(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년03월18일
(11) 등록번호 10-0814368
(24) 등록일자 2008년03월11일

(51) Int. Cl.
A61K 31/185 (2006.01) *A61K 36/185* (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0038669
(22) 출원일자 2007년04월20일
심사청구일자 2007년04월20일
(56) 선행기술조사문헌
JP03058939 A
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
이광원
서울 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대학 동관 식품공학과415호
이현순
서울 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대학 동관 417호
(74) 대리인
특허법인아주

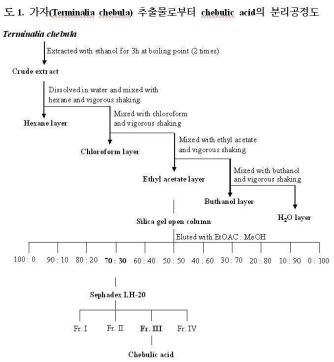
전체 청구항 수 : 총 13 항 심사관 : 여경숙

(54) 체불릭산을 유효성분으로 함유하는 당뇨/당뇨합병증 예방또는 치료용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 의하면, 당뇨/당뇨합병증 억제효과가 뛰어난, 체불릭산을 유효성분으로 하는 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물이 제공된다. 이는 천연식물에서 유래되어 안전성이 보강된 것으로, 건강기능식품 소재나 의약품 소재로 널리 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(56) 선행기술조사문헌
JP04069343 A
JP2006335725 A
JP2006335728 A
JP2006335736 A
US 7,014,872 B2

특허청구의 범위

청구항 1

체불릭산(chebulic acid)을 유효성분으로 하는 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 체불릭산은 가자(Terminalia chebula)로부터 유래하는 것인 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 최종당화산물(AGE, advanced glycation end-product)의 생성을 억제하는 기작으로 작용하는 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, AGE에 의한 활성산소를 제거하는 기작으로 작용하는 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, AST(aspartate aminotransferase) 및 ALT(alanine aminotransferase)의 혈중 농도를 낮추는 기작으로 작용하는 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 당뇨로 인한 혈관내피세포의 과투과능을 억제하는 기작으로 작용하는 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 혈관내피세포에 혈구세포의 부착을 억제하는 기작으로 작용하는 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 간세포 또는 눈의 렌즈의 손상을 억제하는 기작으로 작용하는 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 9

제1항의 조성물을 포함하는 건강기능식품.

청구항 10

제1항의 조성물을 포함하는 의약품.

청구항 11

i) 가자(Terminalia chebula)의 알콜 추출물을 수득하는 단계;

ii) 단계 i)에서 얻어진 알콜 추출물을 1종 이상의 유기 용매를 이용하여 극성에 따라 순차적으로 추출하는 단계; 및

iii) 단계 ii)에서 수득된 유기 용매 추출액에 대하여 젤 여과 크로마토그래피를 수행하는 단계를 포함하는 제1항의 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 유기 용매 추출은 헥산, 글로로포름, 에틸아세테이트, 및 부탄올의 순서로 수행되는, 당

뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물의 제조방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 젤 여과 크로마토그래피는 silca gel 60 또는 Sepadex LH-20 컬럼을 이용하여 수행되는, 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물의 제조방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<10> 본 발명은 체불릭산을 유효성분으로 하는 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

<11> 당뇨병은 인슐린의 분비량이 부족하거나 정상적인 기능이 이루어지지 않아 혈중 포도당 농도가 높아지는 질환이다.

<12> 이렇게 농도가 높아진 당의 카르보닐기와 단백질, 핵산, 인지질의 아미노기가 일련의 비효소적 반응을 포함하여 아마도리 재배열과 비산화적, 산화적 변형에 의한 Schiff base를 형성하여 최종당화산물(advanced glycation end-product, AGE)을 형성한다.

<13> 이러한 최종당화산물(AGE)은 당뇨성 혈관 질환, 특히 류마티스성 관절염 같은 결체조직 질환, 신경 퇴행성 알츠하이머병, 말기 신 질환 같은 다양한 만성 질환과 망막, 신장, 신경, 심혈관계 등의 당뇨 합병증의 발병에 큰 영향을 준다.

<14> 당뇨병의 위험성은 당뇨로 인해 나타나는 여러 가지 합병증 때문인데, 당뇨병은 질환 그 자체보다 합병증의 예방 및 치료가 매우 중요하므로 관리의 목적은 정상 혈당유지와 합병증을 예방하는데 있다고 할 수 있다.

<15> 이러한 당뇨 또는 당뇨 합병증과 관련하여 당뇨와 관련된 합병증의 진행을 억제하는 것으로 알려진 아미노구아니딘의 경우 몇 가지 부작용이 3단계 임상실험에서 관찰되어 현재 사용이 중지되고 있다.

<16> 또한, 종래 특허등록된 "혈당 강하용 조성물" (등록번호 : 10-0577677), "소풍순기원 생약 복합제 추출물을 함유하는 당뇨병 예방 및 치료를 위한 조성물"(출원번호: 10-2002-0000504)의 경우는 단일 식물이 아닌 여러 가지 식물 추출물과 다른 성분(칼슘 등) 등의 복합 제제로 되어 있다.

<17> 한편, 이당류 분해효소인 알파-글리코시다아제를 억제시키는 제제인 아카보스™가 혈당 강하 기능을 가진 당뇨병 치료제로 판매되고 있으나, 알파-글리코시다아제 억제제는 이당류의 분해를 억제하기 때문에 전분을 섭취하면 장내에 이당류의 농도가 증가되어 삼투압 증가로 설사가 유발될 수 있고, 장내 세균에 의해서 이당류가 분해되어 가스 생성량이 증가되는 등의 부작용이 크다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<18> 본 발명의 목적은 당뇨/당뇨 합병증의 예방 또는 치료용으로 사용될 수 있는 단일 물질 및 이를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

<19> 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 물질을 포함하는 건강기능식품 및 의약품을 제공하는 것이다.

<20> 아울러, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 물질의 제조방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<21> 상기 목적을 달성하기 위하여,

<22> 본 발명의 일 측면에 따르면, 체불릭산을 유효성분으로 하는 당뇨 및 당뇨 합병증의 예방/치료용 조성물을 제시할 수 있다.

<23> 당뇨병은 인슐린의 분비량이 부족하거나 정상적인 기능이 이루어지지 않아 혈중 포도당 농도가 높아지는 질환으로서, 농도가 높아진 당의 카르보닐기와 단백질, 핵산, 인지질의 아미노기가 일련의 비효소적 반응을 포함하여

아마도리 재배열과 비산화적, 산화적 변형에 의한 Schiff base를 형성하여 최종당화산물(advanced glycation end-products, AGEs)을 형성하게 된다.

