

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0040496 (43) 공개일자 2009년04월27일
(51) Int. Cl. <i>A61K 31/34</i> (2006.01) <i>A61P 3/04</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2007-0105881 (22) 출원일자 2007년10월22일 심사청구일자 2007년10월22일	(71) 출원인 한림대학교 산학협력단 강원 춘천시 한림대학길 39 (72) 발명자 강영희 강원 춘천시 옥천동 한림대학교 생명과학관 8513호 신승용 강원 춘천시 후평동 575-4 동산아파트 102-801 강일준 강원 춘천시 퇴계동 중앙하이츠빌아파트 103-1508	

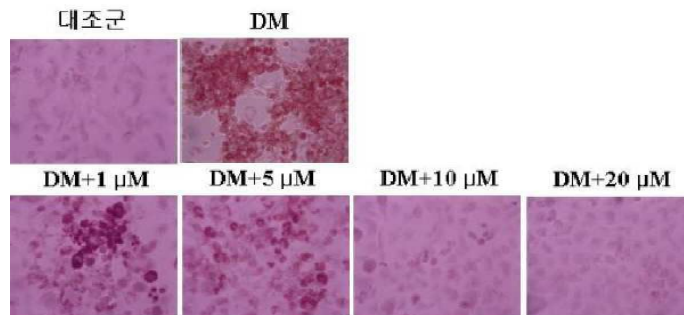
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 징코라이드 에이를 유효성분으로 포함하는 비만 치료 및 예방용 조성물

(57) 요약

본 발명은 징코라이드 에이(ginkgolide A) 및 빌로발라이드(bilobalide)를 유효성분으로 포함하는 비만 억제용 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 징코라이드 에이 및 빌로발라이드가 지방세포의 형성을 억제하고 지방세포 형성에 관여하는 퍼피에이알 감마(PPAR γ) 및 씨/이비피알파(C/EBP α) 단백질 발현 억제효과를 측정함으로써 징코라이드 에이 및 빌로발라이드를 유효성분으로 포함하는 비만 억제용 조성물에 관한 것이다.

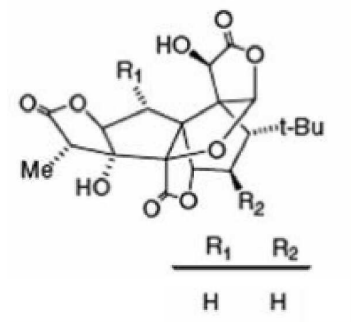
대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

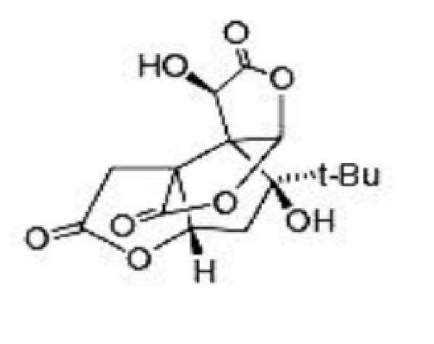
하기 식 I의 징코라이드 에이를 유효성분으로 포함하는 비만 억제용 조성물



화학식 I

청구항 2

하기 식 II의 빌로발라이드를 유효성분으로 포함하는 비만 억제용 조성물



화학식 II

청구항 3

제 1항에 있어서, 징코라이드 에이이 지방세포 분화에 관여하는 PPAR γ 또는 C/EBP α 의 발현을 억제함으로써 지방세포 분화를 억제시킴을 특징으로 하는 비만 억제용 조성물

청구항 4

제 2항에 있어서, 빌로발라이드가 지방세포 분화에 관여하는 PPAR γ 또는 C/EBP α 발현을 억제함으로써 지방세포 분화를 억제시킴을 특징으로 하는 비만 억제용 조성물

