



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0081417

(43) 공개일자 2022년06월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/352 (2006.01) A23K 20/121 (2016.01)

A23K 20/147 (2016.01) A23L 33/10 (2022.01)

A23L 33/17 (2016.01) A61K 38/22 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01) A61P 3/00 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/352 (2013.01)

A23K 20/121 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2020-0170276

(22) 출원일자 2020년12월08일

심사청구일자 2020년12월08일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

장형진

서울특별시 강남구 도곡로 306, 105동 1502호(도곡동, 래미안그레이튼)

(74) 대리인

특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 11 항

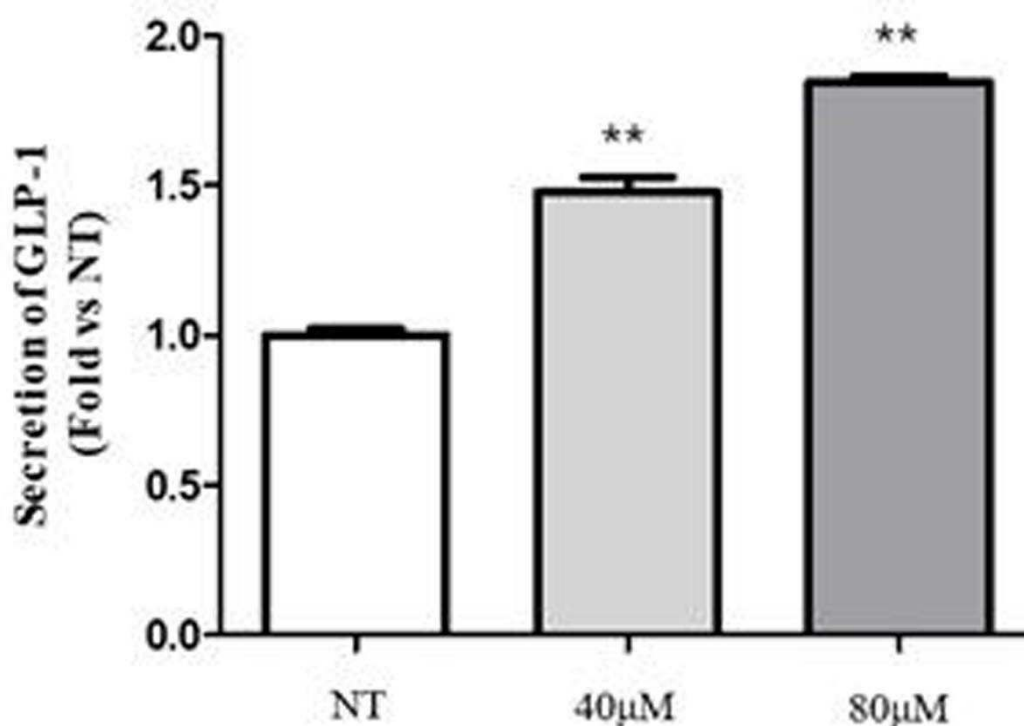
(54) 발명의 명칭 대사성 질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 대사성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 아이소시넨세틴 또는 이의 염을 포함하는 대사성 질환 예컨대 당뇨, 비만, 지방간 등의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학적 조성물, 건강기능식품 조성물 및 사료 조성물을 제공한다. 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 하기

(뒷면에 계속)

대표도 - 도6a



화학식 1의 아이소시넨세틴(isosinensetin) 또는 이의 염을 포함하는 조성물이 GLP-1의 분비를 유도하여 당뇨 또는 인슐린 저항성을 효과적으로 개선시키며, 간 내 콜레스테롤의 축적 억제 또는 중성지방의 분해를 유도할 수 있음을 확인하였으며, 아이소시넨세틴을 이용하는 경우 짧은 반감기를 갖는 혈당강화제를 보완하면서 동시에 대사성 질환을 개선시킬 수 있는 효과가 있음을 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 조성물은 대사성 질환 예컨대 당뇨, 비만, 지방간, 고혈압 또는 고지혈증의 예방, 개선 또는 치료를 위한 의약품, 건강기능식품, 사료 등에 널리 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

(52) CPC특허분류

A23K 20/147 (2016.05)

A23L 33/10 (2022.01)

A23L 33/17 (2016.08)

A61K 38/2278 (2013.01)

A61P 1/16 (2018.01)

A61P 3/00 (2018.01)

A61P 9/12 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

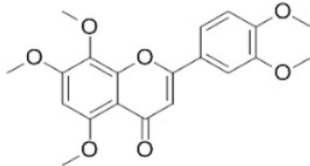
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 아이소시넨세틴(isosinensetin) 또는 이의 염을 포함하는, 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 엑센딘 4(Exendin-4)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 대사성 질환은 당뇨, 비만, 지방간, 고혈압 및 고지혈증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 GLP-1 또는 GLP-1R의 발현을 증진시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

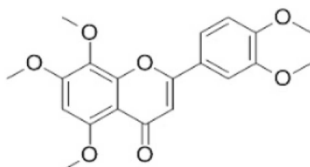
제1항에 있어서,

상기 조성물은 지방세포의 지질 축적을 억제하거나 지방세포의 분해를 촉진하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

하기 화학식 1의 아이소시넨세틴(isosinensetin) 또는 이의 염을 포함하는, 대사성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

[화학식 1]



청구항 7

제6항에 있어서,

상기 조성물은 엑센딘 4(Exendin-4)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 건강기능식품 조성물.

청구항 8

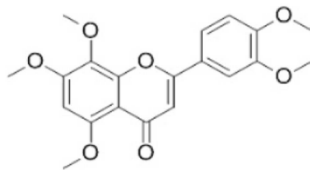
제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 대사성 질환은 당뇨, 비만, 지방간, 고혈압 및 고지혈증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 건강기능식품 조성물.

청구항 9

하기 화학식 1의 아이소시넨세틴(isosinensetin) 또는 이의 염을 포함하는, 대사성 질환의 예방 또는 개선용 사료 조성물.

[화학식 1]



청구항 10

제9항에 있어서,

상기 조성물은 엑센딘 4(Exendin-4)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 사료 조성물.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서,

상기 대사성 질환은 당뇨, 비만, 지방간, 고혈압 및 고지혈증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 사료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 대사성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 대사성 질환 예컨대 당뇨, 비만, 지방간 등의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학적 조성물, 건강기능식품 조성물 및 사료 조성물을 제공한다.

배경 기술

[0002] 최근 경제 발전에 따른 생활 수준의 향상으로 음식문화가 서구화되고 있으며 고열량 위주의 식단, 편의생활에 의한 활동량의 감소와 체중 증가 그리고 사회의 복잡성 등으로 인해 동맥경화, 고혈압, 암, 비만 및 당뇨병 등의 만성 퇴행성 질환 환자 인구가 급속히 늘고 있다. 서구에서는 과체중을 포함하여 비만 인구가 70%에 이르는 보고가 있으며 우리나라에서도 성인 인구의 25%가 과체중 또는 비만이라는 것이 보고되고 있다.

[0003] 당뇨병은 고혈당을 특징으로 하는 만성적인 병으로, 비만과 함께 그 환자 수가 빠른 속도로 증가할 뿐만 아니라 그 유병 연력이 점차 낮아지고 있어 더욱 심각하다. 당뇨병은 체내 대사의 이상으로 인해 고혈당 상태가 오랜 시간 지속됨으로써 뇌혈관 합병증, 심장질환, 신장질환 등의 만성 합병증이 발생하게 되는 질환으로서, 이에 따라 국내에서도 관상동맥 질환과 혈압 저하와 같은 당뇨 합병증을 억제하는 천연물 소재의 항 당뇨기능성 물질 연구 개발이 이루어지고 있는 실정이다.

[0004] 비만이란 열량의 섭취와 소비의 불균형으로 발생하는 대사성 질환이며 비만 유병률의 증가와 더불어 비알코올성 지방간질환의 유병률 또한 국가마다 차이가 있지만 서구에서는 전체 인구의 약 20~30%로 보고하고 있다. 과잉된 열량으로 인해 지방 조직이 비정상적으로 증가되어 여러 질환의 원인으로 작용하는데 비알코올성 지방간 질환은

인슐린 저항성을 근간으로 한 비만, 제2형 당뇨병 등을 포함한 대사증후군과 밀접한 연관성을 보인다. 실제로 제2형 당뇨병 환자에서 비알코올성 지방간이 동반되는 경우가 많고 이러한 환자에서 간경변증과 간암으로 진행되는 비율이 높은 것으로 보고되었다.

