

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0025914 (43) 공개일자 2014년03월05일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/336 (2006.01) A61K 36/03 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)		(71) 출원인 부경대학교 산학협력단 부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(21) 출원번호 10-2012-0092486		(72) 발명자 최재수 부산광역시 남구 오륙도로 85, 109동 204호(용호동, 오륙도 SK뷰아파트)
(22) 출원일자 2012년08월23일 심사청구일자 2012년08월23일 기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도		정현아 전라북도 전주시 덕진구 소리로 179, 212동 1604호(호성동1가, 호성주공2단지)
		우희철 부산광역시 남구 분포로 111, 133동 406호(용호동, LG메트로시티)
		(74) 대리인 위병갑

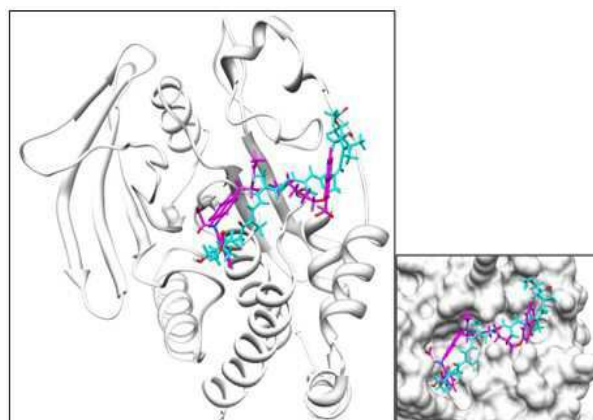
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 푸코잔틴을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 합병증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 푸코잔틴의 당뇨병 합병증 예방 또는 치료의 신규 용도에 관한 것으로, 자세하게는 대황(*Eisenia bicyclis*), 미역(*Undaria pinnatifida*) 또는 톳(*Hijikia fusiformis*)과 같은 해양 갈조류로부터 유래된 푸코잔틴을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 합병증 예방 또는 치료(개선)용 약학조성물, 건강기능식품 및 인슐린 민감성 증진제에 관한 것이다. 본 발명의 푸코잔틴(Fucoxanthin)은 알도즈 환원효소 억제 활성과 최종당화생성물 억제 활성이 우수할 뿐만 아니라, PTP1B 억제 활성을 통해 인슐린 신호전달을 증가시킴으로써 인슐린 저항성을 개선할 수 있다. 따라서 본 발명의 푸코잔틴은 인슐린 저항성을 특징으로 하는 제2형 당뇨병 치료와 더불어, 당뇨병 합병증을 예방 또는 치료할 수 있는 물질로서 약리학적 조성물과 같은 의약품은 물론이고, 건강기능식품 등으로 활용할 수 있어 식품산업 및 의약산업에 응용될 경우 그 가치가 매우 높을 것으로 기대된다. 특히 본 발명의 푸코잔틴(Fucoxanthin)은 천연물로부터 유래된 물질로서, 세포독성 없이 안정성을 가지므로, 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 장기적 사용에도 안전한 이점을 가진다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 CD20110521

부처명 농림수산식품부

연구사업명 용역사업

연구과제명 해조류 바이오매스 에너지화 및 통합적 활용 기반구축

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교 청정생산기술연구소

연구기간 2011.10.05 ~ 2012.08.03

특허청구의 범위

청구항 1

푸코잔틴(Fucoxanthin)을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 합병증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 푸코잔틴은 해양 갈조류로부터 유래된 것을 특징으로 하는 당뇨병 합병증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 갈조류는 대황(*Eisenia bicyclis*), 미역(*Undaria pinnatifida*) 또는 툇(*Hijikia fusiformis*)인 것을 특징으로 하는 당뇨병 합병증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 알도즈 환원효소 억제 활성 및 최종당화생성물 억제 활성을 통해 당뇨병 합병증 치료 효과를 가지는 것을 특징으로 하는 당뇨병 합병증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 PTP1B 억제 활성을 통해 인슐린 신호전달을 증가시킴으로써 인슐린 저항성을 개선하는 것을 특징으로 하는 당뇨병 합병증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 PTP1B 억제는 PTP1B의 Phe30, Phe52 및 Gly183 잔기들과 푸코잔틴의 2개의 히드록실 그룹 사이에 형성되는 3개의 수소 결합 상호작용; 및 푸코잔틴의 공액 이중결합 함유 탄화수소 사슬과 PTP1B의 Ile219, Tyr46, Val49, Ala217 잔기들 사이에 소수성 상호작용을 통한 PTP1B의 구조적 변경으로 인해 PTP1B의 활성화 부위가 불활성화 되는 과정을 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 당뇨병 합병증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 당뇨병 합병증은 당뇨병 망막병증, 당뇨병 녹내장, 당뇨병 백내장, 당뇨병 신증 및 당뇨병 신경병증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 당뇨병 합병증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 8

푸코잔틴(Fucoxanthin)을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 합병증의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 당뇨병 합병증의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 10

푸코잔틴(Fucoxanthin)을 유효성분으로 포함하는 PTP1B 효소 활성 억제제를 통한 인슐린 민감성 증진제.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 푸코잔틴의 당뇨병 합병증 예방 또는 치료의 신규 용도에 관한 것으로, 자세하게는 대황(*Eisenia bicyclis*), 미역(*Undaria pinnatifida*) 또는 톳(*Hijikia fusiformis*)과 같은 해양 갈조류로부터 유래된 푸코잔틴을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 합병증 예방 또는 치료(개선)용 약학조성물, 건강기능식품 및 인슐린 민감성 증진제에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 당뇨병은 대표적인 만성 성인병의 하나로, 우리나라의 당뇨병 환자는 전체 인구의 약 5% 정도로 최소한 250만 명으로 추정되고 있다. 선진국의 경우에 당뇨병 환자 수가 매년 급증하고 있으며, 우리나라도 생활수준의 향상과 더불어 생활양식이 서구화되면서 점차로 환자의 수가 증가되고 있다. 폴리펩티드성 호르몬인 인슐린은 췌장에 있는 랑게르한스섬의 베타세포에서 만들어지며, 체내의 대부분의 세포에서 포도당을 사용하는데 필요로 한다. 당뇨병은 인슐린의 부족으로 인해(인슐린의 절대량이 부족한 것은 아니며, 인슐린 이외의 다른 호르몬이 많이 분비되어 상대적으로 부족한 것을 의미) 체세포들이 포도당을 정상적으로 사용할 수 있는 능력에 장애가 생겨 혈당치가 증가하여, 과량의 당분이 소변으로 배설되는 대사성 질환이다. 췌장 호르몬인 인슐린은 뇌하수체, 부신, 갑상선 등 인슐린에 대항작용을 하는 호르몬으로 체내에서 균형이 이루어졌을 때, 혈당이 정상적으로 유지되도록 한다. 그러나 인슐린의 분비량이 부족하거나 인슐린 분비량은 거의 정상이나 대항 호르몬이 상대적으로 많아 인슐린 부족이 일어날 때 당뇨병이 발병하게 된다.

