

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0030754 (43) 공개일자 2009년03월25일
(51) Int. Cl. <i>A61K 31/352</i> (2006.01) <i>A61P 3/04</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2007-0096272 (22) 출원일자 2007년09월21일 심사청구일자 2007년09월21일	(71) 출원인 한림대학교 산학협력단 강원 춘천시 한림대학길 39 (72) 발명자 강영희 강원 춘천시 옥천동 한림대학교 생명과학관 8513호 신승용 강원 춘천시 후평동 575-4 동산아파트 102동 801호 전종갑 강원 춘천시 옥천동 한림대학교 화학과 (74) 대리인 김동완	

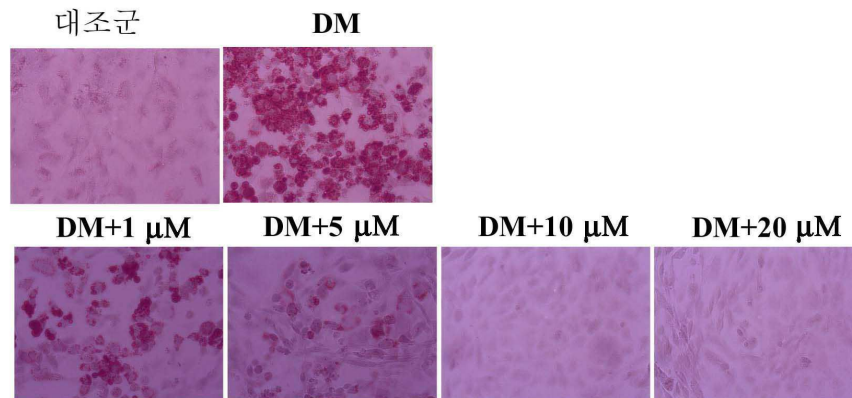
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 테커시놀을 유효 성분으로 포함하는 비만 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 당귀 추출물 또는 합성으로 제조된 테커시놀을 유효 성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 테커시놀이 지방세포의 형성을 억제하고 지방세포 형성에 관여하는 피피에이알 감마(PPAR γ) 및 씨/이비피알파(C/EBP α) 단백질 발현 억제효과를 측정함으로써 테커시놀을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

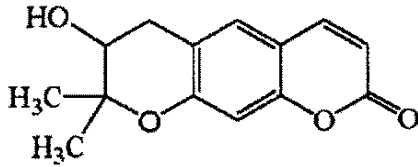
대표도



특허청구의 범위

청구항 1

당귀에서 추출된 또는 합성된 하기 식 I의 데커시놀을 유효성분으로 함유하는 비만 치료 및 예방용 조성물:



화학식 I

청구항 2

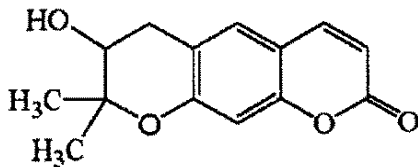
제 1항에 있어서, 상기 데커시놀은 농도 의존적으로 지방세포 분화에 관여하는 PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor γ) 또는 C/EBP α (CCAAT/인핸서-결합 단백질 α)의 발현을 억제함으로써 지방세포 증가를 억제시킴을 특징으로 하는 비만 치료 및 예방용 조성물

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 당귀 추출물 또는 합성으로 제조된 하기 화학식 I로 표시되는 데커시놀을 유효 성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 데커시놀이 지방세포의 형성을 억제하고 지방세포 형성에 관여하는 피피에이알 감마(PPAR γ) 및 씨/이비피알파(C/EBP α) 단백질 발현 억제효과를 측정함으로써 데커시놀을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.



<2>

<3> 화학식 I

배경 기술

<4> 데커시놀은 통상 당귀(*Angelica gigas*)로부터 추출 분리 정제하여 얻을 수 있는 화합물로서 그 구체적인 추출 및 정제방법은 Korean J. Pharmacogn., 21, 64-68(1990) 등에 기재되어 있다. 한편, 상기 데커시놀은 합성하여 사용할 수 있으며 그 구체적인 방법으로는 Tetsuhiro Nemoto 등., Tetrahedron Letters, 41, 569-9574(2000); Lan Xie 등 J. Med. Chem., 42, 2662-2672(1999) 등의 문헌에 기재되어 있다. 그러나 본 발명에 사용될 수 있는 데커시놀은 이러한 추출 또는 합성방법으로 제조된 것뿐만 아니라 기타의 합성방법으로도 제조된 데커시놀을 포함한다.