[0005] 지방간은 크게 콜레스테롤 지방간과 중성지방 지방간으로 분류하는데, 가장 일반적인 지방간은 정상적인 지질대사가 이루어지지 못함으로써 중성지방이 간 내에 비정상적으로 축적된 경우의 지방간이다. 그리고 지방간의 원인에 따라 구분할 때는 알코올성 지방간과 비알코올성 지방간으로 구분하기도 한다. 비알코올성 지방간 질환에 서는 대부분 인슐린 저항성, 비만, 당뇨병 및 고지혈증을 동반하고 있다. 이러한 합병증이 존재하는 경우에는, 우선 그 치료를 실시하는 것이 필요하며, 현재 대사성 질환과 관련된 신규한 치료 물질을 발굴하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0006] 한편, 제2형 진성 당뇨병 (T2DM) 치료에 사용되는 Bupleurum falcatum L. (BF)은 주요한 활성 성분으로 아이소시넨세틴(ISS, [C₂₀H₂₀O₇])을 포함하고 있다. 시넨세틴의 구조이성질체인 아이소시넨세틴은 항염증 및 항산화 효과가 있는 것으로 알려져 있으며(Food Funct. 2020 Sep 23;11(9):8214-8236), 플라보노이드 계열에 속하지만, 아이소시넨세틴의 대사성 질환 개선 또는 치료 효과에 대해서는 아직까지 연구가 미미한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 아이소시넨세틴 처리에 따른 대사성 질환 치료 용도를 연구한 결과, 대장암 세포 또는 장 내분비 L 세포에 아이소시넨세틴을 처리하는 경우 GLP-1의 분비를 유도하여 당뇨 또는 인슐린 저항성을 효과적으로 개선시키며, 간 내 콜레스테롤의 축적 억제 또는 중성지방의 분해를 유도하여 항당뇨, 항비만 또는 지방간 개선효과를 증가시킬 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

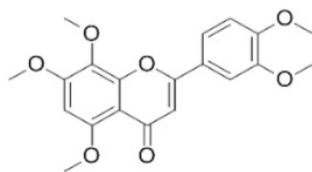
[0008] 이에, 본 발명은 아이소시넨세틴(isosinensetin) 또는 이의 염을 포함하는, 대사성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물, 건강기능식품 조성물 및 사료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1의 아이소시넨세틴(isosinensetin) 또는 이의 염을 포함하는, 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] [화학식 1]



[0013]

[0014] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 아이소시넨세틴(isosinensetin) 또는 이의 염을 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물 및 사료 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일구현예로, 상기 조성물은 엑센딘 4(Exendin-4)를 더 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 대사성 질환은 당뇨, 비만, 지방간, 고혈압 및 고지혈증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 GLP-1 또는 GLP-1R의 발현을 증진시킬 수 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 지방세포의 지질 축적을 억제하거나 지방세포의 분해를 촉진할 수 있다.

발명의 효과

[0019]

본 발명자들은 아이소시넨세틴(isosinensetin) 또는 이의 염을 포함하는 조성물이 GLP-1의 분비를 유도하여 당뇨병 또는 인슐린 저항성을 효과적으로 개선시키며, 간 내 콜레스테롤의 축적 억제 또는 중성지방의 분해를 유도할 수 있음을 확인하였으며, 아이소시넨세틴을 이용하는 경우 짧은 반감기를 갖는 혈당강화제를 보완하면서 동시에 대사성 질환을 개선시킬 수 있는 효과가 있음을 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 조성물은 대사성 질환 예컨대 당뇨병, 비만, 지방간, 고혈압 또는 고지혈증의 예방, 개선 또는 치료를 위한 의약품, 건강기능식품, 사료 등에 널리 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0020]

도 1은 NCI-H716 세포에서 아이소시넨세틴의 분자 구조 및 세포 생존력을 나타낸 것으로, 도 1a는 아이소시넨세틴(5,7,8,3',4'-펜타메톡시플라본)의 구조를 나타낸 것이고, 도 1b는 NCI-H716 세포에서 25, 50, 80, 100 및 200 μ M의 아이소시넨세틴 처리에 따른 용량 의존적인 세포 생존력을 나타낸 것이다.

도 2는 아이소시넨세틴에 노출된 NCI-H716 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가를 확인한 것으로, 도 2a는 아이소시넨세틴을 처리하는 경우 Ca^{2+} 농도가 아이소시넨세틴의 용량 의존적으로 증가했음을 확인한 결과이고, 도 2b는 U73122를 이용해 PLC 의존적 프로세스임을 확인한 것이고, 도 2c는 IP3 유도 Ca^{2+} 방출의 억제제인 2-APB를 사용하여 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 아이소시넨세틴 처리에 따른 NCI-H716 세포에서의 hTAS2R mRNA 발현 프로파일링 결과로서, 25개의 hTAS2R 및 Ga-gustducin(GNAT3)의 발현 수준을 GAPDH의 발현 수준으로 정규화 한 다음 hTAS2R의 발현 수준을 Ga-gustducin을 인코딩하는 GNAT3의 발현 수준과 비교한 결과를 나타낸 것이다(실험은 세 번 수행되었고 각 조건에 대해 세 번 반복하였다. 값은 평균 $\pm$ SEM으로 표시하였다).

도 4는 아이소시넨세틴에 의해 활성화된 Ca^{2+} 반응이 hTAS2R50 및 GNAT3에 대한 siRNA에 의해 차단됨을 확인한 것으로서, 도 4a는 hTAS2R50 단백질 수준의 siRNA 매개 감소를 확인한 것이고, 도 4b 및 4c는 아이소시넨세틴으로 유도된 세포 내 Ca^{2+} 농도에 대한 TAS2R50 및 GNAT3 녹다운의 효과를 나타낸 것이다(통계 분석은 unpaired t-test (one-tailed)로 수행되었으며, 값은 평균 $\pm$ SEM으로 표현하였다. #p <0.5 vs. siRNA 대조군; n = 5).

도 5는 아이소시넨세틴 처리에 따른 GLP-1 전구체의 mRNA 및 프로글루카곤의 발현을 확인한 것으로, 도 5a는 프로글루카곤의 발현이 아이소시넨세틴의 용량 의존적으로 증가됨을 확인한 것이고, 도 5b는 프로글루카곤의 mRNA 발현이 hTAS2R50 및 GNAT3의 siRNA-매개 녹다운을 갖는 아이소시넨세틴으로 처리된 NCI-H716 세포에서 유의하게 감소된 것을 확인한 결과를 나타낸 것이다(통계 분석은 unpaired t-test (one-tailed)로 수행되었으며, 값은 평균 $\pm$ SEM으로 표현하였다. ** p <0.5 vs. NT, ## p <0.01, #p <0.5 vs. siRNA 대조군).

도 6은 NCI-H716 세포에서 아이소시넨세틴에 의해 유도된 GLP-1의 분비를 확인한 것으로, 도 6a는 용량 의존적 방식으로 아이소시넨세틴을 처리하는 경우 NCI-H716 세포로부터 GLP-1이 방출됨을 확인한 것이고, 도 6b는 GLP-1 분비에 따른 siRNA 매개 감소를 나타낸 것이고, 도 6c는 IP3R 억제제를 나타낸 것이고, 도 6d는 PLC 의존적 프로세스 억제제를 나타낸 것이다(통계 분석은 unpaired t-test (one-tailed)로 수행되었으며, 값은 평균 $\pm$ SEM으로 표현하였다. ** p <0.01 vs. NT, ## p <0.01 vs. siRNA 대조군).

도 7은 아이소시넨세틴 처리에 따른 3T3-L1 지방 세포의 지질 축적 효과를 확인한 것이다(값은 평균 $\pm$ S.E.M.로 표현하였다. *** p <0.001 vs NT, ### p <0.001 ## p <0.01 vs 대조군).