[0003] 당뇨병은 크게 두 개로 나눌 수 있는데, 인슐린 의존형 당뇨병 (Type I. Insulin dependent diabetes mellitus, IDDM)은 당뇨병환자의 약 10%를 차지하며, 대개 20세 이하의 어린 연령층에 발병하므로 유전성인 것으로 보이며, 일명 소아당뇨병 (juvenile onset diabetes)이라고 한다. 이는 특정한 human lymphocyte antigen (HLA)과 바이러스 감염 등으로 랑겔한스섬의 β -세포가 파괴되어 인슐린의 분비가 되지 않아 발병하는 당뇨병으로, 일반적으로 체중이 감소하고 케톤증 (Ketonacidosis)이 되기 쉽다. 인슐린 투여로 치료가 가능하고 급성 형태가 많으며, 여아에게 발생빈도가 높고 성인보다 어린이에게 주로 나타난다. 인슐린 비의존형 당뇨병 (Type II. Noninsulin dependent diabetes mellitus NIDDM)은 40세 이후에 발병하는 성인형 당뇨병 (adult onset diabetes)이라고도 하며, 운동부족과 비만, 과식, 스트레스 등으로 인하여 근육이나 지방조직 등 말초조직에서 인슐린에 대한 감수성이 둔화되어 당대사의 장애가 4-5년의 이상 오랜 기간 지속되어 발병하게 된다. 제 2형 당뇨병은 식사요법과 운동요법으로 체중을 줄이면 50~80%는 치유가 되며, 인슐린을 투여하지 않아도 생명에는 지장이 없을 정도이므로 인슐린 비의존형 당뇨병이라고 한다. 이 외에 영양실조 관련 당뇨병 (제 3형 당뇨병)이 있으며, 이것은 제 3세계, 특히 열대지방에서 나타나는 젊은이 당뇨병으로 유아기에 영양실조의 병력을 가진 경우에 나타나는 당뇨병으로, 앞서 두 형태의 당뇨병과 약간 다른 모습을 보여, 세계보건기구는 이를 독립된 형으로 분리하였다.

[0004] 당뇨병은 그 자체보다는 합병증이 더 위험하기 때문에, 오늘날 당뇨병 치료에 있어서 가장 큰 목표는 당뇨병 합병증의 유발이나 진행을 억제하는데 있다. 합병증은 당뇨병이 오래 지속되어 나타나는 현상으로 보통 10~15년을 경과한 후에 생기는 만성 합병증이 주이며, 그 대표적인 만성 합병증으로 당뇨병 망막증, 당뇨병 신증, 당뇨병 신경증 등이 있다. 당뇨병 신경증은 당뇨병으로 인해 신경계에 장애가 오는 것으로 말초신경의 장애, 건반사의 소실, 운동신경의 마비, 자율신경 장애 등으로 발바닥이 저릿저릿하고, 화끈거리고, 통증이 심하며, 성기능의 장애가 오고, 소변이나 대변을 가리지 못하는 증상을 가져오기도 한다. 당뇨병 신증은 미세혈관 합병증의 하나로 신 사구체 모세혈관의 경화성 병변에 의해 일어나는 것으로 특별한 증상이 없어도 소변검사를 통해 단백질이 나타나면 신증이 있음을 예측할 수 있다. 혈압의 상승은 당뇨병 신증을 악화시키는 요인으로도 작용하는데 보통 10~15년 이상 당뇨병을 앓은 사람들의 약 5 % 정도가 당뇨병 신증이 온다. 당뇨병 망막증은 미세혈관의 합병증 중의 하나로 당뇨병 환자에게 실명을 가져오는 심각한 합병증이다. 최근에 당뇨병 조절과 합병증과의 관계연구에 의하면 인슐린 치료를 강화시켜 혈당이 정상화되면 당뇨병 합병증 발생을 크게 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다.

[0005] 당뇨병에 있어서 고혈당이 합병증을 유발시키는 기전으로 폴리올 대사계(polyol pathway)의 이상, 체내에서 고

혈당과 단백질의 결합, 산화적 스트레스, myoinositol의 감소와 Na⁺, K⁺-ATPase활성의 감소 등이 발표되었다.

[0006] 그 중 폴리올 대사계(polyol pathway)는 포도당 대사경로의 하나로, 이는 포도당이 솔비톨을 거쳐 과당으로 변환되는 경로로 두 개의 반응계로 구성되며, 2종의 효소가 관여하는 것으로 알려져 있다(Gabbay K. H. and O'Sullivan J. B., Diabetes, 17, pp239, 1968; Dvornik D. et al., Science, 182, pp1146, 1973). 포도당은 에너지원으로 이용되는 중요한 물질로서 정상인의 경우 세포내에 흡수된 후에 대부분은 헥소키나아제에 의하여 글루코오스-6-포스페이트로 되어 해당계에서 대사되고, 불과 몇 % 만이 폴리올 대사계를 거쳐 대사된다. 그러나 당뇨병에 의해 고혈당 상태가 되면 세포내의 포도당 흡수가 인슐린에 의존하지 않는 조직에서 포도당의 세포막 투과는 세포 밖의 포도당 농도에 의존하므로 수정체, 망막, 각막, 말초신경, 혈관, 신사구체, 적혈구 등과 같은 인슐린 비의존성 조직의 세포내 포도당 농도는 상승하게 되고, 이들 세포내에 다량 존재하는 폴리올 대사계의 필수효소인 알도스 환원효소(Aldose reductase)에 의하여 포도당의 대사가 항진되어 솔비톨이 과잉생성 된다. 그 결과 솔비톨이 축적되는 부위에 따라 발병 증상이 나타나는데, 당뇨병 백내장, 당뇨병 망막증, 당뇨병 각막증, 당뇨병 신경증, 당뇨병 신증 등의 당뇨병 합병증을 일으키게 된다. 알도스 환원효소를 촉매하는 포도당이 솔비톨로 되는 환원반응은 그 평형에서 역반응이 일어나지 않으며, 솔비톨 탈수소효소(sorbitol dehydrogenase)의 활성이 알도스 환원효소의 활성보다 낮기 때문에 솔비톨에서 과당으로의 변환량이 아주 적으므로 결과적으로 폴리올 대사계의 항진은 솔비톨을 축적시키게 된다. 당알콜인 솔비톨은 극성이 높아 세포막 외로 확산이 어렵기 때문에 솔비톨이 세포내에 축적되며, 이로 인해 세포내 삼투압을 상승시켜, 수정체내로 수분유입을 촉진하여 세포의 팽화를 일으킨다. 이 팽화는 수정체 섬유세포의 투과성을 항진하고, Na⁺, Cl⁻의 유입과 K⁺, 아미노산, 펩티드, ATP, myo-inositol 등의 유출을 일으킨다. Na⁺이나 K⁺ 등의 전해질의 평형과외에 의해 삼투압이 더 증가하게 되고, 세포의 팽화를 촉진하여 세포막은 정상을 유지할 수 없게 된다. 그와 동시에 세포내 단백질변성이 증가되어 수정체가 혼탁하게 되는데, 이와 같이 수정체가 혼탁해져 나타나는 백내장 증상을 당뇨병 합병증 진행 과정의 한 지표로 사용한다.

