 및/또는 근섬유 수의 증가에 의해 일어날 수 있다. 본원에서 사용되는 경우에 근육의 증가 및/또는 성장은 A) 습윤중량 (wet weight)의 증가, B) 단백질 함량의 증가, C) 근섬유 수의 증가, D) 근섬유 직경의 증가에 의해 측정될 수 있다. 근섬유 성장의 증가는 직경을 단면 타원체의 단축으로 정의할 때 직경의 증가로 정의될 수 있다. 유용한 치료제는 이전에 유사하게 처리된 대조군 동물 (즉, 근육 성장화합물로 처리되지 않은 퇴행된 근육조직을 갖는 동물 또는 동물 세포)에 비해 적어도 10% 정도 근육이 퇴행된 동물에 있어서 습윤중량, 단백질 함량 및/또는 직경이 10% 이상, 더욱 바람직하게 50% 이상, 가장 바람직하게 100% 이상 증가시킬 수 있는 것이다. 근섬유의 수를 증가시킴으로써 성장을 증가시키는 화합물은 그것이 질병에 걸린 조직에서 근섬유의 수를 적어도 1%, 더욱 바람직하게 적어도 20%, 그리고 가장 바람직하게 적어도 50% 증가시킬 때 치료제로 유용하다. 이러한 백분율 값은 화합물이 투여되어 국부적으로 작용하는 경우에, 화합물 비처리 및 질병에 걸리지 않은 비교 포유동물 또는 병에 걸리지 않은 근육에 있어

서의 기초수준에 대하여 상대적으로 결정된 것이다.

- [0029] 본 발명의 약학조성물은 투여를 위해서 유효성분인 도부타민 염산염 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학조성물은 약제의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 약학조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화 하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0030] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제는 본 발명의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘 (calcium carbonate), 슈크로스 (sucrose) 또는 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 [Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA]에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 도부타민 염산염을 유효 성분으로 함유하는 약학조성물의 투여량은 근원세포의 분화, 근육 장애 증상 억제 또는 근육 장애 치료 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 종류 및 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.
- [0032] 또한, 본 발명은 도부타민 염산염을 유효성분으로 포함하는 근육 장애 예방 또는 개선용 식품조성물을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 근육 장애는 근육 위축증, 근질환, 근육손상, 근이영양증, 근육 감소증, 근신경 전도성 질환 또는 신경 손상일 수 있으며, 본 발명의 약학조성물에 기재된 사항과 모순되지 않는 한 동일하게 적용될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 도부타민 염산염을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 도부타민 염산염을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 도부타민 염산염은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0035] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 도부타민 염산염을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다. 상기 식품조성물의 제형은 통상의 방법에 따라 제조하며, 담체와 함께 건조한 후 캡슐화하거나 기타 정제, 과립, 분말 등의 형태로 제형화할 수 있으며, 상기 기재된 것 외에도 모든 식품 형태로 제조 가능하다.

[0036] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0037] **재료 및 방법**

[0038] **1. 일차 근원세포 (Primary myoblast) 분리 및 배양**

[0039] 생후 1~5일 된 마우스를 70% 에탄올로 세척한 후 CO₂를 사용하여 질식시키고 뒷다리 발목 윗부분과 무릎을 절단하였다. 절단 부위를 1X PBS에 넣어서 멸균 상태의 핀셋으로 피부와 뼈를 제거하고 근육조직을 1X PBS로 3번 세척한 후 잘게 조각내었다. 근육조직에 콜라게나아제 (1.5 U/ml) 1 ml, 디스파아제 (2.4 U/ml) 1 ml, 1M CaCl₂ 5 ul를 혼합한 효소용액을 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 반응물은 나일론그물 (80 um)을 사용하여 뼈등을 걸러내었고, 800rpm으로 5분 동안 원심분리하여 근원세포를 수득하였다. 2 ml의 F10 배지 (Invitrogen)에 세포를 현탁하여 100 mm 일반 배양용기로 옮긴 것을 P1이라 하며, 1시간 간격으로 0.1% 젤라틴이 코팅된 배양용기로 옮기는 과정을 P5까지 반복하였다. 일차 근원세포는 5% CO₂가 포함된 7°C의 배양기에서 배양하며, 2일에 한 번씩 새로운 F10 배지로 교체해주었다. 세포를 계대할 때는 0.005% 트립신을 사용하여 세포를 배양용기에서 분리시켰고, 근원세포로 분화를 유도할 때에는 5%의 말 혈청 (horse serum)이 첨가된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen)을 사용하였다.