도 8은 ATGL, pHSL의 상대적 발현 수준을 정량화 한 것으로 ATGL의 발현은 β -액틴에 대해 정규화시켰으며, pHSL의 발현은 HSL에 대해 정규화시켰다(값은 평균 $\pm$ S.E.M.로 표현하였다. ** p <0.001 vs NT, ## p <0.01 #p <0.5 vs 대조군).

도 9는 웨스턴 블롯으로 HepG2 세포에서 아이소시넨세틴 또는 엑시딘 4 처리에 따른 GLP-1R의 발현 향상을 확인한 것이다(통계적 유의성은 unpaired t-test (one-tailed)에 의해 수행되었으며, 값은 평균 $\pm$ SEM으로 표현하였다. ** P <0.01 대 NT. ** p <0.001 vs NT, ## p <0.01 #p <0.5 vs 대조군).

도 10은 아이소시넨세틴 처리에 따른 비만 마우스의 체중과 혈당 수치변화를 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 발명자들은 아이소시넨세틴 처리에 따른 대사성 질환 치료 용도를 연구한 결과, 대장암 세포 또는 장 내분비 L 세포에 아이소시넨세틴을 처리하는 경우 GLP-1의 분비를 유도하여 당뇨 또는 인슐린 저항성을 효과적으로 개선시키며, 간 내 콜레스테롤의 축적 억제 또는 중성지방의 분해를 유도하여 항당뇨, 항비만 또는 지방간 개선효과를 증가시킬 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0022] 이에, 본 발명은 아이소시넨세틴(isosinensetin) 또는 이의 염을 포함하는, 대사성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물, 건강기능식품 조성물 및 사료 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 대사성 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0024] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"이란 본 발명의 따른 조성물의 투여로 대사성 질환의 정도를 감소시키거나, 증상을 경감시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0025] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 대사성 질환에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0026] 본 발명에서 사용되는 용어 "대사성 질환"은 생체 내 물질대사 장애에 의해서 발생하는 질환을 의미하며, 본 발명에서 대사성 질환은 당뇨, 비만, 지방간, 고혈압 및 고지혈증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 "아이소시넨세틴"은 화학식 C₂₀H₂₀O₇으로 구성되고, 6-Demethoxynobiletin 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one 5,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone으로 통칭되며 하기 [화학식 1]의 구조를 갖는 화합물을 의미한다.
- [0028] [화학식 1]
-
- [0029]
- [0030] 본 발명에 따른 [화학식 1]로 표시되는 아이소시넨세틴은 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적 또는 식품학적으로 허용되는 다양한 유기산 또는 무기산에 의해 형성된 산 부가염을 사용할 수 있다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 다이카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻을 수 있다. 이러한 무독성 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피온산, 옥살산, 말론산, 숙신산, 수베레이트, 세바케이트, 푸마렐트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디온산, 벤조산, 클로로벤조산, 메틸벤조산, 디니트로 벤조산, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조산, 프달산, 테레프달레이트, 벤젠설폰산, 톨루엔설폰산, 클로로벤젠설폰산, 크실렌설폰산, 페닐아세트산, 페닐프로피온산, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설폰네이트, 프로판설폰네이트, 나프탈렌-1-설폰네이트, 나프탈렌-2-설폰네이트, 만델레이트, 트라이플루오로아세트산 등을 사용하여 제조할 수 있다.
- [0031] 이때, 본 발명에 따른 상기 산 부가염은 통상의 방법, 예를들면 [화학식 1]의 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기용매, 예를들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세트니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.
- [0032] 또한, 본 발명에 따른 [화학식 1]로 표시되는 아이소시넨세틴은 염기를 사용하여 약학적 또는 식품학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면, 화합물을 과량의 알칼리

금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 리튬, 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예를들면, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0033] 본 발명에 따른 조성물은 GLP-1 또는 GLP-1R의 발현을 증진시킬 수 있으며, 지방세포의 지질 축적을 억제하거나 지방세포의 분해를 촉진할 수 있다.

[0034] 본 발명은 구체적인 실시예를 통해 아이소시넨세틴을 포함하는 조성물이 GLP-1 또는 GLP-1R의 발현을 증진시키고, 지방세포의 지질 축적을 억제하거나 지방세포의 분해를 촉진함으로써 대사성 질환을 개선시킬 수 있음을 확인하였다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에서는 아이소시넨세틴을 처리하는 경우 용량에 의존적으로 GLP-1 수준이 증가됨을 확인하였으며(실시예 7 참조), 아이소시넨세틴을 처리하거나 아이소시넨세틴과 엑센딘을 병용 처리하는 경우 GLP-1R의 발현이 증가하는 것을 확인하였으며(실시예 10 참조), 3T3-L1 지방 세포에 아이소시넨세틴을 처리하여 지방축적을 억제하는 효과(실시예 8 참조) 및 ATGL 및 pHSL 등의 발현 수준을 증가시키는 등 지방 분해 효과가 우수하게 나타나는 것을 확인하였다(실시예 9 참조).

[0036] 상기 실시예의 결과로부터 아이소시넨세틴이 GLP-1 또는 GLP-1R의 발현을 증진시킬 수 있으며, 지방세포의 지질 축적을 억제하거나 지방세포의 분해를 촉진할 수 있음을 확인하였으며, 이에 본 발명에 따른 아이소시넨세틴을 포함하는 조성물은 대사성 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 의약품, 건강기능식품, 사료 등에 유용하게 이용될 수 있다.

[0037] 본 발명에 따른 조성물이 약학적 조성물의 형태인 경우, 약학적으로 유효한 양의 아이소시넨세틴을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이때, 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성 셀룰로스, 폴리비닐 피로리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0038] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여 (예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환측의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0039] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환측 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0040] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환측의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수율, 불활성율 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 1 내지 500 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감 될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0041] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 대사성 질환의 치료 방법을 제공한다.

[0042] 본 발명에서 "개체"는 쥐, 가축, 생쥐, 인간 등 포유류일 수 있으며, 구체적으로 항암치료가 필요한 반려견, 경주마, 인간 등일 수 있고, 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0043] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물의 대사성 질환의 치료 용도를 제공한다.

- [0044] 본 발명에 따른 조성물이 건강기능식품 조성물의 형태로 이용되는 경우, 특정보건용 식품, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학 및 의료 효과가 높은 식품으로 제조 될 수 있으며, 상기 식품은 경우에 따라, 기능성식품, 건강식품, 건강보조식품으로 혼용될 수 있으며, 유용한 효과를 얻기 위하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 건강기능식품은 식품 조성물에 통상적으로 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예들 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 디히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시 톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팡창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 첨가할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 건강기능식품을 식품 첨가물로 사용할 경우, 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 건강기능식품에 있어서, 아이소시넨세틴의 함량은 특별히 제한되지 않으며, 투여 대상의 상태, 구체적인 병증의 종류, 진행 정도 등에 따라 다양하게 변경될 수 있다. 필요한 경우, 식품의 전체 함량으로도 포함될 수 있다.
- [0048] 본 발명에 따른 조성물이 사료용 조성물로 이용되는 경우, 개 또는 고양이 사료용일 수 있다. 이에 한정되는 것은 아니며, 개, 고양이 등 다양한 반려동물에 적용할 수도 있다.
- [0049] 본 발명의 사료 조성물은, 기능성 물질을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 기능성 물질은 DHA, EPA, 알로에, 스쿠알렌, 옥수수수염, 가르시니아캄보지아, 히비스커스, 대나무잎, 클로렐라, 스피루리나, 부추, 녹차, 둥글레, 감잎, 뽕잎, 작설, 현미, 보리, 루이보스, 보이, 및 결명자 중에서 선택된 어느 하나 이상을 사용할 수 있다. 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 기능성 물질은 사료조성물 전체 중량 대비 0.1~10 중량부가 되도록 첨가할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 사료조성물은 종래 사료조성물에 첨가되는 성분을 더 포함할 수 있다. 이러한 사료조성물에 첨가되는 성분의 일례로서 곡류분말, 고기분말, 및 두류 등을 포함할 수 있다.
- [0051] 상기에서 고기분말은 이에 한정되는 것은 아니나, 닭고기, 소고기, 돼지고기, 및 타조고기 중에서 선택된 어느 하나 이상을 분말화한 고기분말을 사용할 수 있다.
- [0052] 상기에서 두류는 이에 한정되는 것은 아니나, 대두, 강낭콩, 완두콩, 및 검은콩 중에서 선택된 어느 하나 이상을 사용할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 사료조성물은 상기에서 언급한 종래 사료 조성물에 첨가되는 성분인 곡류분말, 고기분말, 및 두류 이외에도 사료의 영양성을 증대시키기 위해 영양제, 및 무기물 중에서 선택된 어느 하나 이상을 첨가할 수 있으며, 사료 품질의 저하를 막기 위해 항곰팡이제, 항산화제, 항응고제, 유화제, 및 결착제 중에서 선택된 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0055] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0057] [실시예]
- [0058] 실시예 1. 재료 및 방법