[0007] 따라서 솔비톨을 생성하는 효소인 알도스 환원효소를 억제하게 되면, 솔비톨의 생성을 억제하는 물질이 당뇨병 백내장의 발병을 억제하는 것이 가능하다고 알려져 있다. 실제로, 많은 보고에 의하면, 인 비트로(in vitro) 실험에서 알도스 환원효소를 억제하는 성분이 당뇨병 백내장의 실험모델인 galactosemic rats에서 백내장의 형성을 억제하는 것으로 밝혀졌다. Okuda 등 (Okuda J. et al., Chem. Pharm. Bull., 33, pp2990, 1985)은 알도스 환원효소에 대한 억제 활성을 가지는 1-[(p-bromo-phenyl)-sulfonyl]hydantoin이 galactosemic rats에서의 백내장 형성을 억제하는 것을 보고하였고, 알도스 환원효소 억제활성을 가지는 플라보노이드 성분이 당뇨병 백내장 생성억제와 관련성이 있다는 보고도 있다 (Varma S. D. and Kinoshit J. H., Biochem. Pharmacol., 25, pp2505, 1976; Parmar N. S. and Ghosh M. N., Exp. Eye Res., 29, pp229, 1979). 또한, Shin 등 (Shin K. H. et al., Kor. J. Pharmacogn., 25, pp41, 1994)은 흰쥐 수정체로부터 제조한 알도스 환원효소를 이용한 실험에서 황금에 함유된 플라보노이드 성분이 이 효소활성을 억제하며 동시에 galactosemic rats의 백내장 형성을 억제하는 것으로 보고하였으며, Aida 등 (Aida K. et al., Planta Med., 53, pp121, 1987)은 오랫동안 일본에서 당뇨병 신경증 치료에 사용되었던 한방약에 대하여 이들 추출물이 인 비트로 실험에서 알도스 환원효소의 활성을 억제함을 보고하였고, 그 성분인 이소리퀴리티제닌(Iso-liquiritigenin)이 알도스 환원효소에 대한 강력한 억제활성을 가짐을 보고하였다 (Aida K. et al., Planta Med., 56, pp254, 1989).

[0008] 또한, 당뇨병에서 합병증을 유발시키는 기전으로 폴리올 대사계(polyol pathway)의 이상 이외에 혈중의 과량의 당과 단백질과의 결합에 의한 단백질 당화반응(glycation)이 있다. 단백질 당화는 단백질의 아미노기와 당의 카르보닐기 사이의 반응에 의해 초기화되고, 가역적인 쉬프 염기(Schiff base)를 생성한다. 이 반응은 수 시간에 걸쳐서 이루어지며, 불안정한 구조로 형성된 쉬프 염기(Schiff base)는 더 안정한 구조인 케토아민(ketoamine) 혹은 아마도리 생성물(Amadori product)로 재배열하게 된다. 아마도리 생성물(Amadori product)의 형성은 수일 간에 걸쳐서 생성되며, 생성물은 비가역적이다. 당이 결합된 단백질은 더 많은 결합을 하여 3-deoxyglucosones (3-DG)와 같은 디카보닐(dicarbonyl) 중간 생성물을 형성하고, 이를 최종당화산물 (Advanced Glycation Endproducts: 이하 간단하게 'AGEs' 라 함)라 부른다. 생성된 AGEs는 복합체로서 단백질과 교차결합을 하고, 갈변화와 형광을 생성한다. 수많은 AGEs는 조직에서 검출되는데 크게 세 가지로 분류될 수 있다.

[0009] 첫째, 형광성을 띠며, 교차 결합된 AGEs로 펜트시다인(Pentosidine)과 crossline이 있다. 펜트시다인(Pentosidine)은 라이신과 아르기닌 잔기 사이에 교차결합을 형성하고, 당노가 유발되면 그 농도는 증가한다 (McCance D. R. et al., J. Clin. Invest., 91, pp2470-2478, 1993). Crossline은 당뇨 쥐의 신장에서 처음으로 발견되었으며, 인 비트로(in vitro)와 인 비보(in vivo)에서 형성될 수 있다.

[0010] 둘째, 비형광성이며, 교차 결합된 AGEs로 imidazolium dilysine과 교차결합된 것과 alkyl formyl glycosyl

pyrrole (AFGP) 교차결합된 것, 그리고 arginine-lysine imidazole (ALI)이 교차결합된 것이 있다. Imidazolium dilysine이 교차결합된 것은 glyoxal lysine dimer (GOLD) 혹은 methylglyoxal lysine dimer (MOLD)로 알려져 있으며, glyoxal 유도체와 lysine 잔기 사이의 반응에 의해 형성된다 (Frye E. B. et al., J. Biol. Chem., 273, pp18714-18716, 1998). Arginine-lysine imidazole (ALI)는 내부세포와 교차 결합한다(AI-Abed Y. and Bucala R., Bioconjugate Chem., 11, pp39-45, 2000).

[0011] 세 번째, 교차결합이 없는 AGEs로 pyrraline과 N-carboxy methyllysine (CML)이 있다. Pyrraline은 교차결합이 없는 AGEs이며, 인간의 피부, 혈장, 뇌의 plaque에서 발견되며, CML은 단백질 존재 하에 다중불포화 지방산의 금속촉매에 의한 산화과정에서 아마도리 생성물(Amadori product)의 산화적 분해에 의해 형성된다. 그것은 AGEs의 주요 성분 중 하나이며, 그것의 농도는 당뇨병 환자 피부의 콜라겐에서 정상인 경우보다 두 배 증가하였다 (Dyer D. G. et al., J. Clin. Invest., 91, pp2463-2469, 1993). 당뇨 합병증 발병에서 AGEs의 다른 작용은 아직 완전히 명확하게는 밝혀지지 않았다. 예를 들어 혈청에서 CML의 농도는 망막증이 있는 당뇨병 환자의 경우 증가하나 신증을 가진 환자에서는 증가하지 않았다. Pentosidine의 농도는 두 개의 군에서 모두 증가하는 것으로 나타났다.

[0012] 다만, 증가된 당화 반응과 축적된 조직 AGEs는 효소의 활성을 변화시키고, 리간드 결합을 감소시키며, 면역성을 변화시킬 수 있기 때문에 당뇨 합병증과 관련이 있다고 보고되었다(Vlassara H. and Dalace M. R., J. Intern. Med., 251, pp87-101, 2002). 이와 관련하여 최근 연구에서 당뇨병 환자에서 ACE-면역 복합체를 형성하는 혈청 AGEs의 작용에 대한 자동 항체가 존재함을 보고하였고, 그것은 아테롬성동맥경화증에 중요한 역할을 한다. 당화 반응(Glycation)으로 유도된 유리 라디칼은 단백질 분해와 핵산과 지질에 산화를 야기시킬 수 있다. 또한 AGEs는 인지질에서도 형성될 수 있는데, 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine)과 포스파티딜세린(phosphatidylserine) 잔기와 같은 인지질에서 포도당과 아미노산 사이에 직접적인 반응에 의해서 지질 과산화를 유도할 수 있다고 알려져 있다(Vlassara H., Annal. Med., 28, pp419-426, 1996).

[0013] 당뇨병 환자에서 치료의 목적은 식이 조절에 의해 고혈당증을 감소시키는 것이다. 그러나 식이 조절은 어렵기 때문에 약리학적 효과를 가진 화합물을 사용하여 고혈당을 저하시키고, 고혈당으로 인한 AGEs 생성을 감소시킬 수 있다. 많은 화합물들이 항 당화(glycation) 활성에 대해 연구되고 있으며, 알려진 당화 생성 억제제로는 아스피린, 아미노구아니딘, 펜아실티아졸리움 브로마이드(phenacylthiazolium bromide)와 항산화제 등이 있다. 당뇨병 환자의 경우 당화 반응과 AGEs의 생성은 자연적으로 발생하기 때문에 이것을 억제하는 억제제는 긴 반감기를 가져야 하고, 장기간 투여 했을 때 독성을 나타내지 않아야 한다.

[0014] 따라서 당뇨병 합병증 예방 및 치료제로서 알도즈 환원효소 및 최종당화산물 생성 억제제가 주목을 받고 있으며, 이들 몇몇 억제제가 동물실험 및 임상시험에서 당뇨병 합병증을 개선함이 보고되는 등 합성물질 뿐만 아니라 천연물질로부터 알도즈 환원효소 및 최종당화산물 생성 억제성분을 규명하려는 활발한 연구가 이루어지고 있다.