[0040] **2. 근원세포주 C2C12 배양**

[0041] 근원세포주 C2C12는 C3H 마우스에서 얻은 근원세포 세포주로서, 근세포 분화 연구에 널리 사용되고 있다. 근원세포주 C2C12의 세포 배양용 배지 (GM, growth media)로는 10% 소태아혈청 (fetal bovine serum)이 첨가된 DMEM을 사용하였으며, 분화배지 (DM, differentiation media)로는 2% 말 혈청이 포함된 DMEM을 사용하였다.

[0042] **3. In-Cell ELISA**

[0043] 세포 자체에서 발현되는 미오신 중쇄 3 (myosin heavy chain 3, MYH3)의 양을 비교하기 위하여 In-Cell ELISA 방법을 사용하였다. 0.1% 젤라틴으로 코팅되어 있는 96-웰 플레이트에 웰 당 5 x 10³의 일차 근원세포를 접종하여 배양하였고, 24 시간 후에 배지를 5% 말 혈청이 첨가된 DMEM 배지로 교체하여 분화를 유도하였다. 24시간 마다 새로운 배지로 교체해 주었고, 분화 유도 후 3일째에 배지를 제거하고, 상온에서 3.7% 파라포름알데하이드 (paraformaldehyde) 100 ul를 15분 동안 처리하여 세포를 고정시켰다. 1X PBS로 세척한 후, 0.1% 사포닌, 3% 트리톤 X-100, 0.009% 소듐 아지드 (sodium azide)가 포함된 PBS 막 투과 용액 (permeabilization buffer) 100 ul를 상온에서 15분간 처리하여 세포막에 구멍을 뚫는다. 다시 1X PBS로 세척한 후, 0.1% BSA (bovine serum albumin)가 포함된 100 ul의 PBS 블로킹 버퍼를 상온에서 1시간 동안 처리하였다. 1X PBS로 3번 세척한 후, 1:500으로 희석된 1차 항체 (SC-20641, Santa Cruz Biotechnology) 100 ul를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 1X PBS로 3번 세척 후, 1:10,000으로 희석한 2차 항체 (Goat anti-Rabbit IgG-HRP) 100 ul를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 1X PBS로 3번 세척 후, TMB 용액 (Gen Depot #T3551) 50 ul를 첨가하여 20분 동안 반응시키고, 정지 용액 (Gen Depot #T3552) 50 ul를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 플레이트는 485 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 결과를 분석하였다.

[0044] **4. 세포 독성 (Cytotoxicity) 분석**

[0045] 인슐린과 도부타민 염산염에 대한 세포독성을 측정하기 위해 세포 사멸시 분비되는 효소인 LDH (lactate dehydrogenase)를 측정하는 Cytotox 96 비-방사성 세포독성 분석 키트 (Promega)를 사용하였다. 세포 배양용 배지를 사용하여 96-웰 플레이트에서 웰 당 5x10³의 일차 근원세포를 배양하였고, 24시간 후 세포 배양용 배지와 분화용 배지에 인슐린과 도부타민 염산염을 농도별로 처리하였다. 농도별로 처리한 각각의 시료 50 ul를 96-웰 플랫 보텀 (flat bottom) 플레이트로 옮겨준 후, 50 ul 기질 용액 (reconstituted substrate mix)를 첨가하고 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 완전한 세포사멸을 위한 대조군으로 50 uM H₂O₂를 처리하였다. 30분 후 50

ul의 정지 용액을 첨가하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였고, 용해 버퍼에 의한 세포사멸시에 나타나는 LDH 값에 대한 비율로 표시하였다.