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 징코라이드 에이(ginkgolide A) 및 빌로발라이드(bilobalide)를 유효성분으로 포함하는 비만 억제용 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 징코라이드 에이 및 빌로발라이드가 지방세포의 형성을 억제하고 지방세포 형성에 관여하는 피피에이알 감마(PPAR γ) 및 씨/이비피알파(C/EBP α) 단백질 발현 억제효과를 측정함으로써 징코라이드 에이 및 빌로발라이드를 유효성분으로 포함하는 비만 억제용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 은행나무(Ginkgo biloba)는 은행나무과(Ginkgoaceae)에 속하는 낙엽교목으로서 많은 성분들이 밝혀졌다. 그 중에서 플라보노이드(flavonoid)에 관한 연구가 활발해지면서 다양한 생리활성과 약리작용이 밝혀지고 임상실험을 통해 의약품으로도 많이 개발, 시판되고 있다. 은행나무에는 많은 유효 생리 활성 물질이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 은행나무 열매에는 페놀(phenol)성 화합물체인 징코올(ginkgol), 빌로볼(bilobal), 징코올산(ginkgolic acid) 등이 함유되어 있으며, 은행나무의 씨에는 청산배당체(cyanogenetic glycosides), 아미노산 등이 함유되어 있다. 잎에는 방향족 화합물, 특히 페놀성 화합물계, 플라보노이드 배당체(flavonoid glycosides) 및 단순 플라보노이드인 캠페롤(keampferol), 퀘르세틴(quercetin), 아이소람네티(isorhamnetin), 루테올린(luteolin) 등과 테르페노이드(terpenoid) 화합물로 징코라이드(ginkgolide) 및 빌로발라이드(bilobalide) 등이 함유되어 있다. 활성 분자의 다수가 가장 우세한 플라본 글라이코시드 및 테르페노이드를 포함한 은행나무 잎에서 동정되었다.
- <3> 동정된 플라본 글라이코시드에는 캠페롤, 퀘르세틴, 이소르함네티, 시아도피티신, 진게틴, 아멘토플라본, 비보베텐, 세콰이아플라본 및 이소진게틴이 있다. 상기 테르페노이드에는 징코라이드 A, B 및 C 및 빌로발라이드를 포함한다. 특히 징코라이드는 천식, 죽상동맥경화 및 뇌졸중의 치료에 유용하며 운동신경의 회복에 도움이 될 수 있고 특정 기생충 감염에 사용될 수도 있다.
- <4> 특히, 대한민국 공개특허공보 제2005-0021479호 ‘근육량을 증가시켜 지방량을 감소시키기 위한 은행나무추출물의 용도’에서는 은행나무추출물을 이용하여 근육량을 증가시켜 지방량을 감소시키는 효과를 개시하고 있다.
- <5> 상기와 같이, 은행나무추출물의 혈관성 약리성분을 이용한 다양한 연구가 진행되어 왔지만 징코라이드 에이 및 빌로발라이드를 이용한 비만 억제와 관련된 기작에 대한 연구는 아직까지 밝혀진 바 없다.
- <6> 비만은 우리 몸의 지방조직이 병적으로 증가된 상태로 정의할 수 있다. 에너지 균형 면에서 볼 때 우리가 사용하는 에너지보다 더 많은 에너지를 섭취하여 칼로리의 잉여상태가 지속되면 체중이 증가하면서 비만이 초래된다. 이때 과잉 에너지의 대부분은 지방산을 거쳐 트리글리세라이드의 형태로서 지방세포에 축적된다. 이때 지방세포의 숫자나 크기가 증가되면서 지방축적이 시작되는 것이다. 체중 증가의 초기에는 지방세포의 크기가 증가(hypertrophic obesity)하지만 비만이 심해질수록 지방세포의 수가 증가(hyperplastic obesity)하게 되며, 이러한 형태의 비만은 소아비만에서 나타나며 체중 조절이 더욱 어렵다고 알려져 있다(hypertrophic-hyperplastic obesity). 이처럼 비만이 지방세포의 형성과 밀접한 연관이 있으므로 이러한 지방형성에 관여하는 지방세포의 생성과 분화 과정 및 이를 조절하는 기전에 대한 연구가 진행되어 왔다.
- <7>
- <8> 지방화(Adipogenesis)란 지방전구세포(pre-adipocyte)로부터 지방세포가 분화되어 지방을 축적하게 되는 과정으로서, 이는 비만(obesity), 당뇨병(diabetes), 지방간(steatosis), 관상 심장질환(coronary heart disease)과 같은 질병을 일으킬 수 있는 위험 요인으로 알려져 있다. 성숙한 지방세포(adipocytes or fat cells)는 섬유아세포(fibroblast)와 같은 지방전구세포(pre-adipocyte)로부터 분화(differentiation)되어 궁극적으로 세포 내에 지방 방울(lipid droplet)을 형성하게 된다. 지방세포의 분화 과정은 3T3-L1과 같은 세포를 이용하여 연구되어 왔으며, 여러 종류의 전사인자(transcription factor)들, 특히 지방화에 관여하는 것으로 알려진 전사인자, PPAR(peroxisome proliferator activated receptors)은 지방세포에서의 유전자 발현과 분화과정에 관여하는 핵 내 전사인자형 수용체이다. 또한 PPAR과 CCAAT 결합 단백질(CCAAT/enhancer-binding protein, C/EBP)이 발견되어 이에 대한 연구가 진행되고 있다.
- <9> 최근에 지방세포주에서 지방 세포로의 분화과정에 PPAR γ 의 발현이 증가되어 있는 것이 발견되고, 분화능력이 없는 섬유아세포에 PPAR γ 를 발현시키면 섬유아세포는 지방세포로 분화되는 것이 보고된다. 결국 줄기세포에서 분화가 진행되어 지방세포의 전구세포가 지방세포(adipocyte)로 되는 단계에 PPAR γ 와 C/EBP가 관여하고 있는 것이다.
- <10> 따라서 본 발명은 지방세포 분화에 관여하는 PPAR γ 및 C/EBP α 의 단백질 발현 억제 효과를 측정함으로써 징코라이드 에이 및 빌로발라이드를 유효성분으로 포함하는 비만 억제용 조성물을 제공하려는 것이다.