[0015] 한편, 푸코잔틴(Fucoanthin)은 주로 미역, 모자반, 다시마, 톳 등의 식용 가능한 해조류에 존재하는 물질로서 이들 해조류에 갈색을 띄게 하는 주요 카로테노이드(carotenoid)이며, 이의 생리활성에 대해서는 이의 생리활성에 대해서는 항암 효과(문헌[Das, S. K. et al., Biochim. Biophys. Acta., 2005, 1726(3):328-335]; [Kotake-Nara, E. et al., Cancer Lett. 2005, 220(1):75-84]; [Kotake-Nara, E. et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 2005, 69(1):224-227]; [Hosokawa M. et al., Biochim. Biophys. Acta, 2004, 1675(1-3):113-119]; [Kotake-Nara, E. et al., J. Nutr., 2001, 131(12):2921-2927]; [Okuzumi, J. et al., Cancer Lett., 1993, 68(2-3):159-168]; 및 [Okuzumi, J. et al., Cancer Lett., 1990, 55(1):75-78]), 항염증 효과 (문헌 [Shiratori, K. et al., Exp Eye Res. 2005, 81(4):422-428]), 혈관신생 억제 효과 (문헌[Sugawara, T. et al., J. Agric. Food Chem. 2006, 54(26):9805-9810]), 항비만 효과 (문헌[Naeda, H. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005, 332(2):392-397]) 등의 연구가 진행되어, 그 효과를 입증받은 바 있다.

[0016] 그러나 이러한 푸코잔틴의 알도즈 환원효소 억제 활성, 탁월한 최종당화생성물(AGEs) 억제 활성 및 PTP1B 효소(인슐린 신호 음성 조절자) 억제를 통한 인슐린 저항성 개선을 통한 당뇨병성 합병증 예방 또는 치료 효과에 관한 연구된 바 없다.

[0017] 이에 본 발명자들은 해양 갈조류를 이용한 기능성 약제학적 또는 식품학적 소재를 연구하던 중, 이들로부터 분리된 푸코잔틴이 알도즈 환원효소 억제 활성, 최종당화생성물(AGEs) 억제 활성 및 PTP1B 효소(인슐린 신호 음성 조절자) 활성 억제 효과를 가짐에 따라 당뇨병 합병증의 예방, 개선 또는 치료에 유용함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0018] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2012-0036025호
(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-0726281호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0019] 따라서 본 발명의 목적은 장기간 사용에도 인체에 안정하면서 최종당화생성물(AGEs) 억제 활성 및 인슐린 민감성 증진 기능이 우수하여 당뇨병 합병증 예방 또는 치료에 효과적인 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 목적은 장기간 사용에도 인체에 안정하면서 최종당화생성물(AGEs) 억제 활성 및 인슐린 민감성 증진 기능이 우수하여 당뇨병 합병증 예방 또는 개선에 효과적인 건강기능식품을 제공하는 것이다.
- [0021] 본 발명은 또 다른 목적은 장기간 사용에도 인체에 안정하면서 PTP1B 효소 활성 억제 효과가 우수한 인슐린 민감성 증진제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0022] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 푸코잔틴(Fucoxanthin)을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 합병증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 푸코잔틴은 해양 갈조류로부터 유래될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 갈조류는 대황(*Eisenia bicyclis*), 미역(*Undaria pinnatifida*) 또는 톳(*Hijikia fusiformis*)일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 알도즈 환원효소 억제 활성 및 최종당화생성물 억제 활성을 통해 당뇨병 합병증 치료 효과를 가질 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 PTP1B 억제 활성을 통해 인슐린 신호전달을 증가시킴으로써 인슐린 저항성을 개선할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 PTP1B 억제는 PTP1B의 Phe30, Phe52 및 Gly183 잔기들과 푸코잔틴의 2개의 히드록실 그룹 사이에 형성되는 3개의 수소 결합 상호작용; 및 푸코잔틴의 공액 이중결합 함유 탄화수소 사슬과 PTP1B의 Ile219, Tyr46, Val49, Ala217 잔기들 사이에 소수성 상호작용을 통한 PTP1B의 구조적 변경으로 인해 PTP1B의 활성화 부위가 불활성화 되는 과정을 통해 이루어질 수 있다.
- [0028] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 당뇨병 합병증은 당뇨병 망막병증, 당뇨병 녹내장, 당뇨병 백내장, 당뇨병 신증 및 당뇨병 신경병증으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명은 푸코잔틴(Fucoxanthin)을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 합병증의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0030] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 견류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명은 푸코잔틴(Fucoxanthin)을 유효성분으로 포함하는 PTP1B 효소 활성 억제를 통한 인슐린 민감성 증진제를 제공한다.

발명의 효과

- [0032] 본 발명의 푸코잔틴(Fucoxanthin)은 알도즈 환원효소 억제 활성과 최종당화생성물 억제 활성이 우수할 뿐만 아니라, PTP1B 억제 활성을 통해 인슐린 신호전달을 증가시킴으로써 인슐린 저항성을 개선할 수 있다. 따라서 본

발명의 푸코잔틴은 인슐린 저항성을 특징으로 하는 제2형 당뇨병 치료와 더불어, 당뇨병 합병증을 예방 또는 치료할 수 있는 물질로서 약리학적 조성물과 같은 의약품은 물론이고, 건강기능식품 등으로 활용할 수 있어 식품 산업 및 의약산업에 응용될 경우 그 가치가 매우 높을 것으로 기대된다. 특히 본 발명의 푸코잔틴(Fucoxanthin)은 천연물로부터 유래된 물질로서, 세포독성 없이 안정성을 가지므로, 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 장기적 사용에도 안전한 이점을 가진다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 Lineweaver-Burk plot을 이용한 푸코잔틴의 RLAR 및 PTP1B의 억제(저해) 패턴을 그래프로 나타낸 것이다.

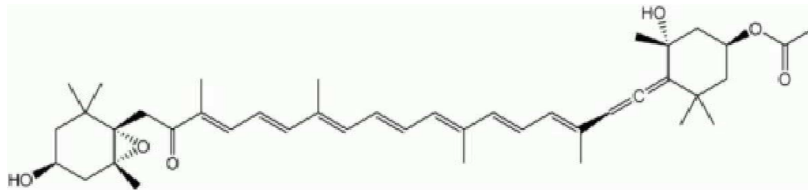
도 2는 푸코잔틴의 PTP1B 억제를 위한 분자 도킹 모델을 나타낸 것이다(푸코잔틴: 청록색[cyan color], compound 23: 자홍색[magenta color]).

도 3은 PTP1B 효소의 활성화 부위에서 푸코잔틴의 리간드-상호작용을 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 본 발명은 하기 화학식 1의 푸코잔틴(Fucoxanthin) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 합병증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.

[0035] <화학식 1>



[0036]

[0037] 본 발명의 ‘푸코잔틴(Fucoxanthin)’은 주로 미역, 모자반, 다시마, 톳 등의 식용 가능한 해조류에 존재하는 물질로서 이들 해조류에 갈색을 띄게 하는 주요 카로테노이드(carotenoid)로서 푸코크산틴으로도 불린다. 이러한 푸코잔틴은 지용성이며 공액 이중 결합수가 많을수록 황색에서 적색으로 이행하는 것으로 알려져 있으며 불포화도가 매우 높기 때문에 열, 광조사, 산소, 금속이온, 과산화물, 페록시다아제(oxidase) 및 화학약품 등에 의해서 쉽게 산화되어 파괴되며, 300~500nm의 파장에서 특징의 흡수대를 가지는 특성이 있다.