<5> 데커시놀의 약리작용에 대하여는 많은 연구가 있어 왔는데, 대한민국 공개특허공보 제2001-80265호 '데커신을 포함하는 의약 조성물'에서는 신장독성 억제 성분으로서 데커신을 포함하는 항암제 조성물 또는 당뇨병 치료제 조성물을 개시하고 있으며 이때 데커신을 유효성분으로 포함하는 암세포 분화유도제 조성물 등을 개시하고 있다. 또한 대한민국 특허 등록제397,950호 '데커시놀 또는 이의 유도체를 포함하는 진통제 조성물'에서는 유효성분으로 데커시놀(decursinol) 또는 이의 유도체를 포함하는 진통제 조성물을 개시하고 있다.

<6> 한편, 대한민국 특허 등록 제187,881호 '데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 하는 항암제'에서는 데커시놀 안젤레이트가 폐암, 간암 세포 등 여러 가지 암세포주에 대하여 항암작용이 있음을 확인하고 이를 유효성분으로

하는 항암제를 개시하고 있다. 또한 대한민국 공개특허공보 제2002-78850호 '신경보호작용을 갖는 당귀추출물 및 이를 함유하는 약학적 제제'에서는 신경보호작용을 갖는 당귀 추출물 및 이를 함유하는 뇌졸중 치료 및 예방을 위한 약학적 제제를 개시하고 있다. 또한 대한민국 공개특허공보 제2006-66175호 '데커신 및/또는 데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 하는 당귀추출물을 포함하는 항암 치료보조제 조성물'에서는 데커신 및/또는 데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 하는 당귀추출물을 포함하는 항암 치료보조제 조성물을 개시하고 있다.

<7> 비만은 우리 몸의 지방조직이 병적으로 증가된 상태로 정의할 수 있다. 에너지 균형면에서 볼 때 우리가 사용하는 에너지보다 더 많은 에너지를 섭취하여 칼로리의 잉여상태가 지속되면 체중이 증가하면서 비만이 초래된다. 이때 과잉 에너지의 대부분은 지방산을 거쳐 트리글리세라이드의 형태로써 지방세포에 축적된다. 이때 지방세포의 숫자나 크기가 증가되면서 지방축적이 시작되는 것이다. 체중 증가의 초기에는 지방세포의 크기가 증가(hypertrophic obesity)하지만 비만이 심해질수록 지방세포의 수가 증가(hypertrophic obesity)하게 되며, 이러한 형태의 비만은 소아비만에서 나타나며 체중 조절이 더욱 어렵다고 알려져 있다. 이처럼 비만이 지방세포와 밀접한 연관이 있으므로 이러한 지방형성에 관여하는 지방세포의 생성과 분화 과정 및 이를 조절하는 기전에 대한 연구가 진행되어 왔다.

<8> PPAR(peroxisome proliferator activated receptors)은 최근 지방세포에서의 유전자 발현과 분화과정에 관여하는 핵내 전사 인자형 수용체이다. 또한 PPAR과 CCAAT 결합 단백질(CCAAT/enhancer-binding protein, C/EBP)이 발견되어 이에 대한 연구가 진행되고 있다. 퍼옥시솜은 진핵생물의 세포내에 공포모양으로 존재하는 미세기관으로서 산화작용에 관여한다. 퍼옥시솜은 간과 신장에 풍부하며 세포내의 지방산을 산화시켜 과산화수소를 만들어 독성 물질의 중화에 이용한다.

<9> 또한 산화효소인 카탈라제를 가지고 있어 세포내에서 생성된 과다한 과산화수소를 물과 산소로 분해하는 기능을 가지고 있다. 퍼옥시솜 증식제(peroxisome proliferator)는 퍼옥시솜의 수를 증가시킬 수 있는 화합물을 총칭하는 명칭이며, 지방과 지방산, 고지혈증 치료제인 피브레이트, 프로스타글란딘 등이 이에 속한다. 이러한 퍼옥시솜 증식제를 리간드(연결물질, ligand)로 하는 핵내 수용체가 발견되었고 이를 총칭하여 PPARs 이라 하며, α , δ , γ 의 세 종류가 있다.

<10> PPAR α 는 간에서 주로 발현되며 지방산의 산화나 독성물질의 중화에 관여하며 염증반응에 연관이 있다. PPAR δ 는 고루 분포하며 작용은 확실치 않다. PPAR γ 이 지방세포의 분화에 관여한다고 알려져 있다. 최근에 지방세포주에서 지방 세포로의 분화과정에 PPAR γ 의 발현이 증가되어 있는 것이 발견되고, 분화능력이 없는 섬유아세포에 PPAR γ 을 발현시키면 섬유아세포는 지방세포로 분화되는 것이 보고된다. 결국 줄기세포에서 분화가 진행되어 지방세포의 전구세포인 프리아디포사이트가 지방세포로 되는 초기단계에 PPAR γ 가 관여하고 있는 것이다.