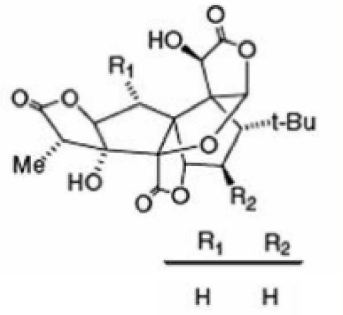
발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<11> 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 징코라이드 에이 및 빌로발라이드의 지방세포 분화 억제 효과를 측정하고 이를 통해 징코라이드 에이 및 빌로발라이드를 비만 억제용 조성물로서 제공하려는 것이다.

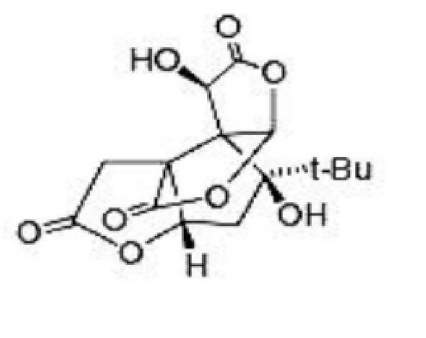
과제 해결수단

<12> 본 발명의 목적은 하기 식 I 의 징코라이드 에이 및 하기 식 II 의 빌로발라이드를 유효성분으로 함유하는 비만 억제용 조성물을 제공하는 것이다:



<13>

<14> 화학식 I



<15>

<16> 화학식 II

<17> 또한 상기 징코라이드 에이 및 빌로발라이드는 지방세포 분화에 관여하는 PPAR γ 또는 C/EBP α 의 발현을 억제 함으로서 지방세포 분화를 억제시킴을 특징으로 한다.

효 과

<18> 본 발명의 효과는 징코라이드 에이 및 빌로발라이드의 지방세포 분화 억제 효과를 확인하여 이를 통해 징코라이드 에이 및 빌로발라이드를 비만 억제용 조성물로 제공하는 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<19> 본 발명은 징코라이드 에이 및 빌로발라이드를 유효성분으로 포함하는 비만 억제용 조성물에 관한 것이다.

<20> 지방전구세포 3T3-L1에 징코라이드 에이 및 빌로발라이드를 분화유도제와 함께 농도별로 처리한 후 8일째 지방 염색법(Oil red O)을 이용하여 징코라이드 에이 및 빌로발라이드의 지방세포 형성 억제정도를 시험하였다.

<21> 분화유도제를 처리하지 않은 대조군은 지방세포로의 분화가 거의 이루어지지 않아 지방세포의 형성을 거의 관찰 할 수 없었다. 한편 분화유도제인 텍사메타존(dexamethasone)을 처리한 시험군에서는 지방세포의 형성을 명확 하게 관찰할 수 있었다.