<24> 이러한 최종당화산물(AGEs)은 당뇨성 혈관 질환, 특히 류마티스성 관절염 같은 결체조직 질환, 신경 퇴행성 알츠하이머병, 말기 신질환 같은 다양한 만성 질환과 망막, 신장, 신경, 심혈관계 등의 당뇨 합병증의 발병에 중요한 인자로 알려져 있다.

<25> 본 발명자 등은 천연식물인 가자(Terminalia chebula)에서 분리·정제한 체불릭산(chebulic acid) 및 이것을 포함하는 분획물이 상기 AGEs의 생성을 억제하고, 이것에 의해 발생하는 활성산소를 제거하고, AST(aspartate aminotransferase) 및 ALT(alanine aminotransferase)의 혈중 농도를 낮추며, 혈관내피세포의 투과능을 억제하고, 혈관내피세포에의 모노사이트의 부착을 억제하며, 간세포 및 눈의 렌즈의 손상을 억제하는 기작 등으로 작용하여 당뇨 또는 당뇨합병증의 예방 또는 치료에 효과적으로 사용할 수 있음을 발견하였다.

<26> 본 발명의 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료에 효능이 있는 유효성분은 가자(Terminalia chebula) 식물의 성숙한 열매의 에탄올 추출물(TC-0)로부터 도 1에 나타낸 방법으로 얻었다.

<27> 도 1의 분리정제과정에서 나타난 각 획분의 당뇨/당뇨합병증 억제능을 알아본 결과(표 1 및 표 2 참조), 에탄올 추출물(TC-0)은 1000 μg/mL의 농도에서 62.9 ± 1.8 %, 이 획분에서 분획된 에틸아세테이트 획분(TC-3)은 73.4 ± 1.1 %, TC-3-4 획분은 83.6 ± 0.8 %, 최종적으로 얻은 유효성분(TC-3-4-3)은 88.5 ± 0.1 %의 높은 활성을 보였다.

<28> 이 유효성분(TC-3-4-3)에 대하여 NMR 을 통한 구조분석을 수행하였다. 이 물질의 ^{1}H-NMR spectrum을 보면 6.91ppm에서 aromatic methine proton과 5.10, 3,61, 2,87ppm에서 methine proton을 확인할 수 있으며 2,70과 2,10ppm에서 비대칭 methylene proton을 확인할 수 있었다. ^{13}C-NMR spectrum을 보면 4개의 carbonyl carbone와 3개의 methine과 1개의 methylene을 확인할 수 있었다. 이 물질의 COSY와 HMBC의 2차원 NMR 분석결과 1차원적 구조는 같으나 9번 탄소에 연결된 COOH의 2차원적 위치에 차이가 있는 광학이성질체 물질(도 2(B-2) 참조) 이 소량 섞여 있는 것을 확인할 수 있었다. 최종적으로 이 물질은 체불릭산(도 2(B-1) 및 네오체불릭산(도 2(B-2) 참조)으로 판명되었으며, FAB-MS를 이용하여 분자량을 측정한 결과, m/z 357에서 positive ion peak를 확인하였다(도 2 참조). 따라서 가자로부터 얻은 당뇨/당뇨합병증 억제 활성물질은 분자량이 356인 체불릭산임을 확인할 수 있었다.

<29> 이어, 본 발명자 등은 가자로부터 분리한 당뇨/당뇨합병증 예방 및 억제 활성물질인 체불릭산의 활성 기작을 확인하기 위하여, 당뇨(고혈당)시 가장 먼저 손상을 받는 혈관 내피세포(Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)와 고혈당으로 체내에서 빠르게 생성되어 독성이 있다고 알려진 글루세르알데히드를 이용하여 당뇨합병증의 원인물질인 최종당화합물(glyceraldehyde-advanced glycation endproducts, glyer-AGE)을 만들어 혈관내피세포에 직접 처리하였다. 그 결과, 100μg/ml의 glyer-AGE를 혈관내피세포에 처리시 활성산소의 양이 대조군의 31.2%(도 3(A))에서 65.6%(도 3(B))로 증가한 반면, 체불릭산에 의해 5μM에서 61.4%, 10μM에서 57.5%, 25μM에서 54.3%으로 활성 산소의 양이 감소하는 것을 확인하였다(도 3 참조).

<30> 한편, 당뇨합병증의 진행시 혈관 내피세포의 여러 가지 기능상실이 일어나는데 특히 혈관내피세포의 투과능이 증가하여 혈액 내의 고분자 등이 혈관 내부로 침투하게 되어 혈관의 동맥경화, 눈 렌즈의 단백질 침착 등을 일으키게 된다.

<31> 본 발명자 등은 혈관내피세포에 100μg/ml의 glyer-AGE를 24시간 처리했을 경우 내피세포 저항(transendothelial electric resistance, TER)이 76.9±2.2%로 감소한 반면, 체불릭산을 10μM 처리시 85.2±9.0%, 25μM 처리시 91.3±5.3%로 저항값이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (도 4 참조). 이것은 체불릭산이 최종당화합물에 의해 혈관내피세포의 투과능이 증가하는 것을 억제하여 최종적으로 당뇨합병증 즉, 동맥경화, 백내장 등을 예방할 수 있음을 보여주는 것이다.

<32> 당뇨병에 사망률은 고혈당에 의한 문제보다는 오히려 만성 혈관 합병증에 의한 문제가 더 크다. 만성합병증은 미세혈관 합병증과 대혈관 합병증으로 크게 나눌 수 있는데, 그 중 미세혈관 합병증은 당뇨를 오래 앓게 되면 발생한다. 하지만, 대혈관 합병증은 주로 동맥경화증에 의해 생기게 되며, 점차적으로 뇌졸중, 관상동맥질환(협심증, 심근 경색증 등), 말초혈관질환 등으로 진행되게 된다. 따라서 당뇨합병증에서 동맥경화는 비교적 유병기간이 짧은 당뇨환자에게도 나타나는 합병증이다. 동맥경화는 초기 여러 가지 원인에 의해 혈액 내 혈구의 혈관내피세포에 부착에 의해 시작된다. 특히, 당뇨합병증의 초기진행시 혈관내피세포에 혈구세포의 부착이 관찰되며

부착된 혈구세포는 혈관내피세포를 통과해 혈관으로 들어가 혈관내에서 염증과 같은 연쇄반응을 일으켜 점차적으로 혈관의 경화를 초래하게 된다.

<33> 본 발명자 등은 혈관내피세포(HUVEC)에 100㎍/ml의 glyer-AGE와 체불릭산을 처리하였다. 그 결과, glyer-AGE를 당뇨 환자의 혈액 중 최종 당화산물의 농도가 50-200㎍/ml인 것을 감안하여 100㎍/ml의 농도로 처리시, 정상 대조군(도 5(A))에 비해 혈구세포의 부착이 증가하는 반면(도 5(B)), 체불릭산을 처리한 경우에는 농도에 따라 부착 정도가 낮아지는 것을 확인하였다.