[0046]

5. 면역세포화학법 (Immunocytochemistry)

[0047]

0.1% 젤라틴이 코팅된 커버글라스에서 C2C12 세포를 3일 동안 분화시켰다. 세포는 1X PBS로 세척한 후, 3.7% 파라포름알데하이드로 상온에서 15분간 고정시켰고, 1X PBS로 3번 세척하여 투과 용액 (permeabilization buffer)을 넣고 상온에서 15분 동안 반응시켰다. 다시 1X PBS로 3번 세척한 후 1% BSA가 들어있는 PBST (블로킹 버퍼, 0.5% 트윈 20이 포함된 PBS)로 30 분간 반응시켜 불특정한 항체 결합을 억제하였다. 1차 항체 (SC-20641, Santa Cruz Biotechnology)를 블로킹 버퍼에 1:500로 희석하여 첨가하고, 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 1X PBS로 3번 세척한 후 블로킹 버퍼에 1:5000으로 희석한 2차 항체 (Goat anti-Rabbit IgG-HRP)를 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응시키고 1X PBS로 3번 세척하였다. 커버글라스를 슬라이드글라스에 올리고 형광 현미경으로 사진을 찍어 결과를 분석하였다.

[0048]

6. 웨스턴 블롯

[0049]

세포 배양용 배지에 세포를 접종하여 24시간 배양한 후, 분화 배지에 DMSO, 6 ug/ml 인슐린 및 0.2 uM 도부타민 염산염을 각각 매일 처리하면서 분화를 유도하였다. 분화 유도 3일 후에 세포를 1200rpm으로 3분간 원심분리하였다. 세포에 100 ul의 용해 버퍼를 첨가한 후 초음파분해 (sonication)시키고, 3000rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 수용성 단백질에 4X 샘플 버퍼를 첨가하여 끓는 물에서 5분간 반응시켰다. 단백질 10 ug을 12% SDS-PAGE 겔에 로딩하여 전개한 후 Whatman 막으로 옮겼다. 막은 5% 탈지분유 버퍼로 1시간 동안 상온에서 블로킹하였고, TTBS (0.03% 트윈 20, 트리스 2.42 g, NaCl 9 g, pH 7.4, 1 L)로 5분씩 5번 세척하였다. 5% 탈지분유가 포함된 TTBS에 1차 항체를 1:500으로 희석하여 첨가한 후 상온에서 2시간 동안 반응시키고 다시 TTBS로 5분씩 5번 세척하였다. 2차 항체는 5% 탈지분유가 포함된 TTBS에 1:5000으로 희석하여 첨가한 후 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 마지막으로 막을 TTBS로 5분씩 5번 세척한 후, ECL (Enhanced Chemiluminescent solution, Pierce)을 첨가하였고, X-ray 필름을 노출시켜 결과를 얻었다.

[0050]

실시에 1. In-Cell ELISA를 이용한 분화 촉진 탐색

[0051]

일차 근원세포 (Primary myoblast)와 C2C12 세포주의 분화촉진 정도를 측정하기 위하여 In-Cell ELISA 방법을 사용하여 세포 내 미오신 중쇄 3 (MYH3) 단백질의 양을 측정하였다. 약물 탐색에 사용한 In-Cell ELISA는 Sandwich ELISA와는 다르게 고정화 항체 (capture antibody)를 사용하지 않고, 세포를 용기 위에 고정시킨 후 세포막에 구멍을 뚫어 목적 단백질의 발현 양을 정량화할 수 있다. 일차 근원세포의 분화 정도를 비교하기 위해 사용한 1차 항체는, 근원세포의 분화가 진행되면 발현이 시작되는 단백질인 미오신 중쇄 3 (MYH 3)을 인식하는 항체로서 사람 및 마우스의 미오신 중쇄 3의 카복실 말단 (1641-1940)을 항원으로 사용하여 제조된 항체 (sc-20641, Rabbit, Santa Cruz Biotechnology)이다. 2차 항체는 HRP가 결합된 염소의 항-토끼 항체 (ADI-SAB-300, Enzo Life Sciences)를 사용하였다.