[0059] 1-1. 재료준비

[0060] 아이소시넨세틴(isosinensetin, ISS)은 ChemFaces(Wuhan ChemFaces Biochemical Co., Ltd., China)에서 구입하였다. 2-APB(10 μ M) 및 U73122(10 μ M)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. MTT(3-(4,5-디메틸-2-티아 졸릴)-2,5-디 페닐-[2H]-테트라 졸륨 브로마이드)는 Invitrogen (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다.

[0062] 1-2. 세포배양

[0063] 인간 장 내분비 NCI-H716 세포(ATCC[®] CCL-251)는 ATCC(American Type Culture Collection, VA, USA)에서 입수하였다. NCI-H716 세포는 10 % 소 태아 혈청(FBS; Gibco, Grand Island, NY, USA) 및 항생제 항진균제 용액(ABAM; Corning Inc.)이 보충된 RPMI 1640(Corning Inc., NY, USA)에서 37°C, 5 % CO₂ 환경으로 배양되었다. 내분비 분화를 수행하기 위해 NCI-H716 세포(1×10^6 세포/웰)를 Matrigel(BD Bioscience, USA)로 코팅된 12 웰 플레이트에 분주하고 고-글루코스 DMEM(Corning Inc., NY, USA), 10 % FBS 및 ABAM을 보충하였다. 48시간 후, 배지를 저-글루코스 DMEM으로 교체하고 추가로 16시간 동안 배양하였다. NCI-H716 세포는 크로모그라닌 A를 포함한 여러 신경 내분비 마커를 발현하였다.

[0065] 1-3. MTT 분석

[0066] NCI-H716 세포(1×10^4 세포/웰)를 미리 코팅된 96 웰 플레이트에 분주하고 48시간 동안 내분비 세포의 분화를 유도하기 위해 배양하였다. 세포를 ISS(25, 50, 80, 100 및 200 μ M)로 1시간 동안 처리하여 ISS의 세포 독성을 확인하였다. MTT를 0.5 mg/mL의 최종 농도로 웰에 첨가하고 2시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후, 포르마잔 결정을 DMSO에 용해시키고 마이크로 플레이트 리더(Bio-Rad Hercules, CA, USA)에서 흡광도를 540nm로 기록하였다.

[0068] 1-4. 칼슘 이미징

[0069] 분화된 NCI-H716 세포를 Matrigel로 미리 코팅 된 투명한 바닥 96-웰 블랙 플레이트 (Corning, Tewksbury, MA)에 분주하였다. 실험 전에 배지를 PBS로 교체하고 앞서 설명한대로 fura-2 AM 염료 (최종 농도 1 μ M)로 30분 동안 배양하였다. 이후 배지를 새로운 PBS에서 30분 동안 U73122(10 μ M, Sigma-Aldrich) 및 2-아미노에톡시 디페닐보레이트(2-APB; 10 μ M, Sigma-Aldrich)로 교체하였다. 세포질 유리 칼슘 [Ca²⁺]_i은 Nikon Eclipse TS 100 형광 이미징 시스템(Nikon Instrument Inc., Melville, NY)을 사용하여 관찰하였다. 회전하는 휠 필터에서 340 및 380 nm의 excitation 파장을 교대로 전달하고 InCyt Im2 소프트웨어(Intracellular Imaging; Cincinnati, OH)를 사용하여 이미지를 분석하였다.

[0071] 1-5. 실시간 PCR

[0072] NCI-H716 세포 (1×10^6 세포 / 웰)를 6-웰 플레이트에 분주하고 ISS와 함께 또는 ISS없이 1시간 동안 배양하였다. RNA를 분리하기 위해 GeneAll Hybrid-R RNA Purification Kit를 사용하여 제조사의 지침(GeneAll, Seoul, Korea)에 따라 세포를 Ribo-Ex로 처리하였다. RNA는 NanoDrop 분광 광도계(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 정량화하였다. cDNA 증폭은 Maxime RT 프리믹스 키트 (iNtRON BIOTECHNOLOGY, Seongnam, Korea)를 사용하여 45 °C에서 60 분, 95 °C에서 5분 동안 수행하였다. Applied Biosystems StepOne System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에서 Universal SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 실시간 정량 PCR을 수행하였다. TAS2R 패밀리에 속하는 유전자의 발현 수준을 GAPDH의 발현 수준과 비교하여 정량화하여 mRNA 수준을 결정하였다. 사용된 PCR 프라이머는 하기 [표 1]에 나타내었다.

표 1

	Forward	Reverse
hTAS2R1	GCCCCATGCCTTTATTGTTA	GAGGTGAGACTCTAGCATTT
hTAS2R3	AGTGAGGAGTTCTATGTAT	TGACCAGAATCCCAGTGTG
hTAS2R4	GTGGTTTCTTTGGTCTTGAG	CCTACATGAGCTTCCGTCTG
hTAS2R5	TCGCTTGAAGACAGATTACG	GAGAAATTCACCAGTCCCA
hTAS2R7	ACTCCATCAACTAGA	ACCCAGTCCATGCAGTTAC
hTAS2R8	TTAACCTGTTTGCAATTGTC	TGGCTCTCATGAACTTCT
hTAS2R9	CTGTCATTTTCCCATCAAGC	GGGTCTCTATGGAACAAAAG
hTAS2R10	CATTTCCCTTTGGAGACACA	ATGAGCTTCTGTGTGGAGT
hTAS2R13	AGGAGCAGAAAAAGGAGAAG	GTGAAGATACTCGGCAGCAGGG
hTAS2R14	CCTCACTGCTTTGGCAATCT	ACACACACCAGCTTCCGAAT
hTAS2R16	CCAGGAAGACACTTTGGAGT	TGACTTGCAGCCATTCTCTCTG
hTAS2R19	CGAACCATTTCAGCATGTGG	CCCCAACAGTATCACCAGAA
hTAS2R20	AGATGCGACCAAAAGAAATT	CACCTGCCACAAAAGTAAA
hTAS2R30	TTCAGCTATCCTTCAACCCA	GCCCCTCTTGTGAATCTATG
hTAS2R31	CAGCACCAGGTCCACATAA	GTAAACGGCACATAACAAGA
hTAS2R38	TGGCAACCAGGTCTTTAGAT	ACTCCAGGACTGAAATGAAC
hTAS2R39	ATTACTGGATTGATACCCTGGC	TGTTTTCTTAGTGGAGTTGGAGG
hTAS2R40	TGCCGGCCACTCAGTACAA	ACCGCTTCCAGGCTCTTCTC
hTAS2R41	CCATGCAGAACGACTTTTAC	TTGAGGTTGCTGAAGATGAG
hTAS2R42	ACTGGTAACTGCTCTGAAGG	ATGTGAAGCAAGTCCCACTAG
hTAS2R43	GACCACGAACCCACCTG	ACAAATGTAACCACTACCAG
hTAS2R45	CCTTTGCTGACCAAAATTGTCAT	TAATAATAACACCAGAGCAAAACAA
hTAS2R46	GACCACGAACCCACCTG	ACAAATGTAACCACTACCAG
hTAS2R50	GTTGTCATGGTTAGCAAGGC	GAGTTGAGAGTTTCAGGTCT
hTAS2R60	ACGGAGCTACTGTGAGAAAT	CGGAATCCTGAGGTTGTAAG
GAPDH	CCACTGCCGCATCCTCTTCC	CTCGTTGCCAATAGTGATGAC
Proglucagon	AATCTTGCCACCAGGGACTT	AGTGACTGGCACGAGATGTT