<34> 또한, 흰쥐를 이용하여 streptozotoin을 이용하여 당뇨를 유발시킨 후 8% 체불릭산을 함유한 당뇨합병증 억제활성 획분(TC-3)을 500mg/kg(고농도 투여군)과 100mg/kg(저농도 투여군)으로 8주간 투여한 결과에서는 당뇨합병증의 주요 예측인자인 당화혈색소(HbA1c)가 정상 대조군은 4.0±0.2%인데 비해 당뇨 대조군은 10.8±0.1%로 증가하였으며 본 발명의 당뇨합병증 억제활성 획분을 투여한 군은 9.6.0±0.1%로 유의성 있게 감소한 것으로 나타났다(표 4 참조).

<35> 8주간 투여된 실험동물의 혈액의 ALT와 AST를 측정한 결과에서는 당뇨 대조군은 당뇨합병증의 하나인 비알콜성 간손상이 진행되어 ALT와 AST가 증가된 것이 관찰되었으나 본 발명의 당뇨합병증 억제 활성 획분 투여군에서는 ALT와 AST가 낮아졌음을 확인하였다(도 6 참조).

<36> 또한, 실험동물의 간을 염색한 후 확인해 본 결과에서도 당뇨 대조군은 지방구가 관찰된 반면(도 7(B)), 당뇨합병증 억제 활성 획분 투여군은 정상 대조군과 유사한 형태학적 모양을 가지고 있었다. 따라서 가자로부터 얻은 당뇨합병증 억제 및 예방활성 획분은 당뇨에 의한 간 손상을 억제하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

<37> 당뇨합병증 특히 눈의 렌즈는 당화화합물에 의해 손상을 받아 혼탁되어 백내장을 일으키게 됨으로써 최종적으로 실명을 야기시키는 심각한 당뇨 합병증으로 알려져 있다. 8주간 관찰한 당뇨 대조군은 정상 대조군에 비해 쥐의 렌즈가 혼탁된 것을 확인하였으나(도 8(B)), 본 발명의 당뇨합병증 억제 활성 획분 투여군에서는 대조군과 유사한 투명도를 유지하고 있음을 볼 수 있다(도 8(C-D)). 따라서 가자로부터 얻은 당뇨합병증 예방 및 진행억제 활성 획분은 당뇨합병증에 의한 백내장을 억제하는 효능이 있음을 확인 하였다.

<38> 아울러, 당뇨합병증인 동맥경화의 발생을 예측히기 위하여 동맥경화의 초기 발생예측인자인 ICAM-1(intercellular adhesion moleculle-1)의 발현 여부를 mRNA 수준에서 예측한 결과 100mg/kg 투여량으로 8주간 투여한 군에서 당뇨 대조군보다 유의적 수준으로 낮아진 것을 확인하였다(도 9 참조).

<39> 상기한 일련의 결과로부터, 본 발명자 등이 가자 식물로부터 분리한 체불릭산 및 이를 유효성분으로 함유하는 조성물은 당뇨/당뇨합병증의 예방 또는 치료를 위해 효과적으로 사용될 수 있을 것이며, 이러한 체불릭산은 본 발명의 실시예에서는 가자로부터 분리, 정제되었으나, 상기 화합물을 함유하는 다른 여러 식물에서 분리할 수도 있고, 천연물에서 분리하는 것만이 아니라 화학적으로 합성하여 사용하여도 무방하다.

<40> 또한, 본 발명의 다른 일 측면에 따르면, 상기 체불릭산을 유효성분으로 함유하는 조성물을 포함하는 건강기능식품을 제시할 수 있다.

<41> 앞에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 체불릭산 및 이를 포함하는 가자 추출물(또는 분획물)은 최종당화산물인 AGE의 생성을 억제하고, 이것에 의해 발생하는 활성산소를 제거하고, AST 및 ALT의 혈중 농도를 낮추며, 혈관내피세포의 투과능을 억제하고, 혈관내피세포에의 모노사이트의 부착을 억제하며, 간세포 및 눈의 렌즈의 손상을 억제하는 기작 등으로 작용하여 당뇨/당뇨합병증의 예방 또는 치료를 위한 건강기능식품 소재로 유용하게 사용될 수 있다.

<42> 상기 건강기능식품은 최종 제품의 상품성과 소비자 기호도에 따라 다른 식품소재를 첨가하여 제조될 수 있다.

<43> 유효 성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 체불릭산을 함유하는 조성물은 총 원료에 대하여 15 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 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.

<44> 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 기능성 식품을 모두 포함

한다.

<45> 본 발명의 건강기능식품은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

<46> 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

<47> 그 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등이나 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01~10 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

<48> 아울러, 본 발명의 또 다른 일 측면에 따르면 상기 조성물을 포함하는 의약품을 제시할 수 있다.

<49> 따라서, 본 발명의 조성물은 최종당화산물의 생성에서 기인되는 당뇨 또는 당뇨성 망막병증, 당뇨성 백내장, 당뇨성 신증, 당뇨성 신경병증, 당뇨성 지방간 등과 같은 당뇨합병증의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 최종당화산물의 생성을 억제하는 경우 자유라디칼 생성의 저하 및 산화적 스트레스의 유발 비율이 줄어들어, 산화적 스트레스에 의한 노화의 방지 및 지연에 유용하게 사용될 수 있다.

<50> 본 발명의 조성물은 상기 체불릭산에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있고, 임상 투여시에 경구 또는 비경구 투여가 가능하며, 일반적인 의약품 제제 형태로 사용될 수 있다.

<51> 이 경우 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 사용할 수 있는데, 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 멸균용액, 정제, 코팅정 및 캡슐과 같은 공지된 제형들에 사용될 수 있는 표준의 약제학적 담체라면 어느 것이든 가능하다.

<52> 통상적으로 담체는 전분, 밀크, 당, 특정 종류의 클레이, 젤라틴, 스테아린산, 탈크, 식물성 기름 또는 오일, 검, 글리콜류 등의 부형제 또는 기타 다른 공지의 부형제를 포함할 수 있으며 또한 풍미제, 색소 첨가제 및 다른 성분들이 포함될 수 있다.

<53> 본 발명의 체불릭산을 유효성분으로 함유한 조성물을 투여하기 위한 제제는 통상적인 방법으로 경구, 정맥내, 근육내, 경피 투여의 방법에 의해 투여할 수 있지만, 이들 방법에만 한정되는 것은 아니다. 실제 임상투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제한다. 또한 단순한 부형제 이외에, 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제가 포함될 수 있다.