[0038] 상기와 같은 특징을 갖는 푸코잔틴은 항암 효과, 항염증 효과, 혈관신생 억제 효과, 항비만 효과, 고지혈증 예방 효과(한국 특허 등록번호 제 10-0828068호), 지방간 예방 효과(한국 특허 등록번호 제10-0828069호) 등의 생리활성이 있는 것으로 알려져 있다.

[0039] 그러나 현재까지 푸코잔틴의 PTP1B 효소(인슐린 신호 음성 조절자) 활성 억제를 통한 인슐린 저항성 개선 및 탁월한 최종당화생성물(AGEs) 억제 기작을 통한 당뇨병성 합병증 예방 또는 치료 효과에 관한 연구된 바 없다.

[0040] 본 발명자들은 해양 갈조류 유래의 푸코잔틴이 알도즈 환원효소 억제 활성, 최종당화생성물(AGEs) 억제 활성 및 PTP1B 효소(인슐린 신호 음성 조절자) 활성 억제 효과를 가짐에 따라 당뇨병 합병증의 예방, 개선 또는 치료에 유용한 물질로서 약리학적 조성물과 같은 의약품은 물론이고, 건강기능식품 등으로 활용할 수 있다는 사실을 최초로 규명하였다.

[0041] 본 발명의 하기 실험에 1 및 2에서는, 푸코잔틴의 알도즈 환원효소(Aldose reductase) 억제활성을 살펴본 결과, 푸코잔틴이 약한 알도즈 환원효소(Aldose reductase) 억제 효과가 있는 것으로 나타났으나, 양성대조군인 퀘르세틴과 비교하여 효과는 그리 크지 않은 것으로 나타났다. 다만, RLAR 보다 HRAR에 대한 억제 활성이 더욱 높은 것으로 나타났다.

[0042] 또한 본 발명의 하기 실험에 3에서는, 푸코잔틴의 최종당화산물 생성 억제 활성을 살펴본 결과, IC₅₀ 값이 86.48 ± 2.16 μM로 나타나 강력한 최종당화산물 억제 활성을 보여주었다. 특히 푸코잔틴은 최종당화산물 형성을 억제하는 것으로 잘 알려진 아미노구아니딘(양성대조군)보다 억제 활성이 6배 이상 높은 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해, 푸코잔틴은 당뇨병 합병증을 유발시키는 기전으로 폴리올 경로보다는 최종당화산물 억제로서 당뇨병 합병증 치료 효과를 가짐을 알 수 있었다.

- [0043] 또한 본 발명의 하기 실험에 4에서는, 푸코잔틴의 PTP1B 억제 활성을 살펴본 결과, IC_{50} 값이 $4.80 \pm 0.49 \mu M$ 을 가지는 것으로 나타나 PTP1B 억제 활성이 매우 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해 푸코잔틴은 PTP1B 효소(인슐린 신호 음성 조절자) 활성 억제를 통해 인슐린 신호전달을 증가시킴으로써 인슐린 저항성을 개선할 수 있으리라 판단되었다.
- [0044] 단백질 티로신 포스파타제(Protein Tyrosine Phosphatase)는 세포 성장 및 분화를 조절하는 과정에서 주요한 효소로서 다중 신호전달 경로(multiple signaling pathway)를 조절할 수 있다. PTP1B는 전술한 효소 부류의 원형적인 구성원으로서 인슐린 신호전달 경로의 음성(negative) 조절제로 알려져 있으며(Kennedy 등의 문헌 [Science, 1999, 283:1544-1548]), 현재 개발된 PTP1B 억제제들은 당뇨 및 당뇨-관련 질환 치료제로서 사용되고 있다.
- [0045] 또한 본 발명의 하기 실시예 3에서는, PTP1B 억제를 분자 구조적인 측면에서 분석하고자 푸코잔틴과 PTP1B 사이의 구체적인 상호결합을 Autodock 4.0 프로그램을 이용 분자 도킹 시뮬레이션을 통해 확인한 결과, PTP1B의 활성 부위에서 Phe30, Phe52 및 Gly183 잔기들과 푸코잔틴의 2개의 히드록실 그룹 사이에 형성되는 3개의 수소 결합 상호작용; 및 푸코잔틴의 공액 이중결합 함유 탄화수소 사슬과 PTP1B의 Ile219, Tyr46, Val49, Ala217 잔기들 사이에 소수성 상호작용을 통한 PTP1B의 구조적 변경으로 인해 PTP1B의 활성화 부위가 불활성화 되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0046] 이와 같은 결과를 통해, 본 발명자들은 푸코잔틴이 알도즈 환원효소 억제 활성을 가질 뿐만 아니라 최종당화생성물 억제 활성이 우수하다는 사실을 실험적으로 입증하였으며, 또한 푸코잔틴은 PTP1B 억제 활성을 통해 인슐린 신호전달을 증가시킴으로써 인슐린 저항성을 개선에 효과적임을 실험적으로 입증하였다.
- [0047] 그러므로 푸코잔틴을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 당뇨병 합병증을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0048] 본 발명에 따른 상기 푸코잔틴은 염, 바람직하게는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하며, 상기 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 프마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산을 포함한다. 또한 상기 무기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 염산, 브롬산, 황산 및 인산을 포함한다.
- [0049] 본 발명에 따른 푸코잔틴은 시중에서 판매되는 것을 사용할 수도 있으며, 또는 천연으로부터 분리되거나 당업계에서 공지된 화학적 합성법으로 제조된 것을 사용할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 푸코잔틴을 천연물로부터 분리하고 하는 경우, 분리방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다. 예를 들어, 건미역 분말에 유기용매(아세톤:메탄올=7:3)로 추출한 후 암소에서 2일간 방치 후 호모게나이저로 균질화시킨 다음, 감압 여과하고 얻어진 여과액을 농축하고, 농축액은 헥산 및 메탄올을 용매계로 하여 분획한 후 메탄올 층에 대해서는 동량의 헥산으로 3반복 용매분획하여 얻어진 메탄올층에 다시 증류수를 가하여 70% 메탄올로 제조하여 헥산으로 3반복 용매분획한 후 얻어진 70% 메탄올 분획을 감압 농축하는 과정을 통해 분리될 수 있다. 또한 본 발명의 하기 실시예에서는 수세한 생미역을 에탄올 또는 메탄올로 1-2일간 냉침하고 감압하에서 진공 농축한 후 적당량의 증류수에 현탁하고 동량의 헥산을 가하여 분획하면 중간층에 침전물이 형성되는데, 이 침전물을 여과하여 세척하면 순수하게 분리 될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 조성물은 상기 푸코잔틴을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물로서 이러한 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 율활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0052] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0053] 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 율활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당,

옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 봉해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 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. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