<11> PPAR는 레티노인산 수용체인 RXR(retinoid X receptor)와 결합한 PPAR/RXR 형태인 헤테로 이량체를 형성하여 존재하며 리간드에 의하여 염색체의 표적 유전자DNA에 결합하여 유전자 전사가 시작된다. 핵내 수용체는 그들을 활성화시키는 화학적 신호를 받아서 작용이 시작되므로 그 생리학적 효과는 아주 크다. 그래서 PPAR γ 리간드에 관한 연구는 비만에 중요한 역할을 가지고 있다.

<12> 따라서 본 발명은 당귀 추출 또는 합성 데커시놀을 사용하여 비만 예방 및 치료용 의약으로 지방세포 증식에 관여하는 PPAR γ 및 C/EBP α 의 단백질 발현 억제 효과를 측정함으로써 데커시놀의 비만 치료 및 예방 기능을 규명함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다.

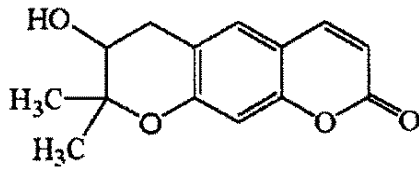
발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<13> 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 한약재로서 오랜 기간에 걸쳐 안전하게 널리 사용되어온 당귀의 약리 활성 성분인 데커시놀의 지방세포 증식 억제 효과를 측정하고 이를 통해 데커시놀을 비만 예방 및 치료용 의약 조성물로서 개발코자 한 것이다.

과제 해결수단

<14> 본 발명의 목적은 당귀에서 추출된 또는 합성된 하기 식 I의 데커시놀을 유효성분으로 함유하는 비만 치료 및 예방용 조성물을 제공하는 것이다:



<15>

<16>

화학식 I

<17>

또한 상기 테커시놀은 농도 의존적으로 지방세포 분화에 관여하는 PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor γ) 또는 C/EBP α (CCAAT/인핸서-결합 단백질 α)의 발현을 억제함으로써 지방세포 증가를 억제시킴을 특징으로 한다.

효 과

<18>

본 발명의 효과는 한약재로서 오랜 기간에 걸쳐 안전하게 널리 사용되어온 당귀의 약리 활성 성분인 테커시놀의 지방세포 증식 억제 효과를 확인하여 이를 통해 테커시놀을 비만 예방 및 치료용 의약 조성물로서 개발한 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<19>

본 발명은 당귀 추출 또는 합성을 통해 수득된 테커시놀을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

<20>

섬유아 세포 3T3-L1에 테커시놀을 분화유도제와 함께 농도별로 처리한 후 8일째 지방염색법(Oil red O)을 이용하여 테커시놀의 지방세포 형성 억제정도를 시험하였다.

<21>

분화유도제를 처리하지 않은 대조군은 지방세포로의 분화가 거의 이루어지지 않아 지방세포의 형성을 거의 관찰할 수 없었다. 한편 분화유도제인 텍사메타존을 처리한 시험군에서는 지방세포의 형성을 명확하게 관찰할 수 있었다.

<22>

분화유도제 텍사메타존과 1 μ M의 테커시놀을 함께 처리한 처리군에서는 어느 정도 지방세포의 형성을 관찰할 수 있었다. 그러나 테커시놀의 농도가 증가함에 따라 지방세포의 형성은 거의 관찰되지 않았다. 10 μ M 이상의 테커시놀을 텍사메타존과 함께 처리한 시험군에서는 대조군과 유사한 정도로 지방세포의 형성을 거의 관찰할 수 없었다. 이를 통해 테커시놀은 전구지방 세포주 3T3-L1의 지방세포로의 분화를 농도 의존적으로 저해하는 것을 측정할 수 있었다.

<23>

따라서 테커시놀은 지방세포의 증식을 억제하고 지방세포 증식에 관여하는 PPAR γ 및 C/EBP α 단백질 발현 억제 효과를 측정할 수 있었다.

<24>

본 발명의 테커시놀은 천연물 추출 또는 합성 등의 방법으로 제조할 수 있다. 또한 본 발명의 테커시놀은 당해 기술 분야의 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물로 제조될 수 있다.

<25>

한편 본 발명의 비만 치료 또는 예방을 위한 조성물은 조성물 총 중량에 대해 화학식 I의 테커시놀을 0.1 내지 90 중량%를 포함할 수 있으며 이 때 약학 조성물은 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제 등을 포함할 수 있다.