<54> 또한, 본 발명의 조성물은 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사에 의한다. 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위해서는 상기 체불릭산을 포함하여 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제제한다.

<55> 본 약학적 조성물의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 불활성화율, 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증 정도에 따라 적절히 선택되나, 일반적으로 1일에 1회 내지 5회 나누어 투여할 수 있다. 본 발명의 조성물에서 상기 체불릭산을 유효성분으로 함유하는 경우, 그 유효용량은 1~2000 ㎎/㎏/day 이고, 바람직하기로는 1~100 ㎎/㎏/day 이다. 상기 제제의 정확한 양, 투여경로 및 횟수는 제제의 특성, 투여대상의 체중 및 상태, 그리고 사용하고자 하는 특정 유도체의 특성에 따라 용이하게 결정할 수 있다.

<56> 본 발명에서 상기 체불릭산을 실험용 랫트를 대상으로 한 급성독성검사 결과, 경구투여시 최소치사량(LD_{50})은 적어도 1g/㎏ 이상으로 전혀 독성효과를 나타내지 않음으로써 생체 안전성이 매우 높다는 것을 알 수 있다.

<57> 본 발명의 조성물은 당뇨/당뇨합병증의 예방 및 치료, 노화의 방지 및 지연을 위하여 단독으로 또는 수술, 방사

선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

<58> 이하, 본 발명은 하기 실시예에 의해 상세하게 설명하나 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

<59> 실시예 1: 최종당화산물(AGE)의 생성 억제능 측정

<60> 글라이케이션 반응이 진행되면 일련의 산화, 축합 등의 복합적인 과정을 거쳐 여러 화합물이 혼재되어 있는 최종당화산물(advanced glycation end product, AGE)이 만들어진다. 이 최종당화산물은 고혈당에 의한 당뇨합병증의 원인물질로 작용하는데, AGE 화합물 중 일부는 형광을 띄게 되어(Baynes & Monnier, 1989) 이에 의해 글라이케이션 반응의 정도를 가늠할 수 있다. 본 발명자 등은 가자에서 추출한 여러 샘플(도 1의 각 획분)이 가지는 최종당화산물 생성 억제 정도를 여기 파장 335nm, 발광 파장 385nm에서 형광광도계를 이용하여 측정하였다(Zouhair *et al*. 2004). 최종당화산물의 생성억제능은 당이 전혀 없는 대조군(control)의 값을 100% 억제능으로 하고, 당과 단백질이 모두 있는 단백질 글라이케이션 군의 값을 0% 하여 나타내었으며 양성대조군으로 10mM의 아미노구아니딘을 사용하였다. 아래 표 1에 자세한 조성을 나타내었다.

표 1

<61>

	대조군	단백질 글라이케이션	양성 대조군	샘플
DW	●	●	●	●
100mM DTPA	●	●	●	●
1M Phosphate buffer	●	●	●	●
BSA	●	●	●	●
350mM N-formyl Lysine	●	●	●	●
Threose		●	●	●
Sample or inhibitor			10 mM 아미노구아니딘	샘플
평가	100% 억제	0% 억제		

<62> 하기 표 2는 각 샘플의 최종당화산물 생성 억제능을 수치로 나타내었다.

표 2

정제 과정에 따른 당뇨합병증 억제 활성

정제과정	당뇨합병증 억제 효능 (% control) [a]
에탄올 추출물(crude extract, TC-0)	62.9 ± 1.8
에틸 아세테이트 층(Ethyl acetate layer, TC-3)	73.4 ± 1.1
실리카겔 획분(Silica gel fraction, TC-3-4)	83.6 ± 0.8
세파덱스 획분(Sephadex LH-20, chebuic acid)	88.5 ± 0.1

[a] 각 추출물의 농도는 1,000 mg/mL이며 각 data는 대조군과 비교하여 표현하였음.

<63>

<64> 도 1의 분리정제과정에서 나타난 각 획분의 당뇨/당뇨합병증 억제능을 알아본 결과(표 1 및 표 2 참조), 에탄올 추출물(TC-0)은 1000 μg/mL의 농도에서 62.9 ± 1.8 %, 이 획분에서 분획된 에틸아세테이트 획분(TC-3)은 73.4 ± 1.1 %, TC-3-4 획분은 83.6 ± 0.8 %, 최종적으로 얻은 유효성분(TC-3-4-3)은 88.5 ± 0.1 %의 높은 활성을 보였다.

<65> 실시예 2: 가자 (Terminalia chebula)로부터 당뇨합병증 예방 및 진행억제 유효성분의 분리

<66> 건조된 가자를 분쇄한 후 에탄올을 이용하여 3시간 동안 환류추출하여 얻은 추출물을 7,500 rpm , 4℃에서 원심분리하여 상등액 (TC-0)을 얻었다. 상기 TC-0 획분을 유기용매의 극성도를 달리하며 헥산(hexane), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(hylacetate), 부탄올(buthanol), DW 층으로 분리하였으며 최종당화산물 생성 억제능이 확인된 에틸아세테이트 층(TC-3)을 100% 에틸아세테이트에 녹인 후 에틸아세테이트 100% → 메탄올 100%까지 용매를 10%씩 달리하면서 silica gel 60 레진을 이용하여 용출시켰다. 이어, 최종당화산물 생성의 억제능이 확인된 TC-3-4 획분을 Sepadex LH-20을 충전시킨 컬럼을 이용하여 더 분리하였다. 상기 컬럼은 이동상을 20%

메탄올로 하여 레진에 흡착시킨 후 용출시켜 시료를 수집하였다.

<67> 실시예 3: 유효 물질의 구조분석

<68> 실시예 2에서 정제된 시료의 분자량은 FAB-MS (fast atom bombardment)를 사용하여 측정하였으며, 이 정제 시료를 DMSO-*d*6에 녹인 후 이화학적 이동(ppm)을 조사하여 구조적 특징을 파악하였다. 1D NMR인 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR 및 2D NMR인 H-H COSY, H-C HMQC를 NMR spectrometer (Bruker AMX-500 NMR)가 이용되었다. 결과를 아래에 나타낸다.