1-6. 웨스턴블롯

NCI-H716 세포(2×10^6 세포 / 웰)를 사전 코팅 된 6- 웰 플레이트에 분주하고 37°C에서 5 % CO₂ 하에서 48시간 동안 배양하였다. 기아 후, 세포를 ISS로 1시간 동안 처리하였다. NCI-H716 세포를 세포 용해 완충액(Cell Signaling, Danvers, MA, USA)으로 용해시켰다. 단백질을 SDS-PAGE(10 %)로 분리하고 PVDF 막으로 이동시켰다. 막을 3 % 소 혈청 알부민(BSA)으로 차단하고 TAS2R50에 대한 1 차 항체와 함께 배양하였다. TAS2R50 폴리클로날 항체와 β -액틴은 각각 Bioss Antibodies(Woburn, MA, USA) 및 Santa Cruz(TX, USA)에서 구입하였다. 단백질 발현 수준은 향상된 화학 발광(ECL) 검출 시스템을 사용하여 개발되었고 ImageQuant LAS 500 이미징 시스템(GE Healthcare Life Sciences, NSW, 호주)을 사용하여 검출하였다. 개별 밴드의 강도는 ImageJ 소프트웨어 (NIH, NY, USA)를 사용하여 계산하였다.

1-7. siRNA 준비 및 형질감염

siRNA의 형질 감염은 제조업체의 프로토콜에 따라 lipofectamine 3000 Reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 수행되었다. G agust(제품명 : 1175215) 및 TAS2R50(제품명 : 259296-1)에 대해 사전 설계된 스크랩 블 된 음성 대조군 siRNA는 Bioneer(대한민국 대전)에서 구입하였다. NCI-H716 세포를 DMEM 배지에 희석된 siRNA 용액과 함께 Matrigel로 코팅된 24 웰 및 96 웰 블랙 플레이트에 분주하고 48시간 동안 배양하였다. 형질 감염 후, 배지를 ISS로 교체하고 세포를 추가로 1시간 동안 배양하였다.

1-8. GLP-1 ELISA

- [0082] NCI-H716 세포 (1×10^6 세포 / 웰)를 12 웰 사전 코팅된 플레이트에 분주하고 DMEM 배지에 희석 된 siRNA 용액에서 48시간 동안 배양하여 분화를 유도하였다. 분화 후, 세포를 30분 동안 U73122 및 2-APB로 전처리하였다. 이후 배지를 80 μ M ISS를 포함하는 DMEM으로 교환하고 세포를 1시간 동안 배양하였다. 인간 GLP1(7-36) 효소 결합 면역 흡착 분석(ELISA) 키트(ab184857)는 Abcam(영국 캠브리지)에서 구입하였다. GLP-1 분석을 위해 상층액을 수집하고 제조자의 프로토콜에 따라 GLP-1 ELISA를 수행하였다.
- [0084] **1-9. 통계 분석**
- [0085] 모든 시험관 내 실험은 적어도 세 번 반복하였다. 데이터는 최소 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SEM을 나타낸다. Graph Pad Prism 5(GraphPad 소프트웨어, 캘리포니아 주 샌디에고)에서 단측 Mann-Whitney U 테스트를 사용하여 통계 분석을 수행하였다. p-값 <0.05는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었고 p <0.01 및 p <0.001은 매우 유의한 것으로 간주되었다.
- [0087] **실시예 2. 세포 생존력 분석**
- [0088] 아이소시넨세틴의 세포 독성을 확인하기 위해, 다양한 농도의 아이소시넨세틴을 NCI-H716 세포 치료에 사용하였다. 세포 생존력은 MTT 분석에 의해 측정하였다.
- [0089] 그 결과, 도 1b에 나타난 바와 같이 세포 생존력 결과는 최대 80 μ M까지 유의한 세포 독성을 나타내지 않았다. 그러나 NCI-H716 세포는 100 μ M 이상의 아이소시넨세틴 농도에서 유의한 세포 독성을 나타냈다.
- [0091] **실시예 3. 아이소시넨세틴 처리에 따른 포스포리파아제 C 경로에 의한 장 내분비 세포 활성화 확인**
- [0092] 아이소시넨세틴이 PLC β 2 경로를 통해 장 내분비 세포의 세포 내 칼슘 농도 증가를 유도하는지 여부를 확인하기 위해 PLC β 2 억제제인 U73122와 2-APB를 사용하여 두 번째 메신저 IP3의 방출을 차단하였다.
- [0093] 그 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이 세포 내 칼슘 농도가 용량 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 도 2b 및 2c에 나타난 바와 같이 아이소시넨세틴 처리 군에 비해 U73122(10 μ M) 또는 2-APB(10 μ M)로 전처리한 NCI-H716 세포에서는 세포 내 칼슘 농도가 감소하는 것을 확인하였다. 상기 결과로부터 아이소시넨세틴이 PLC β 2 신호 전달 캐스케이드를 통해 GLP-1 분비를 촉진한다는 것을 확인하였다.
- [0095] **실시예 4. hTAS2R 유전자 발현 프로파일링 확인**
- [0096] NCI-H716 세포에서 아이소시넨세틴 처리에 따른 hTAS2R 유전자의 발현을 조사하기 위해 실시간 정량 PCR을 사용하여 25개의 쓴맛 수용체 유전자와 Gust-encoding 유전자(GNAT3)의 발현수준을 조사하였다. 25개의 인간 쓴맛 수용체의 mRNA 발현수준을 GAPDH의 mRNA 발현수준으로 정규화한 다음 GNAT3의 발현과 비교하였다.
- [0097] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 TAS2R1을 제외하고 미각 수용체 예컨대 hTAS2R8, hTAS2R43, hTAS2R45, hTAS2R46 및 hTAS2R50이 다른 수용체보다 훨씬 높게 나타나는 것을 확인하였다. 상기 결과로부터, 아이소시넨세틴에 의한 hTAS2R50의 높은 발현수준이 GLP-1의 분비와 관련될 수 있음을 확인하였다.
- [0099] **실시예 5. hTAS2R50 억제로 인한 아이소시넨세틴에 의한 포스포리파아제 C 경로 억제 확인**
- [0100] hTAS2R50이 아이소시넨세틴 유도 GLP-1 분비에 관여했는지 확인하기 위해 NCI-H716 세포에서 siRNA 형질 감염을 통해 hTAS2R50을 억제한 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이 음성 siRNA 대조군과 비교하여 si-hTAS2R50에서 TAS2R50의 감소되는 것을 확인하였다.
- [0101] 이에 더하여, GLP-1 분비에 의해 α -gustducin 및 TAS2Rs 발현 및 세포 내 칼슘 농도의 증가와 양의 상관관계가 있는지 확인한 결과, 도 4b에 나타난 바와 같이 아이소시넨세틴 처리군에 비해 Si-GNAT3 및 hTAS2R50 모두에서 세포 내 칼슘 농도가 감소된 것을 확인하였다. 또한, 도 4c에 나타난 바와 같이 다른 농도의 아이소시넨세틴으로 실험을 수행했을 때에도 유사한 결과가 얻어지는 것을 확인하였다. 상기 결과로부터, hTAS2R50이 PLC β 2 신

호 전달 캐스케이드를 통해 GLP-1 분비에 관여한다는 것을 유추할 수 있다.

[0103] 실시예 6. 아이소시넨세틴 처리에 따른 프로글루카곤을 코딩하는 GLP-1의 분비 자극 확인

[0104] 아이소시넨세틴을 처리가 프로글루카곤을 코딩하는 GLP-1의 발현을 조절할 수 있는지 확인하기 위해, 실시간 PCR 분석을 통해 확인한 결과, 도 5a에 나타난 바와 같이 프로글루카곤을 코딩하는 글루카곤, GLP-1 및 GLP-2의 mRNA 발현이 아이소시넨세틴의 용량 의존적으로 유의하게 상향 조절되었음을 확인하였다. 또한 도 5b에 나타난 바와 같이 siRNA 대조군과 비교하여 si-Gagust 및 si-hTAS2R50 그룹 모두에서 proglucagon의 발현이 크게 감소한 것을 확인하였다. 상기 결과로부터 Gagust 발현이 hTAS2R50 신호 전달 경로와 관련이 있고 PLCβ2 경로가 GLP-1 분비와 관련이 있음을 유추할 수 있다.