[0052]

일차 근원세포를 분화 배지로 옮긴 후 3일 동안 매일 새 분화 배지로 교환해주면서 근원세포의 분화를 유도하였다. 3일 후 In-Cell ELISA 실험을 통해 MYH3 단백질 발현 수준을 비교하였다. 음성 대조구인 DMSO와 비교해 보았을 때, 0.2 uM 도부타민 염산염의 분화촉진 효과는 양성 대조구인 0.6 ug/ml 인슐린 처리시와 유사하여 MYH fold change가 1.252 (n=6)였다.

[0053]

동일한 방법으로 도부타민 염산염 (0.2 uM)에 의한 마우스 근원세포주인 C2C12의 분화 촉진 정도를 측정하여 본 결과 음성 대조구인 DMSO와 비교하여 양성 대조구인 0.6 ug/ml 인슐린에 의한 증가와 유사한 1.496 (n=5)을 나타내었다. 즉, In-Cell ELISA 분석 결과는 도부타민 염산염이 약물 운반체인 DMSO보다 분화를 촉진하고 있으며, 그 촉진 정도는 이미 보고된 약물인 인슐린과 유사하다는 것을 보여준다 (도 1).

[0054]

실시에 2. 농도별 분화 촉진 효과

[0055]

도부타민 염산염을 일차 근원세포에 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 0.2, 1.0 및 2.0 uM의 농도로 처리한 후 MYH3

의 발현 양을 측정된 결과 (n=3), 0.2 uM 농도의 도부타민 염산염 처리에서 급격한 근원세포의 분화 촉진 효과를 나타내었고, 2 uM 처리까지 MYH3의 발현이 증가하는 것으로 나타났다 (도 2).

[0056]

실시예 3. 도부타민 염산염의 세포 독성

[0057]

일차 근원세포 세포의 세포 배양 배지 (GM)에서 측정된 도부타민 염산염의 농도별 세포 독성은 농도에 따라 미약하게 증가하는 것으로 나타났다. 그 수준은 인슐린의 독성에 비해 약간 높지만 2.0 uM로 처리한 경우에도 완전한 세포사멸에 이르는 용해 버퍼를 처리한 값에 비해 8.2% 밖에 되지 않아 세포 독성이 매우 낮은 수준임을 확인하였다. 대조구인 H₂O₂ 처리시에는 95% 정도의 세포사멸을 나타내었다 (도 3의 A).

[0058]

일차 근원세포 세포의 분화 배지 (DM)에서 측정된 도부타민 염산염의 농도별 세포 독성은 농도에 따라 큰 차이가 없었고, 인슐린에 비해서도 높지 않았다. 2.0 uM의 도부타민 염산염을 처리한 경우에도 완전한 세포사멸에 이르는 용해 버퍼를 처리한 값에 비해 5.0% 이내로 근원세포 분화에 따른 독성이 매우 미미함을 확인하였다 (도 3의 B).

[0059]

실시예 4. 현미경 관찰에 의한 분화 촉진 효과 검증

[0060]

대조구인 DMSO와 도부타민 염산염을 각각 처리하여 C2C12 세포주의 분화를 유도한지 3일째 되는 날 근원세포의 분화 정도를 위상차 현미경 (Phase Contrast microscopy)으로 관찰하였다 (X100). 비교 결과, 대조구인 DMSO에 비해 도부타민 염산염 (0.2 uM)을 처리하였을 때 분화가 촉진되어 근관이 많이 형성되는 것을 확인할 수 있었다 (도 4).

[0061]

또한, 대조구인 DMSO와 도부타민 염산염을 각각 처리하여 C2C12 세포주의 분화를 유도한지 3일째 되는 날 근원세포의 분화 정도를 면역세포화학법 (Immunocytochemistry)으로 관찰하였다. 근원세포의 분화를 비교하기 위해 MYH3에 대한 항체로 염색하여 단백질 발현을 확인하였다. 그 결과, DMSO에 비해 도부타민 염산염 (0.2 uM)을 처리하였을 때 MYH3의 발현이 매우 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다 (도 5).