가자로부터 정제한 항당뇨합병증 활성물질의 구조해석을 위한 ^{1}H and ^{13}C NMR spectral data 및 구조

No.	1		2	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	163.3		163.2	
3	76.4	5.10 (1H, s)	76.1	4.91 (1H, s)
4	35.6	3.61 (1H, d, J=8.8 Hz)	34.8	3.94 (1H, d, J=4.4 Hz)
4a	116.6		116.1	
5	142.7		142.3	
6	138.7		139.2	
7	145.3		145.4	
8	107.6	6.91 (1H, s)	107.1	6.95 (1H, s)
8a	114.8		115.3	
9	43.7	2.87 (1H, ddd, J=10.8, 8.8, 3.6)	43.3	3.20 (1H, ddd, J=12.0, 4.4, 2.8)
10	34.2	2.70 (1H, dd, J=16.8, 10.8)	31.4	2.57 (1H, dd, J=16.8, 12.0)
		2.10 (1H, dd, J=16.8, 3.6)		1.87 (1H, dd, J=16.8, 2.8)
11	172.9		173.0	
12	170.9		171.2	
13	174.4		174.1	
OH		12.39 (br s)		
		9.80 (br s)		
		9.57 (br s)		
		9.18 (br s)		

Chemical shifts in ppm from TMS as internal standard.

<69> ^{1}H and ^{13}C NMR were measured at 400 MHz and 100 MHz, respectively.

<70> 가자로부터 얻은 단일물질(TC-3-4-3)에 대하여 NMR분석을 통한 구조분석을 하였다. 이 물질의 ^{1}H-NMR spectrum을 보면 6.91ppm에서 aromatic methine proton과 5.10, 3,61, 2,87ppm에서 methine proton을 확인할 수 있으며 2,70과 2,10ppm에서 비대칭 methylene proton을 확인할 수 있었다. ^{13}C-NMR spectrum을 보면 4개의 carbonyl carbone와 3개의 methine과 1개의 methylene을 확인할 수 있다. 이 물질의 COSY와 HMBC의 2차원 NMR 분석결과 1차원적 구조는 같으나 9번 탄소에 연결된 COOH의 2차원적 위치에 차이가 있는 광학이성질체 물질(도 2(B-2) 참조)이 소량 섞여 있는 것을 확인할 수 있었다. 최종적으로 이 물질은 체불릭산(chebulic acid) (도 2(B-1) 및 네오체불릭산(neochebulic acid)(도 2(B-2) 참조)으로 FAB-MS를 이용하여 분자량을 측정한 결과, 이 물질의 분자량은 m/z 357에서 positive ion peak를 확인하였다. 따라서 가자로부터 얻은 당뇨합병증 억제 활성물질은 분자량은 356인 체불릭산임을 확인할 수 있었다.

<71> 시험예 1: 당뇨 합병증 예방 및 진행억제 효능 측정

<72> 1-1: 실험동물의 사육 및 당뇨 유발

<73> 실험동물은 생후 8주령(b.w.: 280 ± 10 g)의 Sprague Dawley (Samtako biokorea, Korea) 수컷 흰쥐를 구입하고 고형사료(Samtako Rodent NIH-31 Modified Auto)와 물을 자유 공급하여 일주일 간 적응시킨 후, 평균체중이 280 ± 5g 이 되었을 때 당뇨를 유발하였다.

<74> 당뇨 유발을 위해 실험동물의 복강에 streptozotocin (STZ; Sigma Aldrich, S-0130)을 0.1M 시트르산 버퍼(pH 4.5)에 용해시켜 50 mg/kg으로 복강투여 하였다. 투여 24시간, 48시간 후의 혈당이 240 mg/dL 이상 유지되는 것을 당뇨가 유발된 것으로 하여 다음 실험에 이용하였다. 정상 대조군의 경우 시트르산 버퍼만을 투여하였다. 최초 당뇨 유발을 간략히 확인하기 위해 뇨검사스틱(영동제약, Uriscan)을 사용하였다. 각 군별 STZ 및 시료 투여

량은 다음과 같다.

표 3

<75> 투여군 별 당뇨 유발 유무 및 시료 투여량

Group	No. of animal	Status	Dose
정상 대조군	8	정상	-
당뇨 대조군	10	당뇨	-
고농도 시료투여군	10	당뇨	500 mg/kg/day
저농도 시료투여군	10	당뇨	100 mg/kg/day

<76> 1-2: 시료의 수집 및 분석

<77> 모든 실험동물군은 8주 동안 매일 시료를 투여하였으며 혈당 측정은 12시간 절식 후, 꼬리정맥에서 채혈하여 혈당측정기(Medisense Optium Blood Gluose Electrodes)를 사용하여 측정하였다. 투여가 종결된 후 12시간 이상 절식시켜 혈당과 체중을 체크한 뒤 에틸에테르를 이용하여 마취시키고 복대동맥을 통해 채혈하였다. 혈액 중 일부는 혈청을 얻기 위하여 상온에서 30분 응고시킨 후 3000rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였으며 HbA1c 분석을 위하여 1ml 정도의 전혈을 EDTA 튜브에 담아 보관하였다. 혈청 중 알부민과 크레아틴 분석 및 HbA1c의 분석은 서울의과학연구소(SCL, 서울)에 의뢰하여 분석하였으며 모든 분석은 시료 수집 24시간 이내에 실시하였다. 하기 표 4에 그 결과를 나타내었다.

표 4

Serum glucose, creatinin, albumin and HbA1c levels of rat at the end of 8 weeks

	Non-DM control	DM control	DM + TCE-H	DM + TCE-L
Glucose (mmol/L)	8.8 ± 2.5	25.2 ± 1.6	26.7 ± 4.2	27.0 ± 3.1
Creatinin (mg/dL)	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Albumin (g/dl)	3.88 ± 0.13^{a}	2.63 ± 0.11^{b}	$2.94 \pm 0.08^{b,c}$	3.04 ± 0.06^{c}
HbA1c (%)	4.0 ± 0.2	10.8 ± 0.1	9.6 ± 0.1	9.6 ± 0.1

<78>

<79> 상기 표 3 및 표 4에서 알 수 있는 바와 같이, 당뇨가 유발된 실험동물에 8% 체불릭산을 함유한 당뇨합병증 억제활성 획분(TC-3)을 500mg/kg(고농도 투여군) 및 100mg/kg(저농도 투여군)으로 8주간 투여한 결과, 당뇨합병증의 주요 예측인자인 당화혈색소(HbA1c)가 정상 대조군은 4.0±0.2%인데 비해 당뇨 대조군은 10.8±0.1%로 증가하였으며 활성 획분을 투여한 군은 9.6.0±0.1%로 유의성 있게 감소하였다.

<80> 1-3: 조직 병리학적 검사

<81> 실험동물의 간에 대한 조직 병리학적 검사를 위하여 분리된 간을 10% 중성 완충 포르말린 용액에 24시간 동안 고정 후 파라핀(paraffin)으로 포매(embeding)한 후 microtome을 사용하여 5㎛ 두께로 박절하였다. 박절한 조직을 얇게 절편하고 슬라이드 글래스 위에 부착시킨 뒤 자일린(xyline)으로 파라핀을 제거한 다음, 100%, 90%, 80% 에탄올과 같이 농도를 낮추어 가며 5분씩 담구어 함수과정을 거치게 하였다. 헤마톡실린과 에오신(H&E) 염색으로 이중염색을 한 다음 탈수과정을 거쳤다. Canada balsam으로 봉합한 후 카메라 부착 광학현미경(Olympus cx-40)으로 관찰하여 사진을 촬영하였다.