[0106] 실시예 7. 아이소시넨세틴 처리에 따른 hTAS2R50 자극 및 GLP-1 분비 유도 확인

[0107] GLP-1 ELISA 키트를 사용하여 NCI-H716 세포에서 GLP-1 분비를 확인한 결과, 도 6a에 나타난 바와 같이 GLP-1의 수준이 아이소시넨세틴 비 처리 세포와 비교하여 아이소시넨세틴 처리 세포에서 용량 의존적 방식으로 증가했음을 확인하였다. 또한, 아이소시넨세틴에 의해 활성화된 hTAS2R50 및 GLP-1 분비와의 상관관계를 확인하기 위해, 신호 서열을 표적으로 하는 siRNA를 형질감염하여 Gagust 및 hTAS2R50의 발현을 차단하였다. 그 결과, 도 6b에 나타난 바와 같이 Gagust와 hTAS2Rs 모두 분화된 NCI-H716 세포에서 GLP-1 분비와 상관 관계가 있음을 확인하였으며, 결과적으로, 아이소시넨세틴 처리군 및 siRNA 대조군에 비해 si-Gagust뿐만 아니라 si-hTAS2R50 군에서도 GLP-1 수준이 감소하는 것을 확인하였다.

[0108] 이에 더하여, Gβγ 매개 신호 전달 경로와 GLP-1 분비 사이의 관계를 추가로 확인하기 위해 U73122 및 2-APB를 사용하였다. 그 결과, 도 6c 및 6d에 나타난 바와 같이, U73122 및 2-APB 처리 군에서 GLP-1 수치는 감소했지만 쓴맛 억제제가 100% 효과적이지 않기 때문에 미처리 군의 GLP-1 수치에 비해 더 높게 나타나는 것을 확인하였다. 상기 결과로부터 아이소시넨세틴 활성화 TAS2R50이 Gβγ 매개 신호 전달 캐스케이드를 통해 GLP-1 분비와 관련이 있음을 유추할 수 있다.

[0110] 실시예 8. 아이소시넨세틴 처리에 따른 3T3-L1 지방 세포의 지질 축적 억제 확인

[0111] 아이소시넨세틴이 3T3-L1 지방 세포의 지질 축적을 억제하는지 확인하기 위해, 3T3-L1 세포를 각 농도에서 48시간 동안 아이소시넨세틴으로 처리한 후 인슐린 (1 μM)과 함께 48시간 동안 배양하였다.

[0112] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 아이소시넨세틴의 처리 용량에 의존적으로 지방축적이 억제되는 것을 확인하였다.

[0114] 실시예 9. 아이소시넨세틴 처리에 따른 3T3-L1 지방 세포의 지방 분해 효과 확인

[0115] 아이소시넨세틴 처리에 따라 성숙한 3T3-L1 지방 세포의 지방 분해에 대한 효과를 확인하기 위해, ATGL 및 pHSL의 상대적 발현 수준을 정량화하였다. 이때, ATGL의 발현은 β-액틴에 대해 정규화하였으며, pHSL의 발현은 HSL에 대해 정규화하였다.

[0116] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 아이소시넨세틴의 처리 용량에 의존적으로 P-HSL/1HSL ratio가 증가되는 것을 확인하였으며, ATG/β-actin의 발현이 증가되는 것을 확인하였다. 상기 결과로부터 아이소시넨세틴의 처리 용량에 의존적으로 지방 분해 효과가 우수한 것을 확인하였다.

[0118] 실시예 10. 아이소시넨세틴 또는 엑센딘 4 처리에 따른 GLP-1R 발현 증가 확인

[0119] 아이소시넨세틴 또는 엑센딘 4 처리에 따른 GLP-1R 발현 정도를 확인하기 위해, HepG2 세포에서 농도별 아이소시넨세틴을 단독으로 처리한 경우, 농도별 엑센딘 4를 단독으로 처리한 경우 및 아이소시넨세틴과 엑센딘 4를 농도별로 처리한 경우의 GLP-1R의 발현량을 확인하였다. 이때 단순 지방증을 유도하기 위해 HepG2 세포에 FFA를 48시간 동안 처리하였다.

[0120] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이 아이소시넨세틴이 HepG2 세포에서 GLP-1R의 발현을 향상시키는 것을 확인하였다. 또한, 엑센딘 4를 단독으로 사용하는 경우 오히려 적은 용량에서 GLP-1R의 발현이 감소되었다가 다시 증가하는 경향을 나타냈으나, 엑센딘 4(Ex-4) 및 아이소시넨세틴의 조합으로 처리된 경우 HepG2 세포에서 GLP-1R 발현이 증가되는 것을 확인하였다.

[0122] **실시예 11. 아이소시넨세틴 또는 엑센딘 4 처리에 따른 체중감소 및 혈당 강하 효과 확인**

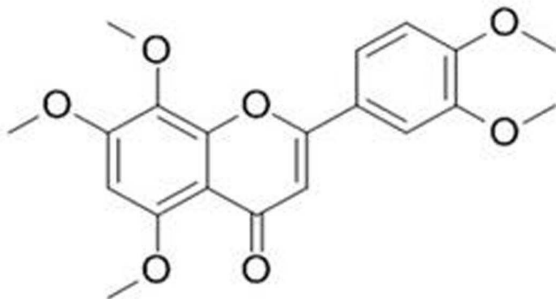
[0123] 마우스 모델을 두 그룹으로 분리하고 한 그룹은 규칙적인 사료를 먹였고(대조군, NFD, n = 6) 다른 그룹은 고지방 식이(HFD, n = 6)를 급여하였다. HFD 그룹은 4 개의 그룹으로 무작위로 나뉘어 고지방 식이를 계속 급여하였다. 한 그룹은 정상 식염수(음성 대조군)를, 아이소시넨세틴 그룹은 10 mg/kg/day로 아이소시넨세틴을 경구 주사(PO) 하였고, 엑센딘 4 그룹은 10 nM/kg/day로 엑센딘 4를 복강 내(IP) 주사로 투여하였고, 다른 그룹은 아이소시넨세틴 및 엑센딘 4를 4주 동안 병용 투여한 후 각 그룹의 체중과 혈당 수치를 측정하였다.

[0124] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이 대조군에 비해 아이소시넨세틴을 처리한 군에서 고지방 식이 유발 비만 마우스의 체중과 혈당 수치가 감소된 것을 확인하였다.

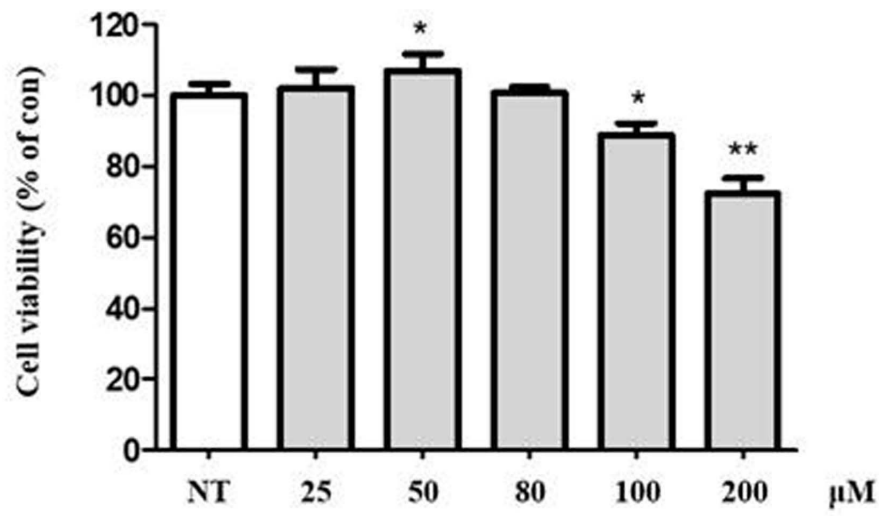
[0126] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