[0062]

실시예 5. 웨스턴 블롯 분석

[0063]

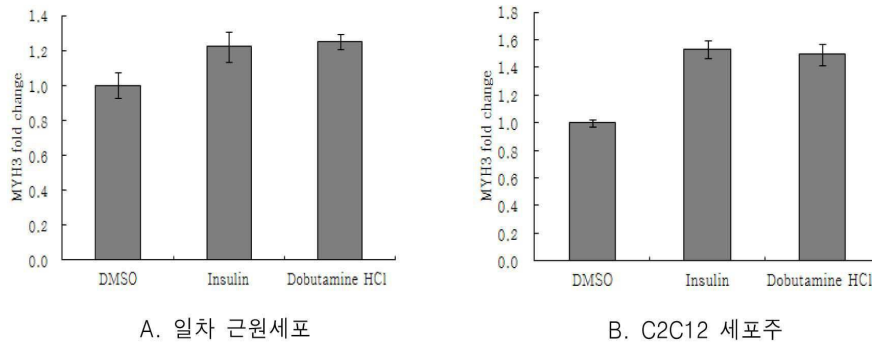
대조구 DMSO, 인슐린 (6 ng/ml) 및 도부타민 염산염 (0.2 uM)을 각각 처리하여 일차 근원세포의 분화를 유도한 후 3일째에 세포를 수거하여 SDS-PAGE로 전개하고, 나일론 막으로 옮긴 후 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 그 결과 동량의 단백질에 포함된 MYH3 단백질의 양이 도부타민 염산염 처리구에서 매우 증가한 것을 확인하였다. 대조군인 DMSO 처리에 의한 MYH3 발현은 미미하였고, 도부타민 염산염에 의한 MYH3의 발현은 분화 촉진 약물로 보고된 인슐린에 의한 발현 증가보다 높게 나타났다 (도 6의 A). 이것은 동량의 단백질에서 차지하는 미오신 단백질의 양이 도부타민 염산염에 의해 급격하게 증가한 것을 보여주는 것으로 도부타민 염산염에 의한 근원세포 분화 촉진 효과가 높다는 것을 알 수 있었다.

[0064]

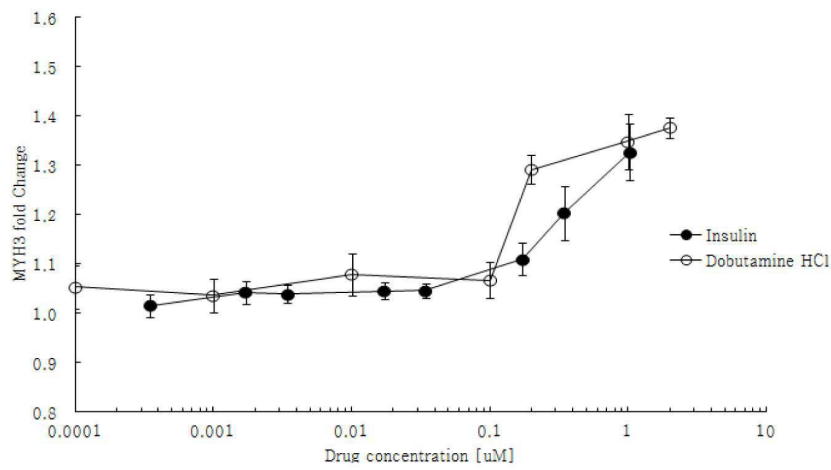
C2C12 세포주에 DMSO, 인슐린 (6 ng/ml) 및 도부타민 염산염 (0.2 uM)을 각각 처리하여 근원세포 분화를 유도한 후 3일째에 각 세포에 대한 웨스턴 블롯 분석을 수행한 결과, 동량의 단백질에 포함된 MYH3 단백질의 양이 증가한 것을 확인하였다. C2C12 세포주에서 도부타민 염산염 처리에 의한 MYH3의 발현 수준은 인슐린에 의한 발현보다 낮았으나 대조군인 DMSO 처리에 의한 발현에 비해서는 매우 높게 나타났다 (도 6의 B). 이것은 동량의 단백질에서 차지하는 미오신 단백질의 양이 도부타민 염산염에 의해 급격하게 증가한 것을 보여주는 것으로 일차 근원세포에서와 같이 C2C12 세포주에서도 도부타민 염산염에 의한 근세포 분화촉진 효과가 매우 높다는 것을 알 수 있었다.