<82> 8주간 투여된 실험동물의 혈액의 ALT와 AST를 측정한 결과, 당뇨 대조군은 당뇨합병증의 하나인 비알콜성 간손상이 진행되어 ALT와 AST가 증가된 것이 관찰되었으나 본 발명의 당뇨합병증 억제 활성 획분 투여군에서는 ALT와 AST가 낮아졌음을 확인할 수 있었다(도 6 참조). 또한 간을 염색한 후 확인해 본 결과에서도 당뇨 유발군은 지방구가 관찰된 반면(도 7(B)), 당뇨합병증 억제 활성 획분 투여군은 정상 대조군과 유사한 형태학적 모양을 가지고 있는 것으로 나타났다. 그러므로, 본 발명의 가자로부터 얻은 당뇨합병증 억제 및 예방활성 조성물은

당뇨에 의한 간 손상을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있다.

<83> 한편, 안구로부터 적출한 수정체는 분리한 직후 삼안 해부 현미경(Olympus SZX9)을 이용하여 혼탁 정도를 확인하였다. 눈의 렌즈는 당화화합물에 의해 손상을 받아 혼탁되에 백내장을 일으키게 되어 최종적으로 실명을 야기시키는 심각한 당뇨 합병증으로 알려져 있다.

<84> 8주간 관찰한 당뇨 대조군은 대조군에 비해 눈의 렌즈가 혼탁된 것을 확인할 수 있었으나(도 8(B)), 본 발명의 당뇨합병증 억제 활성 획분 투여군에서는 대조군과 유사한 투명도를 유지하고 있음을 확인할 수 있었다(도 8(C-D)). 따라서 본 발명의 당뇨합병증 억제 활성 획분은 당뇨합병증에 의한 백내장을 억제하는 효능이 있음을 확인하였다.

<85> 1-4: 역전사-PCR

<86> 모든 실험동물군의 대동맥궁(aortic arch)으로부터 흉부동맥(thoracic aorta) 부분을 취하여 TRIZOL™(Invitrogen 사) 이용하여 RNA를 추출하였다. Superscript-II(Invitrogen 사)를 이용하여 추출한 RNA로부터 cDNA를 만든 후 PCR을 이용하여 ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1)의 발현 여부를 확인하였다. 상기 ICAM-1은 당뇨합병증인 동맥경화의 발생을 예측하기 위한 초기 예측인자이다. 그 결과, 100mg/kg 투여량으로 8주간 투여한 군에서 mRNA 발현 레벨이 당뇨 대조군보다 유의적 수준으로 낮아진 것을 확인하였다(도 9 참조).

<87> 시험예 2 : 랫트에 대한 경구투여 급성독성실험

<88> 본 발명의 체불릭산의 급성 독성을 알아보기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<89> 실험동물로 6주령의 특정병원부재(SPF) SD계 랫트를 사용하여 급성독성실험을 실시하였다. 8마리씩의 동물에 체불릭산을 물에 녹여 1g/kg/10㎖의 용량으로 단회 경구 투여하였다. 시험물질 투여 후 동물의 폐사여부, 임상증상 및 체중변화 등을 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 복강장기와 흉강장기의 이상 여부를 관찰하였다. 시험결과, 시험물질을 투여한 모든 동물에서 특기할 만한 임상 증상은 없었고 폐사된 동물도 없었으며, 또한 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학검사, 부견소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과 본 발명의 체불릭산은 모두 랫트에서 1g/kg 까지 독성변화를 나타내지 않았으며, 경구투여 최소치사량(LD_{50})은 적어도 1g/kg 이상인 안전한 물질로 판단되었다.

<90> 제제예 1 : 정제의 제조

<91> 체불릭산 10mg, 옥수수전분 90.0mg, 유당 175.0mg, 엘-히드록시프로필셀룰로오스 15.0mg, 폴리비닐피롤리돈 905.0mg 및 에탄올 적량의 원료를 균질하게 혼합하여 습식과립법으로 과립화하고 스테아린산 마그네슘 1.8mg을 가하여 혼합한 후 1정이 400mg이 되도록 타정하였다.

<92> 제제예 2 : 캅슐제의 제조

<93> 체불릭산 10mg, 옥수수전분 80.0mg, 유당 175.0mg 및 스테아린산 마그네슘 1.8mg을 균일하게 혼합하고 1캅셀에 360mg씩 충전하였다.

<94> 제제예 3 : 기능성 음료의 제조

<95> 꿀 522mg

<96> 치옥토산아미드 5mg

<97> 니코틴산아미드 10mg

<98> 염산리보플라빈나트륨 3mg

<99> 염산피리독신 2mg

<100> 이노시톨 30mg

<101> 오르트산 50mg

<102> 체불릭산 10mg

<103> 물 200㎖

<104> 이상 첨부된 표를 참조하여 본 발명의 실시예를 설명하였으나, 본 발명은 상기 실시예에 한정되는 것이 아니라 다양한 형태로 구현될 수 있으며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

발명의 효과

<105> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 의하면 부작용과 독성이 없고 당뇨/당뇨합병증 억제효능이 뛰어난 체불릭산을 유효성분으로 하는 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물이 제공된다. 이는 천연식물에서 유래되어 안전성이 보강된 것으로, 건강기능식품 소재나 의약품 소재로 널리 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 가자 (Terminalia chebula) 에탄올 추출물에서 당뇨/당뇨합병증 발병 및 진행의 중요한 인자인 최종당화산물(advanced glycation end-products AGE) 생성 억제능이 있는 주요활성 분획(TC-0, TC-3, TC-3-4 및 TC-3-4-3)과 단일물질인 체불릭산의 추출·분리·정제 과정을 보여주는 모식도이다.

<2> 도 2A는 가자 추출물로부터 얻은 당뇨/당뇨합병증 억제 활성물질의 분자량을 FAB-MS (fast-atom bombardment mass)를 이용하여 측정한 것이고, 도 2B는 상기 당뇨/당뇨합병증 억제 활성물질인 체불릭산의 구조를 나타내는 도면이다.

<3> 도 3은 체불릭산이 가지는, 최종당화산물에 의해 발생하는 활성산소를 제거하는 능력을 농도별로 나타내는 도면이다.

<4> 도 4는 체불릭산이 가지는, 최종당화산물에 의한 혈관내피세포의 투과도 변화를 억제시키는 능력을 농도별로 나타내는 도면이다.