<22> 분화유도제 텍사메타존과 1 μ M의 징코라이드 에이 및 빌로발라이드를 함께처리한 군에서는 어느 정도 지방세포 의 형성을 관찰할 수 있었다. 그러나 징코라이드 에이 및 빌로발라이드의 농도가 증가함에 따라 지방세포의 형성이 감소하여 10 μ M의 징코라이드 에이 및 빌로발라이드를 텍사메타존과 함께 처리한 시험군에서는 대조군 과 유사한 정도로 지방세포의 형성을 거의 관찰할 수 없었다. 이를 통해 징코라이드 에이 및 빌로발라이드가 지방전구세포 3T3-L1의 지방세포로의 분화를 농도 의존적으로 저해하는 것을 측정할 수 있었다.

- <23> 또한 징코라이드 에이 및 빌로발라이드는 지방세포의 분화를 억제하고 지방세포 분화에 관여하는 PPAR γ 및 C/EBP α 단백질 발현 억제효과를 웨스턴블롯으로 측정할 수 있었다.
- <24> 본 발명의 징코라이드 에이 및 빌로발라이드는 시판되고 있는 물질을 구입하거나 추출 등의 방법으로 용이하게 구입 가능한 것이다. 또한 본 발명의 징코라이드 에이 및 빌로발라이드는 당해 기술 분야의 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물로 제조될 수 있다.
- <25> 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다.
- <26> 본 발명에 따른 비만 억제용 조성물은 통상의 방법에 따라 정제, 캡슐제, 현탁제 등의 경구형 제형 또는 주사제 등의 비경구형 제형으로 제형화하여 사용될 수 있다.
- <27> 본 발명의 조성물 내의 징코라이드 에이 및 빌로발라이드의 투약량은 다양할 수 있다. 그러나, 활성 성분의 함량은 적절한 투약 형태가 얻어 지는 양이 바람직하다. 선택된 투약량은 원하는 치료효과, 투여 경로, 및 치료 기간에 따라 결정된다. 1회 분량은 단일 용량으로 투여되거나, 여러 번으로 나누어 투여될 수 있다.
- <28> 징코라이드 에이 및 빌로발라이드의 유효량은 치료 상태 및 선택된 투여 경로에 따라 좌우되며, 궁극적으로는 치료를 수행하는 의사 또는 수의사에 의하여 결정될 것이다. 징코라이드 에이는 0.1 내지 5 mg/kg체중으로 투여될 수 있으며, 빌로발라이드는 0.05 내지 2 m/kg체중, 바람직하게는 0.1 내지 1 mg의 함량으로 투여될 수 있다.
- <29> 또한 본 발명의 징코라이드 에이 및 빌로발라이드 화합물은 다양한 건강 기능성 식품 또는 건강 보조 식품으로 제조시 식품의 주성분 또는 보조 성분으로 사용될 수 있다. 즉 본 발명의 징코라이드 에이 및 빌로발라이드 화합물은 비만 억제를 위한 식이요법 또는 건강 보조 식품 제조에도 응용 가능하다.
- <30> 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- <31> 본 실시예에 사용된 실험용 시험 재료의 입수방법은 다음과 같다.
- <32> 마우스의 지방전구세포 3T3-L1은 한국세포주은행에서 구입하였고, DMEM 배지, 트립신, FBS(우태아 혈청)은 캄브렉스사(Cambrex Corporation, East Rutherford, NJ)에서 구입하였다. 징코라이드 에이 및 빌로발라이드는 Sigma Chemical(St. Louis, MO)로부터 구입하였다.
- <33> (실시예 1) 징코라이드 에이 및 빌로발라이드의 지방세포 분화 억제작용 확인
- <34> 지방전구세포 3T3-L1을 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 μ M, 이소부틸메틸크산틴(isobutylmethylxanthine) 250 mM 및 텍사메타존 1 μ M을 처리하여 8일 동안 지방세포로 분화시켰다. 이 때 4일마다 배지를 바꾸어 주었고 분화를 위한 시약과 징코라이드 에이 및 빌로발라이드를 농도별로 처리하고 배양하여 지방세포로 분화되는 정도를 확인하였다.
- <35> 8일 동안 지방세포로 분화시킨 다음 배지를 버리고 인산완충용액(phosphate buffered saline)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.
- <36> 이와 같은 결과는 도 1과 도 2에 나타내었다.
- <37> 도 1과 도 2는 각각 지방전구세포 3T3-L1에 징코라이드 에이 및 빌로발라이드를 농도별로 처리한 후 8일째 Oil red O를 이용하여 지방 형성 억제정도를 나타낸 것이다. 여기에서 텍사메타존은 분화유도제이고, 대조군은 분화유도제를 처리하지 않은 것이다.
- <38> 도 1과 도 2에서 나타낸 바와 같이 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.