- [0054] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 푸코잔틴은 조성물에 1 내지 300 μ M의 농도로 포함될 수 있으며, 또한 본 발명의 푸코잔틴 화합물은 조성물 총 중량에 대하여 0.1 ~ 95중량%로 포함될 수 있다.
- [0055] 본 발명의 약제학적 조성물이 치료효과를 나타낼 수 있는 당뇨병 합병증으로는, 당뇨병 망막병증, 당뇨병 녹내장, 당뇨병 백내장, 당뇨병 신증 및 당뇨병 신경병증 등을 들 수 있되, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0056] 본 발명의 약제학적 조성물은 유효성분으로서 푸코잔틴 이외에 추가로 인슐린을 더 포함할 수 있다. 본 발명의 푸코잔틴은 인슐린 신호 음성 조절자인 PTP1B와 분자 상호작용으로 인해 PTP1B의 구조를 변경하여 불활성화시킴으로써 인슐린의 신호전달을 증가시킬 수 있기 때문에(PTP1B의 구조적 변경으로 인한 PTP1B 억제 기작), 푸코잔틴과 더불어 인슐린을 포함하는 본 발명의 약제학적 조성물은 당뇨병 합병증 예방 또는 치료에 더욱 효과적일 수 있다.
- [0057] 또한, 본 발명은 당뇨병 합병증 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 푸코잔틴(Fucoxanthin)을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다. 상기한 푸코잔틴(Fucoxanthin)을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 용도로 이용될 수 있다.
- [0058] 또한, 본 발명은 포유동물에게 푸코잔틴(Fucoxanthin)을 투여하는 것을 포함하는 당뇨병 합병증의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0059] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.
- [0060] 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약제학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 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. 본 발명의 치료방법에 있어서, 성인의 경우, 본 발명의 푸코잔틴(Fucoxanthin)을 1일 1회 내지 수회 투여시, 0.01mg/kg~250mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.
- [0061] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 푸코잔틴(Fucoxanthin)을 유효성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0062] 또한, 본 발명은 푸코잔틴(Fucoxanthin)을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 합병증의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0063] 본 발명의 건강기능식품은 당뇨병 합병증의 예방 및 개선을 목적으로, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0064] 본 발명에서 "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제672호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0065] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정

이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0066] 상기 “식품 첨가물 공전”에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.

[0067] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 푸코잔틴(Fucoxanthin)을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.

[0068] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분인 푸코잔틴(Fucoxanthin)을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 푸코잔틴(Fucoxanthin)을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0069] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 푸코잔틴(Fucoxanthin)과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.

[0070] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 푸코잔틴(Fucoxanthin)과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0071] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.

[0072] 또한, 본 발명은 푸코잔틴(Fucoxanthin)을 유효성분으로 포함하는 PTP1B 효소 활성 억제제를 통한 인슐린 민감성 증진제를 제공한다.

[0073] 본 발명의 하기 실시예에서도 살펴본 바와 같이, 푸코잔틴이 PTP1B 효소 활성부위를 불활성화시킴으로서 PTP1B 억제제로서 기능할 수 있으므로, 이러한 푸코잔틴을 포함하는 조성물은 인슐린 민감성 증진제로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0074] 즉, 푸코잔틴을 포함하는 조성물이 PTP1B 활성을 억제하는 경우, 세포 내 인슐린 신호가 증가되게 되므로, 인슐린 저항성을 개선하여 인슐린 민감성을 증진시킬 수 있다. 따라서 상기 조성물은 높은 혈중 글루코오스 농도와 관련된 질환, 인슐린 저항성을 보이는 제2형 당뇨병 및 당뇨-관련 질환 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0075] 특히 본 발명의 인슐린 민감성 증진제를 인슐린과 함께 병행 사용하는 경우, 더욱 높은 효과를 기대할 수 있다.

[0076] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0077] <실시예>

[0078] 시약

[0079] 알파-글루코시다아제(Yeast α -glucosidase), 아카보스(acarbose), p-니트로페닐포스페이트(p-nitrophenylphosphate: 이하 간략하게 ‘pNPP’로 표기함), p-니트로페닐 알파-D-글루코피라노사이드(p-nitrophenyl α -D-glucopyranoside: 이하 간략하게 ‘pNPG’로 표기함), EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), NADPH(β -nicotinamideadeninedinucleotidephosphate), 소혈청알부민(bovineserumalbumin: BSA), DL-glyceraldehydimer, D(-)-fructose, D(+)-glucose, 아미노구아니딘 하이드로클로라이드(aminoguanidine hydrochloride), 및 퀘르세틴은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. PTP1B (human recombinant)는 Biomol International LP(Plymouth Meeting, PA, USA)에서 구입하였으며,

디티오프레이톨(dithiothreitol: DTT)는 Bio-Rad Laboratories(Hercules, CA, USA)에서 구입하였고, HRAR (0.4 unit)는 Wako Chemicals (Osaka, Japan)에서 구입하였다. Sodium azide는 Junsei Chemical Co.(Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 모든 다른 화합물 및 용매는 commercial sources로부터 구입하였으며 시약 등급에 따라 사용하였다.

[0080] **통계**

[0081] 모든 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였고, 그 결과들의 통계 분석하기 위하여 one-way ANOVA and Student's t-test(Systat Inc.,Evaston,IL,USA)를 수행하였다. p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

[0082] **<실시예 1>**

[0083] **푸코잔틴의 분리**

[0084] 푸코잔틴(3'-acetoxy-5,6-epoxy-3,5'-dihydroxy-6',7'-didehydro-5,6,7,8,5',6'-hexahydro-β,β-carotene-8-one)은 Hosokawa et al.(1999)에서 설명한 과정에 따라 대황 및 미역인 갈조류로부터 분리되었다. 간략하게, 수세한 생미역을 에탄올 또는 메탄올로 1-2일간 냉침하고 감압하에서 진공 농축한 후 적당량의 증류수에 현탁하고 동량의 hexan을 가하여 분획하면 중간층에 침전물이 형성되는데, 이 침전물을 여과하여 세척함으로써 순수하게 분리하였다. 분리된 푸코잔틴은 기존 공개된 스펙트랄 데이터 및 TLC 분석과 더불어 ¹H- 및 ¹³C-NMR 포함하는 분광분석 방법을 통해 동정되었다. 이렇게 분리된 푸코잔틴은 하기 실험에서 시료로 사용하였다.

[0085] **<실험예 1>**

[0086] **푸코잔틴의 랫드 렌즈 알도즈 환원효소 (RLAR) 억제활성**

[0087] 푸코잔틴의 랫드 렌즈 알도즈 환원효소 억제활성을 측정하기 위한 효소원의 조제는 Hayman and Kinoshite (Hayman S. and Kinoshite I. H., J. Biol. Chem., 240, pp877-882, 1965)가 사용한 방법을 수정하여 실시하였다.

[0088] 먼저, 흰쥐의 안구에서 수정체를 적출하고, 그 습중량에 따라 일정량 (수정체 1개당 sodium phosphate buffer (pH 6.2) 0.5 ml 첨가)의 인산나트륨 버퍼(pH 6.2; [sodium phosphate dibasic (Na₂HPO₄×H₂O, 0.66g)])를 가하여 homogenization하였다. 이를 4℃에서 10,000 g로 20분간 원심 분리한 후, 그 상등액을 취하여 효소원으로 사용하였다. 1.0 ml 석영 큐벳에 인산나트륨 버퍼(pH 6.2) 621 μl, 효소 90 μl, 조효소인 NADPH (1.6 mM) 90 μl, DMSO에 녹인 측정시료 9 μl를 넣고, 마지막으로 기질인 DL-glyceraldehyde (50 mM)을 90 μl를 넣어 총 반응액이 900 μl가 되도록 하여 340 nm에서 4분간 spectrophotometer를 측정하여 NADPH의 흡광도 감소율을 측정하였다. 대조군은 시료 대신에 DMSO를 첨가하여 측정하고, 양성 대조군은 퀘르세틴을 사용하였다. 랫드 렌즈 알도즈 환원효소 억제활성 % 는 하기의 수학적 식 1로 구하였고, 각각의 RLAR 억제 활성은 IC₅₀(μM) 값으로 나타내었다.