<5> 도 5는 체불릭산이 가지는, 최종당화산물에 의한 혈관내피세포(HUVEC)에 혈구세포(THP-1)의 부착을 억제시키는 능력을 농도별로 나타내는 도면이다.

<6> 도 6은 흰쥐에 당뇨 유발 후 본 발명의 체불릭산을 포함하는 분획물을 8주 투여한 뒤 각 실험군에서 혈액의 AST 및 ALT를 측정한 결과를 나타내는 도면이다.

<7> 도 7은 흰쥐에 당뇨 유발 후 체불릭산을 포함하는 분획물을 8주 투여한 뒤 각 실험군에서 당뇨에 의한 비알콜성 지방간의 예방 및 억제 효과를 측정한 도면이다.

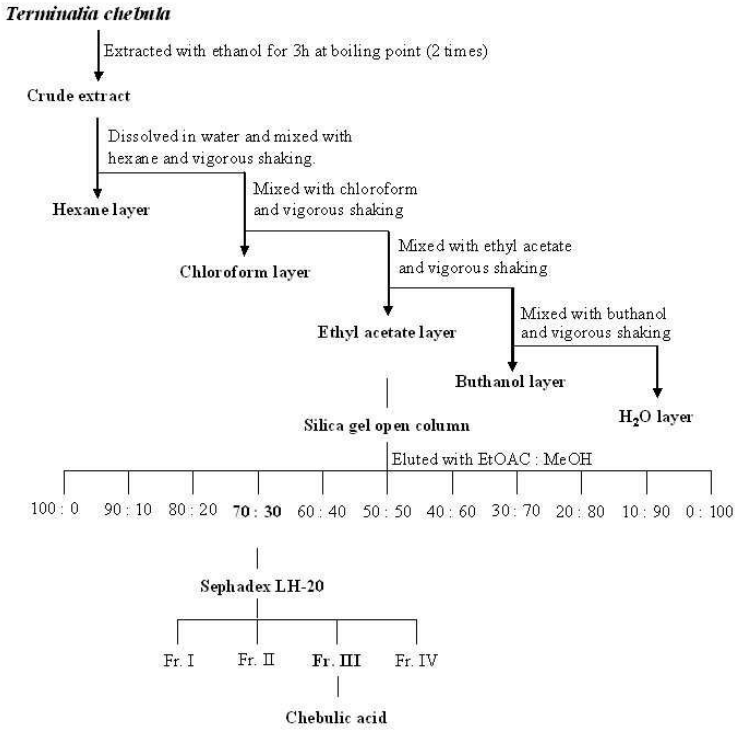
<8> 도 8은 흰쥐에 당뇨 유발 후 체불릭산을 포함하는 분획물을 8주 투여한 뒤 각 실험군에서 당뇨에 의한 백내장의 예방 효과를 측정한 도면이다.

<9> 도 9는 흰쥐에 당뇨 유발 후 체불릭산을 포함하는 분획물을 8주 투여한 뒤 각 실험군에서 당뇨에 의한 동맥경화 억제효과를 측정한 도면이다.

도면

도면1

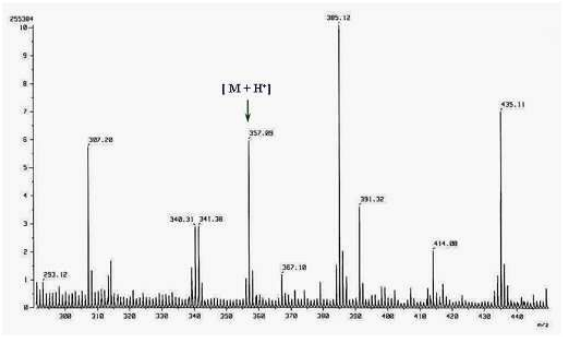
도 1. 가자(Terminalia chebula) 추출물로부터 chebulic acid의 분리공정도



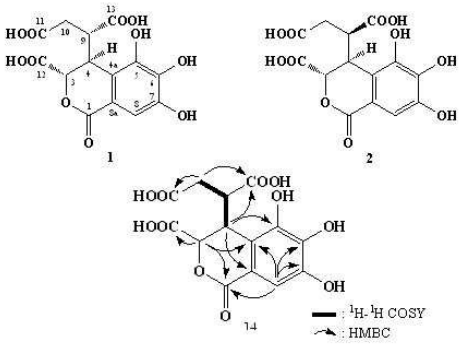
도면2

도 2. 가자로부터 정제한 항당뇨합병증 활성물질의 fast atom bombardment mass spectrum을 이용한 분자량 (A) 및 구조(B)

A

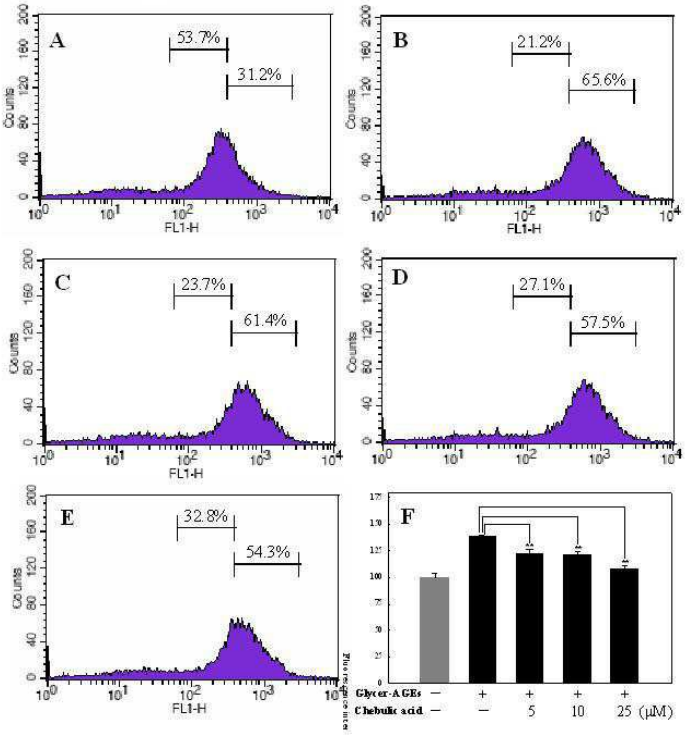


B



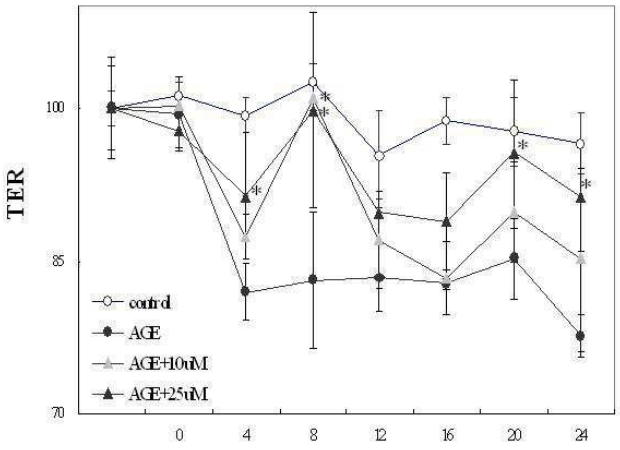
도면3

도 3. Chebulic acid의 당뇨합병증원인물질(glyceraldehyde-AGEs)에 의한 활성산소 제거능.