<39>

<40> 도 1과 도2에서 나타낸 바와 같이 분화유도제 텍사메타존과 1 μ M의 징코라이드 에이 및 빌로발라이드를 함께 처리한 처리군에서는 어느 정도 지방세포의 형성을 관찰할 수 있었다. 그러나 도 1에서 나타낸 바와 같이 징코라이드 에이의 농도가 증가함에 따라 지방세포의 형성은 거의 관찰되지 않았다. 10 μ M 이상의 징코라이드 에이를 텍사메타존과 함께 처리한 시험군에서는 대조군과 유사한 정도로 지방세포의 형성을 거의 관찰할 수 없었다. 또한 도 2에서 나타낸 바와 같이 빌로발라이드의 농도가 증가함에 따라 지방세포의 형성이 줄어든 것을 관찰할 수 있었다. 20 μ M 이상의 빌로발라이드를 텍사메타존과 함께 처리한 시험군에서는 대조군과 유사한 정도로 지방세포의 형성을 거의 관찰할 수 없었다. 이를 통해 징코라이드 에이 및 빌로발라이드는 지방전구세포 3T3-L1의 지방세포로의 분화를 농도 의존적으로 저해하는 것을 측정할 수 있었다.

<41> (실시예 2) 징코라이드 에이 및 빌로발라이드의 지방세포 분화 관련 단백질 발현 억제작용 확인

<42> 지방전구세포 3T3-L1을 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 μ M, 이소부틸메틸크산틴 250 mM 및 텍사메타존 1 μ M을 5일 동안 처리하여 지방세포로 분화시켰다. 이 때 분화를 위한 시약과 징코라이드 에이 및 빌로발라이드를 농도별(1, 5, 10 및 20 μ M)로 동시에 처리하여 배양세포를 준비하였다.

<43> 지방형성 관련 단백질 발현을 측정하기 위하여 웨스턴 블롯 방법을 수행하였다. 세포 용해물은 배양된 3T3-L1 지방전구세포로부터 10% SDS, 1% β -글리세로포스페이트, 0.1 M Na_3VO_4 , 0.5 M NaF 및 프로티아제 억제 카테일을 포함하는 1 M Tris-HCl 세포용해 완충액에서 얻었다.

<44> 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.

<45> 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 3과 도 4에 나타내었다. 이 때, 단일클로날 마우스 β -액틴 항체(1:10,000)를 처리한 것을 대조군으로 하여 측정하였다.

<46> 이와 같은 결과는 도 3과 도 4에 나타내었다.

<47> 도 3과 도 4는 각각 지방전구세포 3T3-L1에 징코라이드 에이 및 빌로발라이드를 농도별로 처리한 후 5일째 지방세포 분화에 관여하는 단백질 PPAR γ 및 C/EBP α 의 발현 억제정도를 나타낸 것이다.

<48> 도 3에 나타낸 바와 같이 PPAR γ 1(53 kDa)과 PPAR γ 2(57kDa) 단백질의 경우 20 μ M 이상의 징코라이드 에이 농도에서 단백질 발현량이 거의 관찰할 수 없었다. 마찬가지로 20 μ M 이상의 농도에서 C/EBP α 의 단백질 발현도 거의 관찰할 수 없었다.

<49> 도 4에 나타낸 바와 같이 PPAR γ 1(53 kDa)과 PPAR γ 2(57kDa)단백질의 경우 빌로발라이드 농도 의존적으로 단백질 발현량이 감소하는 것을 명백히 확인할 수 있었다. 또한 C/EBP α 단백질의 경우에도 농도 의존적으로 발현이 억제되었으며 10 μ M 이상의 빌로발라이드 농도에서는 단백질 발현을 거의 관찰할 수 없었다.