도면

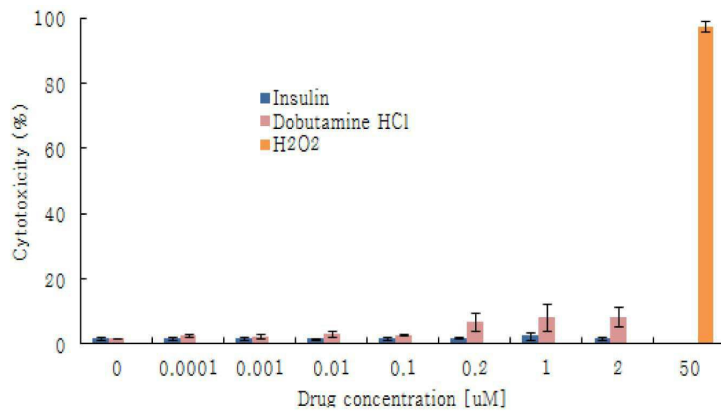
도면1



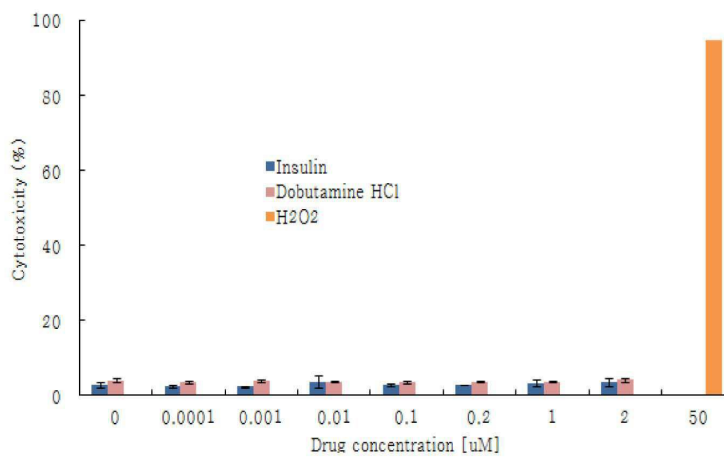
도면2



도면3

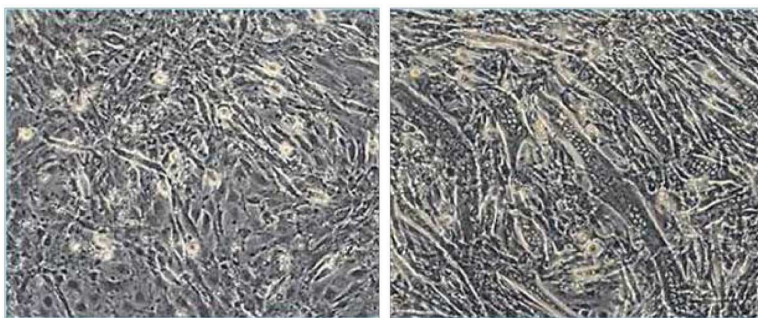


A. 세포 배양 배지 (GM)에서의 세포 독성



B. 세포 분화 배지 (DM)에서의 세포 독성

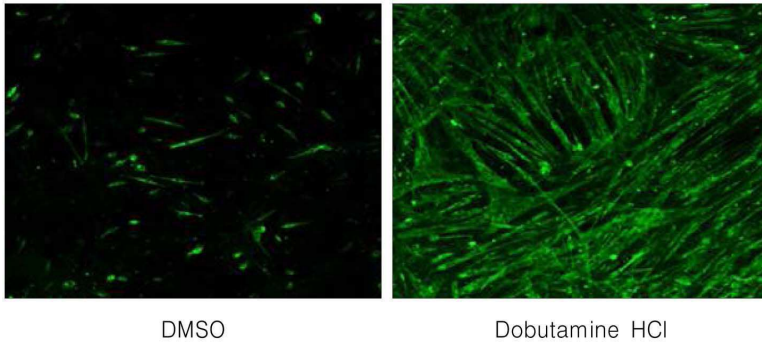
도면4



DMSO

Dobutamine HCl

도면5



도면6