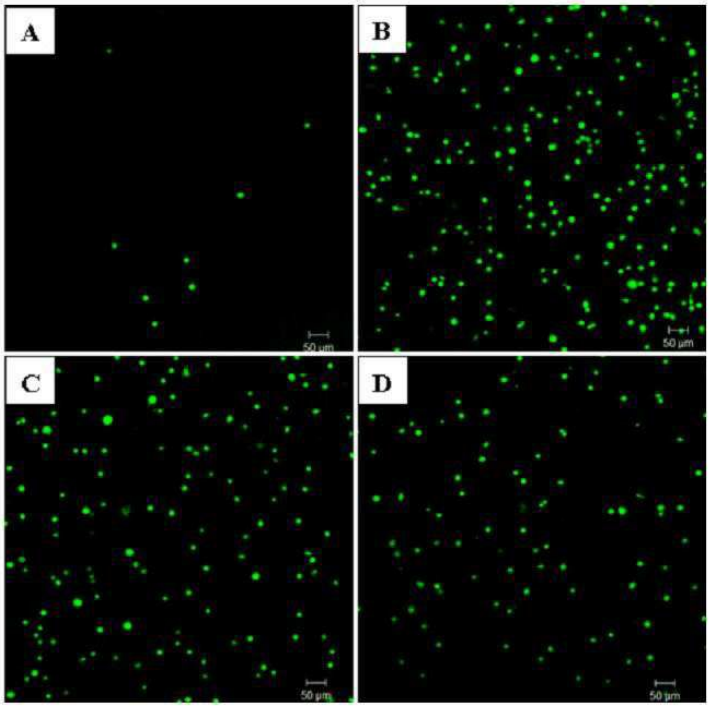
도면4

도 4. Chebulic acid의 당뇨합병증원인물질(glyceraldehyde-AGEs)에 의한 혈관내피세포에서의 투과변화에 미치는 영향.



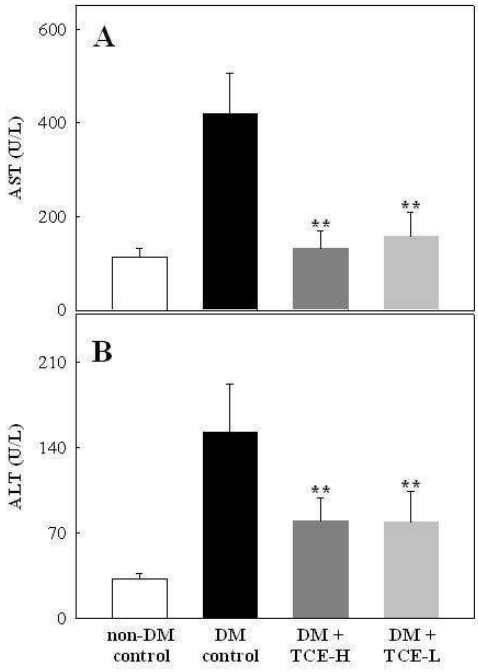
도면5

도 5. Chebulic acid와 당뇨합병증원인물질(glyceraldehyde-AGEs)에 의한 혈관내피세포에 모노사이트 부착에 미치는 영향.



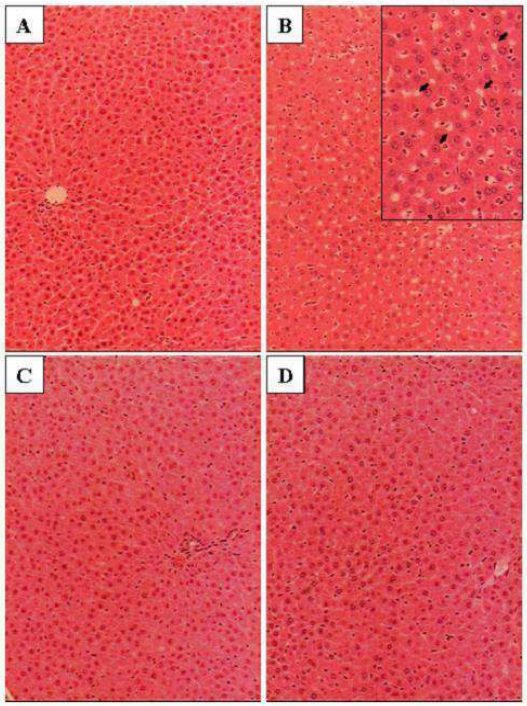
도면6

도 6. Serum AST and ALT levels of in control, diabetic untreated and diabetic treated rat at the end of 8 weeks.



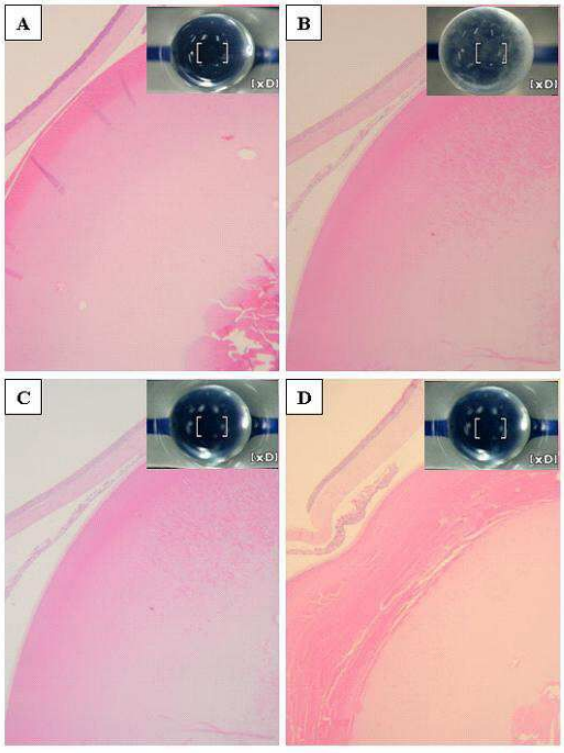
도면7

도 7. Histopathological findingby H&E staining of liver.



도면8

도 8. Histopathological finding of cataract by H & E staining of eye lens.



도면9

도 9. Expression of ICAM-1 mRNA on thoracic aorta.