<26>

본 발명에 따른 비만 치료 또는 예방용 조성물은 통상의 방법에 따라 정제, 캡슐제, 현탁제 등의 경구형 제형 또는 주사제 등의 비경구형 제형으로 제형화하여 사용될 수 있다.

<27>

본 발명의 비만 치료 또는 예방용 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 상이하지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있으며 바람직한 효과를 위해서는 1일 0.001 내지 10 mg/kg·체중으로 투여할 수 있다.

<28>

또한 본 발명의 테커시놀 화합물은 다양한 건강 기능성 식품 또는 건강 보조 식품으로 제조시 식품의 주성분 또는 보조 성분으로 사용될 수 있다. 즉 본 발명의 테커시놀 화합물은 비만 환자를 위한 식이요법 또는 건강 보조 식품 제조에도 응용 가능하다.

<29>

이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- <30> 본 실시예에 사용된 실험용 세포주 및 배지의 입수방법은 다음과 같다.
- <31> 마우스의 전구지방 세포주 3T3-L1은 한국세포주은행에서 구입하였고, DMEM 배양액, 트립신, FBS(우태아 혈청)은 캄브렉스사(Cambrex Corporation, East Rutherford, NJ)에서 구입하였다.
- <32> (실시예 1) 데커시놀의 지방세포 증식 억제작용 확인
- <33> 3T3-L1 섬유아세포를 10% 혈청과 항생제가 포함된 DMEM 배지가 들어있는 12 웰 플레이트에 7×10^3 /ml 농도로 넣고 이산화탄소 배양기에서 24시간 프리-인큐베이션시켰다. 그 후 인슐린 1 micromol, 이소부틸메틸크산틴(isobutylmethylxanthine) 250 mmol 및 덱사메타존(dexamethasone) 1 micromol을 처리하여 8일 동안 처리하여 지방세포로 분화시켰다. 이 때 4일마다 배지를 바꾸어 주었고 분화를 위한 시약과 데커시놀을 농도별로 처리하고 배양하여 지방세포로 분화되는 정도를 확인하였다.
- <34> 8일 동안 지방세포(adipocytes)로 분화(differentiation)시킨 다음 배지를 버리고 인산완충용액(phosphate buffered saline, PBS)으로 2회 세척한 후 4% 포르말데하이드 용액에서 20분 동안 고정한 뒤 0.2% Tween 20을 포함하고 있는 인산완충용액으로 3회 세척한 다음, 지방염색용 시약(oil red O)으로 1시간 동안 염색하였다. 염색된 세포를 세척한 후 현미경으로 관찰하였다.
- <35> 이와 같은 결과는 도 1에 나타내었다.
- <36> 도 1에 나타난 바와 같이 섬유아 세포 3T3-L1에 데커시놀을 농도별로 처리한 후 8일째 지방염색법(Oil red O)을 이용하여 지방 형성 억제 정도를 나타낸 것이다. 여기에서 덱사메타존(DM)은 분화유도제이고, 대조군은 분화유도제를 처리하지 않은 것이다.
- <37> 분화유도제를 처리하지 않은 대조군은 지방세포로의 분화가 거의 이루어지지 않아 지방세포의 형성을 거의 관찰할 수 없었다. 한편 분화유도제인 덱사메타존을 처리한 시험군에서는 지방세포의 형성을 명확하게 관찰할 수 있었다. 분화유도제 덱사메타존과 1 μ M의 데커시놀을 함께 처리한 처리군에서는 어느 정도 지방세포의 형성을 관찰할 수 있었다. 그러나 데커시놀의 농도가 증가함에 따라 지방세포의 형성은 거의 관찰되지 않았다. 10 μ M 이상의 데커시놀을 덱사메타존과 함께 처리한 시험군에서는 대조군과 유사한 정도로 지방세포의 형성을 거의 관찰할 수 없었다. 이를 통해 데커시놀은 전구지방 세포주 3T3-L1의 지방세포로의 분화를 농도 의존적으로 저해하는 것을 측정할 수 있었다.
- <38> (실시예 2) 데커시놀의 지방형성 관련 단백질 발현 억제작용 확인
- <39> 3T3-L1 섬유아세포를 10% 혈청과 항생제가 포함된 DMEM 배지가 들어있는 60 mm 배양접시에 6×10^4 /ml 농도로 넣고 이산화탄소 배양기에서 24시간 프리-인큐베이션시켰다. 그 후 인슐린 1 micromol, 이소부틸메틸크산틴 250 mmol 및 덱사메타존 1 micromol을 5일 동안 처리하여 지방세포로 분화시켰다. 이 때 분화를 위한 시약과 데커시놀을 농도별(1, 5, 10 및 20 micromol)로 동시에 처리하여 배양세포를 준비하였다.
- <40> 세포 용해물은 배양된 3T3-L1 섬유아세포로부터 10% SDS, 1% β -글리세로포스페이트, 0.1 M Na_3VO_4 , 0.5 M NaF 및 프로티아제 억제 각테일을 포함하는 1 mol Tris-HCl 세포용해 완충액에서 얻었다.
- <41> 상기 세포에서 PPAR γ 와 C/EBP α 단백질의 발현을 측정하기 위하여 동일한 양의 총 단백질을 포함하는 세포 용해물을 이용하여 10%의 SDS-PAGE를 수행하였다. 전기영동된 단백질 밴드들을 나이트로셀룰로스 막으로 전이시켰고, 비특이적인 결합의 방지를 위하여 3시간 동안 3% BSA(우혈청 알부민)를 포함하는 TBS-T 완충액 [0.5M Tris-HCl (pH 7.5), 1.5M NaCl, 0.1% Tween 20]을 이용하였다. 상기 막은 PPAR γ 와 C/EBP α 단백질의 1차 항체(Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA)를 1,000배 희석하여 교반하면서 3시간 동안 배양시키고, 그 후 TBS-T 완충액로 세 번 세척하고 나서 염소 항-토끼 IgG 호오스래디쉬 퍼옥시다제(1:10,000, Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA)의 2차 항체로 1시간 동안 반응시켰다.
- <42> PPAR γ 와 C/EBP α 단백질의 양은 슈퍼시그널 웨스트 피코 화학발광기(Supersignal West pico chemiluminescence, Pierce Biotech. Inc., Rockford, IL)로 검출하여 코니카 X-레이 필름으로 촬영하여 도 2에 나타내었다. 이 때, 단일클로날 마우스 β -액틴 항체(1:10,000)를 처리한 것을 대조군으로 하여 측정하였다.
- <43> 이와 같은 결과는 도 2에 나타내었다.
- <44> 섬유아 세포 3T3-L1에 데커시놀을 농도별로 처리한 후 5일째 지방 형성에 관여하는 단백질 PPAR γ 및 C/EBP α 의