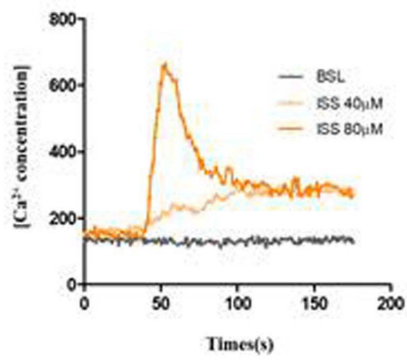
도면1a



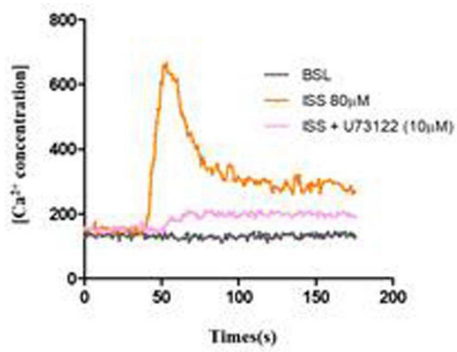
도면1b



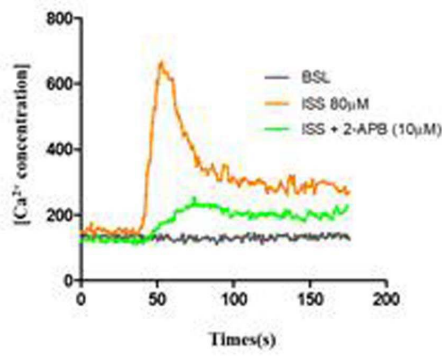
도면2a



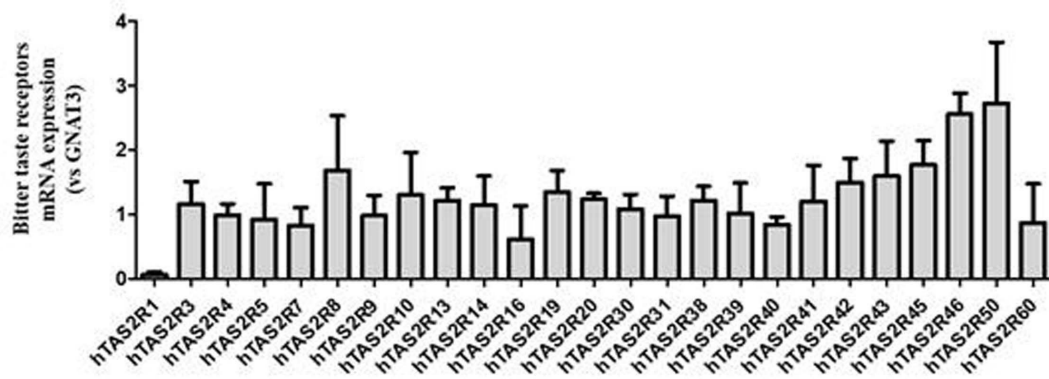
도면2b



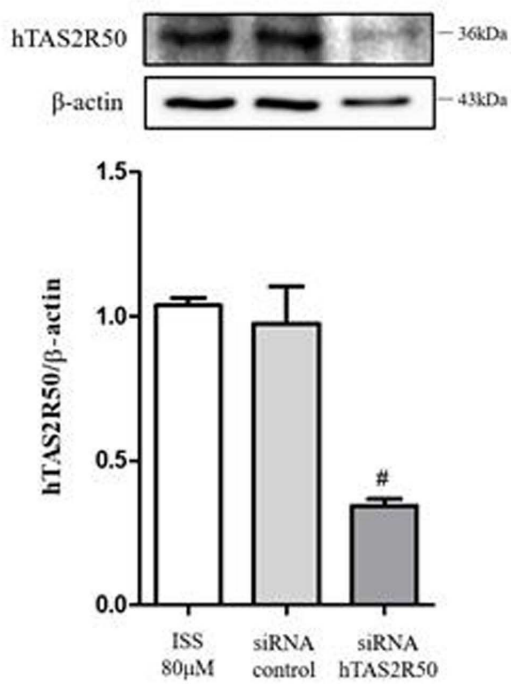
도면2c



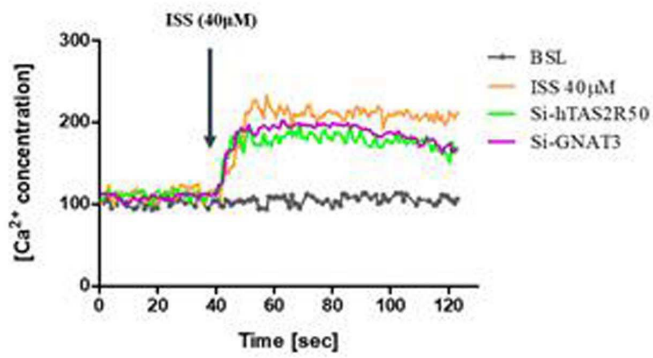
도면3



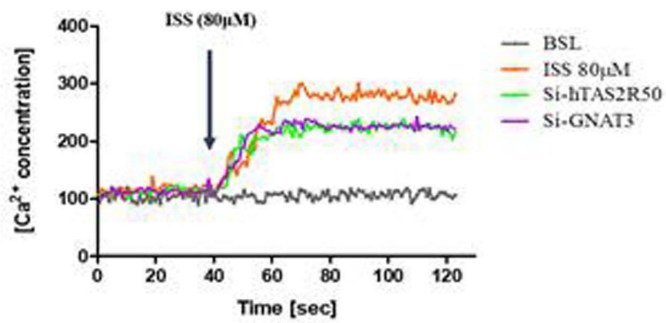
도면4a



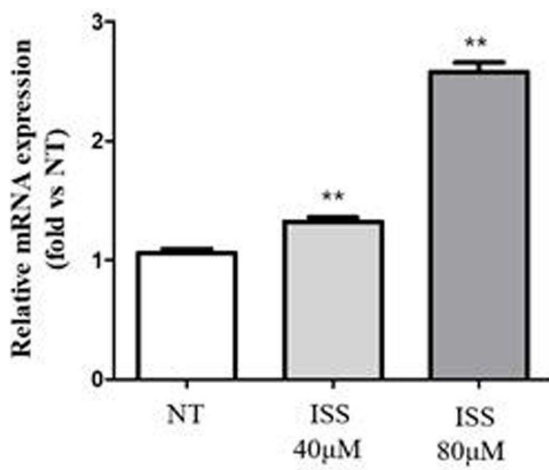
도면4b