[0089] **<수학적식1>**

[0090] % 억제율 = [1-(ΔA sample/min-ΔA blank/min)/(ΔA control/min-ΔA blank/min)]×100

표 1

[0091] 푸코잔틴의 RLAR 억제 활성

테스트 샘플	IC ₅₀ (μ M)
푸코잔틴	264.67±13.76
퀘르세틴(양성대조군)	1.26±0.02

[0092] 그 결과, 상기 표 1에서 나타낸 바와 같이, 푸코잔틴이 알도즈 환원효소 억제활성을 가지는 것을 확인할 수 있었으나, 양성대조군과 비교하여 효과가 크지 않은 것으로 나타났다.

[0093] <실험예 2>

[0094] 푸코잔틴의 인간 재조합 알도즈 환원효소 (HRAR) 억제활성

[0095] 푸코잔틴의 HRAR 억제 활성은 Nishimura(Nishimura C. et al., Biochim. Biophys. Acta., 1078, pp171-178, 1991)가 사용한 방법을 수정하여 실시하였다. 즉, 1.5 ml 석영 큐벳에 인산나트륨 용액(pH 6.2) 790 μ l, 조효소인 NADPH(0.15 mM) 100 μ l, 기질인 DL-글리세르알데히드(glyceraldehyde)(100 mM) 100 μ l와 재조합 인간 알도즈 환원효소(Wako Chemicals USA, Inc.) 5 μ l를 섞은 후, 100% DMSO에 녹인 측정시료 5 μ l를 각각 넣어 반응액이 1 ml가 되도록 한 다음, SWIFT II Applications software (Amersham Biosciences, New Jersey, USA)가 장착된 Ultrospec2100pro UV/Visible spectrophotometer를 이용 340 nm에서 1분간 흡광도를 측정하여 NADPH의 흡광도 감소율을 측정하였다. 이때 대조군으로는 상기 시료 대신에 DMSO를 첨가하여 측정하고, 양성대조군으로는 퀘르세틴을 사용하였다. 알도즈 환원효소 억제활성 실험은 상기 실험예 1에 기재된 수학적 1을 이용하여 계산하였고, 각각의 HRAR 억제 활성은 IC_{50} (μ M) 값으로 나타내었다.

표 2

[0096] 푸코잔틴의 HRAR 억제 활성

테스트 샘플	IC_{50} (μ M)
푸코잔틴	108.31 $\pm$ 3.99
퀘르세틴(양성대조군)	2.28 $\pm$ 0.30

[0097] 그 결과 상기 표 2에 나타낸 바와 같이, 푸코잔틴이 인간 재조합 알도즈 환원효소 억제활성을 가지는 것을 확인할 수 있었으나, 양성대조군과 비교하여 효과가 크지 않은 것으로 나타났다. 다만, 약한 알도즈 환원효소 억제 활성에도 불구하고 RLAR 보다 HRAR에 대한 억제 활성이 더욱 높은 것으로 나타났다.

[0098] <실험예 3>

[0099] 푸코잔틴의 최종당화산물 생성 억제 활성 측정

[0100] 푸코잔틴의 최종당화산물 생성 억제 활성의 측정은 Vinson (Vinson J. A., J. Nutr. Biochem., 7, pp659-663, 1996)이 사용한 방법을 수정하여 실시하였다.

[0101] AGE 반응 시약은 세균 증식을 막기 위해서 0.02% sodiumazide가 첨가된 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)에 10 mg/ml의 bovine serum albumin (Sigma, St. Louis, MO, USA)과 0.2 M fructose와 0.2 M glucose를 넣어 제조하였다. 이렇게 제조된 AGE 반응 시약 950 μ l에 10% DMSO로 녹인 시료 50 μ l를 넣은 후, 37 $^{\circ}$ C에서 7 일간 배양하였다. 반응생성물의 형광 강도는 spectrofluorometric detector (FLx800 microplate fluorescence reader, Bio-Tek Instrument, Inc., Winooski, USA)를 이용하여 측정하였다(여기 파장: 350nm, 방출 파장: 450nm). 최종당화산물 생성 억제활성 %는 하기의 수학적 2로 구하였고, 이때 대조군으로는 상기 시료 대신에 DMSO를 첨가하여 측정하였으며, 양성대조군으로는 아미노구아니딘 하이드로클로라이드(aminoguanidine hydrochloride)를 사용하였다. 최종당화산물 생성 억제 활성은 IC_{50} (μ M) 값으로 나타내었다.

[0102] <수학적2>

[0103] % 억제율 = 1-(시료의 흡광도-대조군의 흡광도)/표준흡광도×100

표 3

[0104] 푸코잔틴의 최종당화산물 억제 활성

테스트 샘플	IC ₅₀ (μM)
푸코잔틴	86.48±2.16
아미노구아니딘(양성대조군)	530.37±6.52

[0105] 그 결과 상기 표 3에서 나타낸 바와 같이, 양성대조군인 아미노구아니딘(IC₅₀: 530.37±6.52 μM)과 비교하여 본 발명의 푸코잔틴은 IC₅₀ 값이 86.48±2.16 μM로 나타나 강력한 최종당화산물 억제 활성을 보여주었다. 특히 푸코잔틴은 최종당화산물 형성을 억제하는 것으로 잘 알려진 양성대조군인 아미노구아니딘보다 억제 활성이 6배 이상 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0106] <실험예 4>

[0107] 푸코잔틴의 PTP1B 억제 활성 측정

[0108] 푸코잔틴의 PTP1B 억제 활성은 pNPP(Cui et al., 2006)를 이용하여 측정하였다. 96 wells(최종 부피 100 μl) 각각에 PTP1B 효소[0.5 unit diluted with a PTP1B reaction buffer containing 50 mM citrate (pH 6.0), 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, and 1 mM DTT] 40 μl와 DMSO에 녹인 시료를 첨가하였다. 37℃에서 10분간 상기 플레이트를 전배양한 다음, 2mM 농도의 pNPP 50 μL를 PTP1B 반응 버퍼에 첨가하여 37℃에서 20분 동안 배양하였으며, 10M NaOH를 첨가하여 반응을 종결하였다. pNPP로부터 효소적 탈인산화된 후 생산된 p-nitrophenyl 양을 분석하기 위해 microplate spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용 405nm에서 흡광도를 측정하였다. PTP1B 억제활성 %는 하기의 수학적 식 3으로 구하였고, 양성대조군으로 우르솔산을 사용하였다.

[0109] <수학적식3>

[0110] % 억제율 = (Ac-As)/Ac×100

[0111] Ac: 대조군의 흡광도

[0112] As: 시료의 흡광도

표 4

[0113] 푸코잔틴의 PTP1B 억제 활성

테스트 샘플	IC ₅₀ (μM)
푸코잔틴	4.80±0.49
우르솔산(양성대조군)	2.53±0.07

[0114] 그 결과 상기 표 4에서 나타낸 바와 같이, 푸코잔틴은 IC₅₀ 값이 4.80±0.49 μM를 가지는 것으로 나타나 PTP1B 억제 활성이 매우 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해 푸코잔틴은 PTP1B 효소(인슐린 신호 음성 조절자) 활성 억제를 통해 인슐린 신호전달을 증가시킴으로써 인슐린 저항성을 개선할 수 있으리라 판단되었다.