도면의 간단한 설명

<50> 도 1은 3T3-L1 세포에 징코라이드 에이를 농도별로 처리한 후 8일째 지방염색법(Oil red O)을 이용하여 지방 형성 억제정도를 나타낸 것이다. 여기에서 DM은 분화유도제이고, 대조구는 분화유도제를 처리하지 않은 것이다.

<51> 도 2는 3T3-L1 세포에 빌로발라이드를 농도별로 처리한 후 8일째 지방염색법(Oil red O)을 이용하여 지방 형성 억제정도를 나타낸 것이다. 여기에서 DM은 분화유도제이고, 대조구는 분화유도제를 처리하지 않은 것이다.

<52> 도 3은 3T3-L1 세포에 징코라이드 에이를 농도별로 처리한 후 5일째 지방세포 분화에 관여하는 단백질의 발현

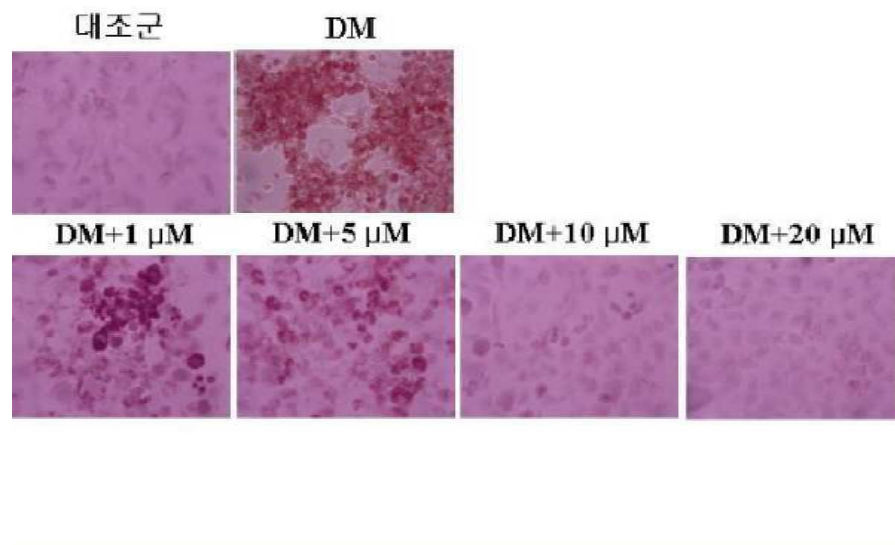
억제정도를 나타낸 것이다.

<53>

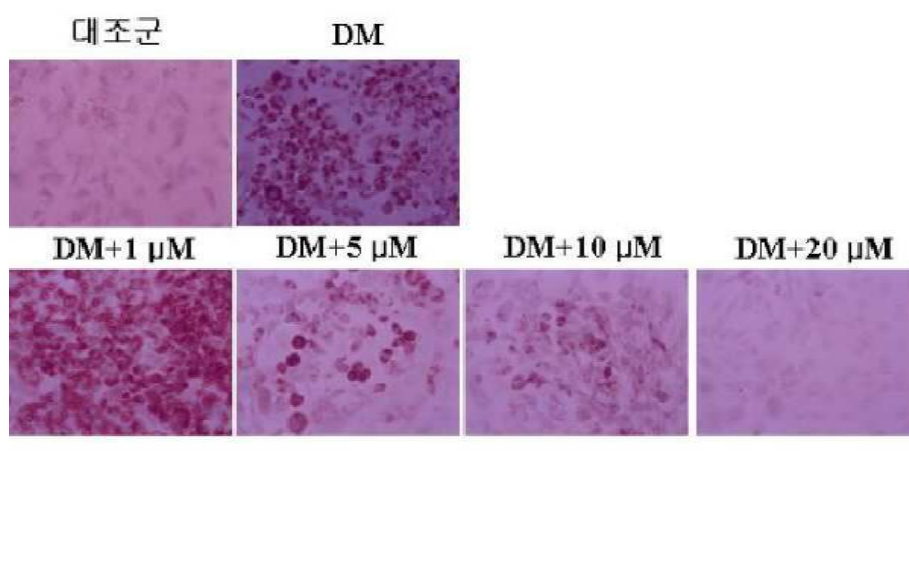
도 4는 3T3-L1 세포에 빌로발라이드를 농도별로 처리한 후 5일째 지방세포 분화에 관여하는 단백질의 발현 억제정도를 나타낸 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3



도면4