발현 억제정도를 나타낸 것이다.

<45> 도 2에 나타난 바와 같이 PPAR γ 1(53 kDa) 단백질의 경우 테커시놀 농도 의존적으로 단백질 발현량이 감소하는 것을 명백히 확인할 수 있었다. 또한 PPAR γ 2(57kDa) 단백질의 경우에도 테커시놀 농도 의존적으로 단백질 발현량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 다만 C/EBP α 의 농도 의존적 발현 억제 정도는 유의적으로 관찰하기 어려웠으나 20 μ M 이상의 테커시놀 농도에서는 단백질 발현을 거의 관찰할 수 없었다.

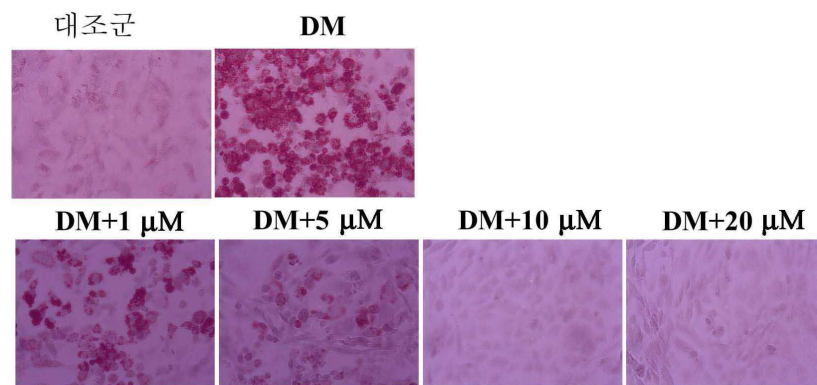
도면의 간단한 설명

<46> 도 1은 섬유아 세포 3T3-L1에 테커시놀을 농도별로 처리한 후 8일째 지방염색법(Oil red O)을 이용하여 지방 형성 억제정도를 나타낸 것이다. 여기에서 DM은 분화유도물질이고, 대조구는 분화유도물질을 처리하지 않은 것이다.

<47> 도 2는 섬유아 세포 3T3-L1에 테커시놀을 농도별로 처리한 후 5일째 지방 형성에 관여하는 단백질의 발현 억제정도를 나타낸 것이다.

도면

도면1



도면2