[0115] <실시예 2>

[0116] 푸코잔틴의 RLAR 및 PTP1B 억제에서 효소 반응속도 분석

- [0117] 푸코잔틴의 RLAR 및 PTP1B 효소 억제 패턴을 분석하기 위하여 LineweaverBurk 및 Dixon plots(Lineweaver and Burk, 1934; Dixon, 1953; Cornish-Bowden, 1974)을 이용하였다.
- [0118] 푸코잔틴의 RLAR 및 PTP1B 효소 반응속도 분석은 Lineweaver-Burk plots을 이용하여 측정하였다. 먼저 RLAR 효소 반응속도 분석을 위해 본 발명의 푸코잔틴을 농도별(0 μM (●), 151.77 μM (○), 303.53 μM (▼))로 반응 혼합물에 첨가하였으며, 기질(DL-glyceraldehyde)의 다른 농도(25, 50, 100 mM)에서 효소 활성을 측정하였다. 또한, PTP1B 효소 반응속도 분석을 위해 푸코잔틴을 농도별(0 μM (●), 4.22 μM (○), 10.13 μM (▼))로 반응 혼합물에 첨가하였으며, 기질(pNPP)의 다른 농도(0.5, 1.0, 2.0 mM)에서 효소 활성을 측정하였다.
- [0119] 그 결과 도 1A에서 나타낸 바와 같이, y절편에서 동일점(불변)을 통해 본 발명의 푸코잔틴은 RLAR를 경쟁적으로 억제(저해)하는 것을 알 수 있었으며, 또한 도 1B에서 나타낸 바와 같이 푸코잔틴은 혼합된 타입의 PTP1B를 억제제임을 확인할 수 있었다.
- [0120] 한편, RLAR 및 PTP1B 효소 억제는 Dixon plot을 이용하여 측정하였다. 먼저 RLAR 효소 억제 분석을 위해 본 발명의 푸코잔틴을 농도별(100, 200 μM)로 반응 혼합물에 첨가하였으며, 기질(DL-glyceraldehyde)의 다른 농도(25, 50, 100 mM)에서 효소 억제 활성을 측정하였다. 또한, PTP1B 효소 억제 분석을 위해 푸코잔틴을 농도별(4.22, 10.13 μM)로 반응 혼합물에 첨가하였으며, 기질(pNPP)의 다른 농도(0.5, 1.0, 2.0 mM)에서 효소 억제 활성을 측정하였다. 억제 상수(K_i)는 Dixon plot의 해석을 통해 결정하였다.
- [0121] 그 결과 억제 상수(K_i) 값은 RLAR-67.67 μM , PTP1B-1.53 μM 로 나타났다(결과 미도시).
- [0122] <실시예 3>
- [0123] **푸코잔틴의 PTP1B 억제를 위한 분자 도킹 모델**
- [0124] 상기 실험예 4를 통해, 본 발명의 푸코잔틴이 PTP1B 효소의 활성을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였는바, 본 실험에서는 이러한 PTP1B 억제를 분자 구조적인 측면에서 분석하고자 푸코잔틴과 PTP1B 사이의 구체적인 상호결합을 Autodock 4.0 프로그램을 이용 분자 도킹 시뮬레이션을 통해 확인하였다.
- [0125] 도 2에서는 PTP1B에 푸코잔틴이 결합된 분자 도킹 모델을 나타내었는데, 도 2에서 푸코잔틴은 청록색(cyan color)으로 나타내었으며, 자홍색(magenta color)으로 표시된 화합물은 2003년에 공개된 논문에서 PTP1B 억제제로 개시한 compound 23을 나타낸 것이다 (Szczepankiewicz, B.G., Liu, G., Hajduk, P.J., Abad-Zapatero, C., Pei, Z., Xin, Z., Lubben, T.H., Trevillyan, J.M., Stashko, M.A., Ballaron, S.J., Liang, H., Huang, F., Hutchins, C.W., Fesik, S.W., Jirousek, M.R., Discovery of a potent, selective protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor using a linked-fragment strategy.J.Am.Chem.Soc.,125, 4087-4096(2003)).
- [0126] 이를 더욱 자세히 살펴보면, PTP1B의 활성 부위에서 Phe30, Phe52 및 Gly183 잔기들이 푸코잔틴의 2개의 히드록실 그룹들과 3개의 수소결합을 형성하는 것으로 나타났으며, 푸코잔틴의 공액 이중결합 함유 탄화수소 사슬과 PTP1B의 Ile219, Tyr46, Val49, Ala217 잔기들 사이에도 추가적으로 소수성 상호작용이 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 한편, 푸코잔틴의 결합 에너지는 -7.66 kcal/mol로 나타났다. 이러한 특성들로 인해 PTP1B 효소의 개방형이 안정화되며, PTP1B와 푸코잔틴 사이의 결합이 강화됨으로써, 결과적으로는 PTP1B의 구조가 변화하게 되어 PTP1B의 활성화 부위가 불활성화되는 것이라 판단하였다.
- [0127] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

부호의 설명

- [0128] RLAR: rat lens aldose reductase

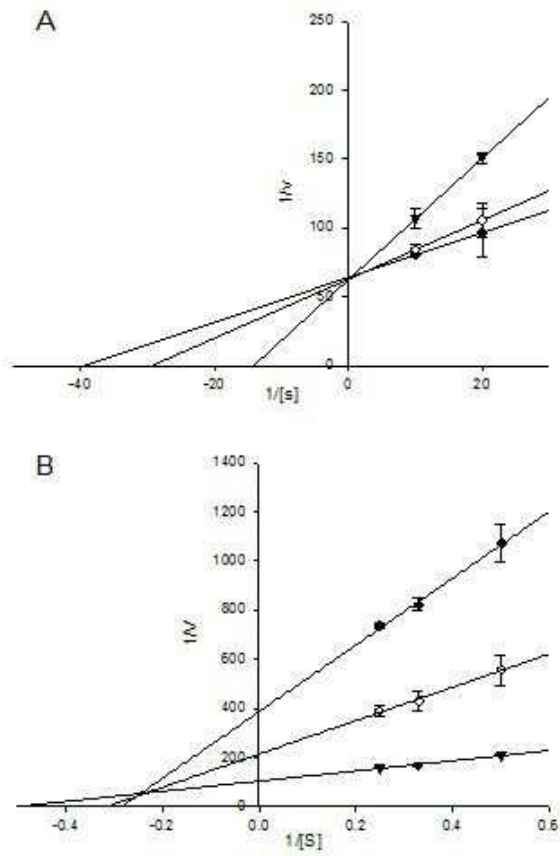
HRAR: human recombinant aldose reductase

AGEs: Advanced Glycation Endproducts

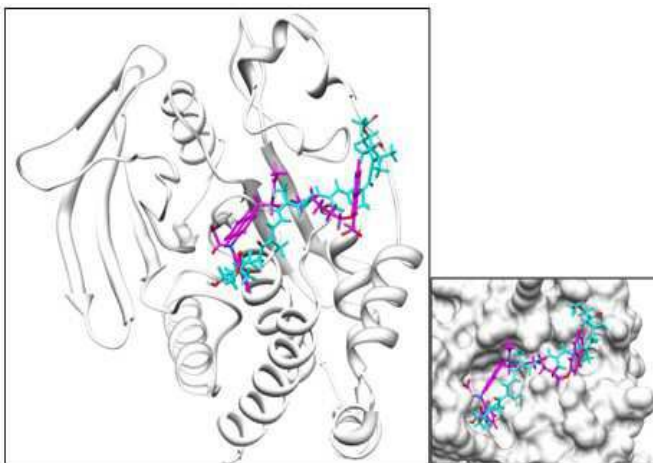
PTP1B: protein tyrosine phosphate 1B

도면

도면1



도면2



도면3