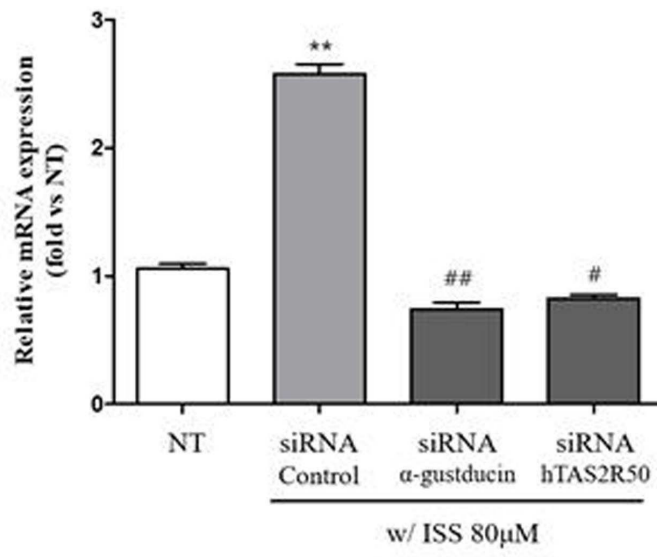
도면4c



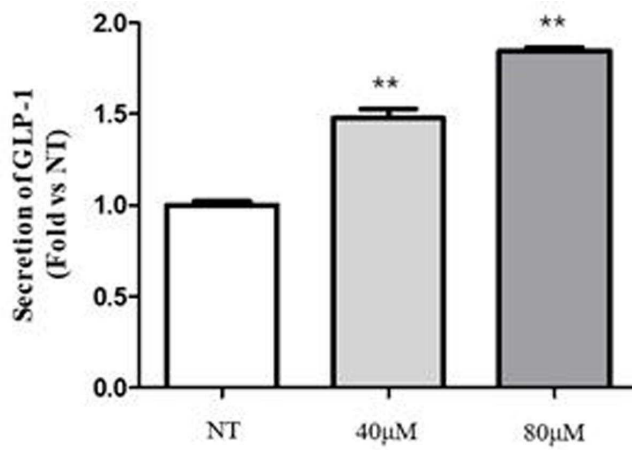
도면5a



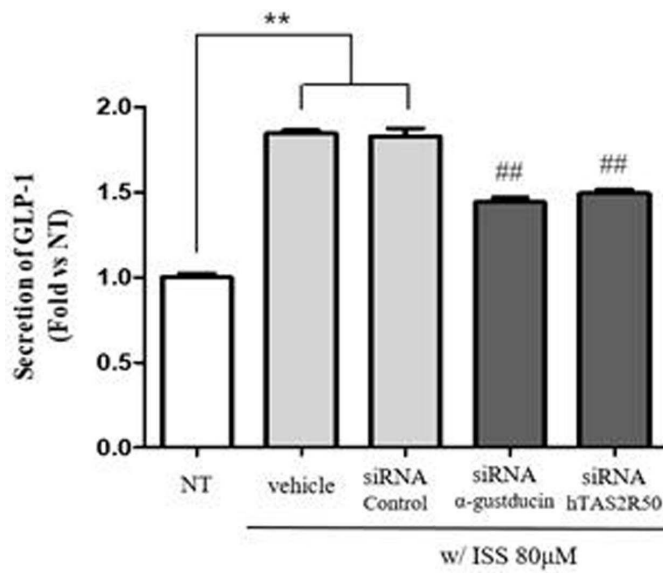
도면5b



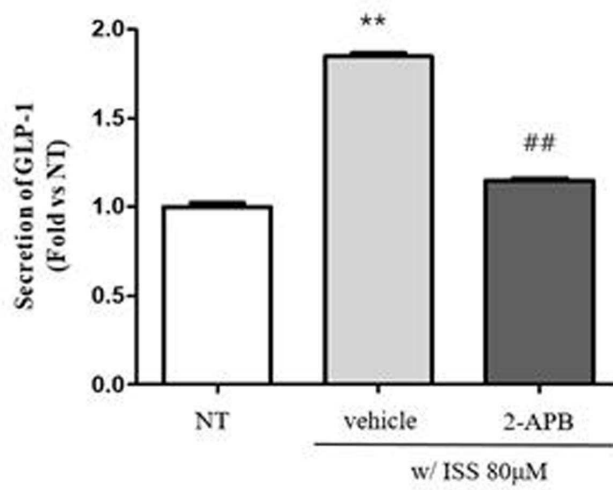
도면6a



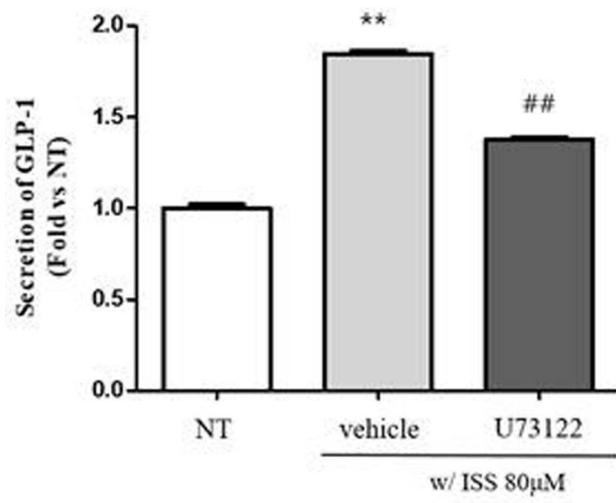
도면6b



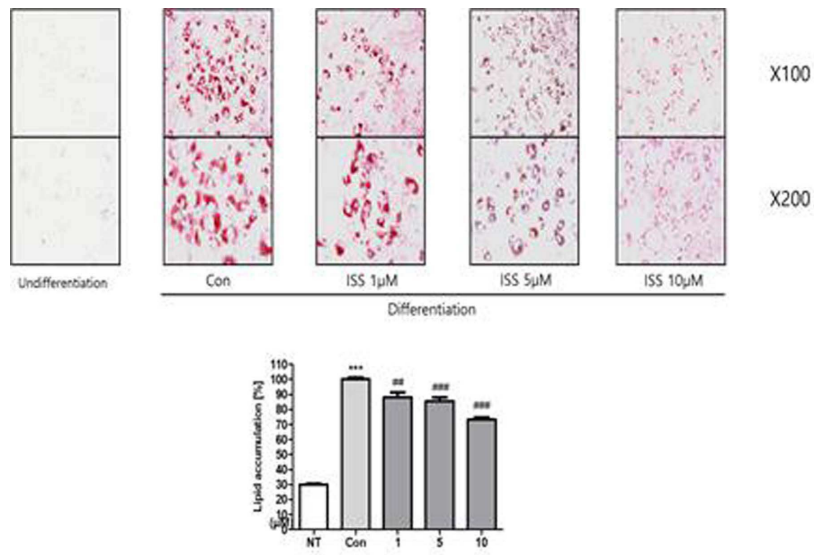
도면6c



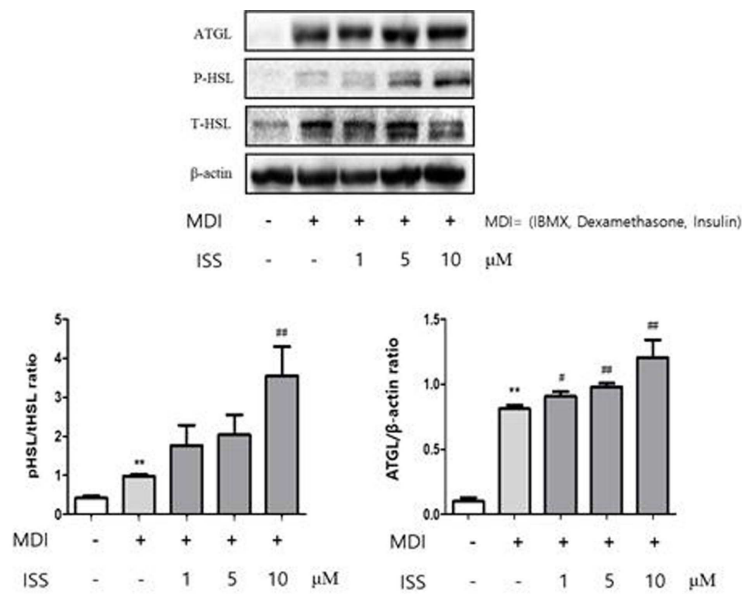
도면6d



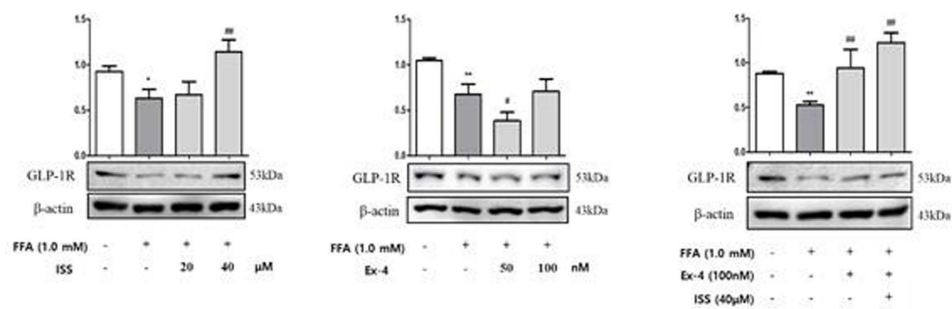
도면7



도면8



도면9



도면10

