



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0080904
(43) 공개일자 2013년07월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/05 (2006.01) A61K 31/045 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0001773

(22) 출원일자 2012년01월06일

심사청구일자 2012년01월06일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)

솔젠트 (주)

대전광역시 유성구 대덕대로 756-27, 3층 (화암동)

(72) 발명자

민경진

인천광역시 연수구 송도동 풍림아이원 114동 1101호

명현균

대전광역시 유성구 화암동 63-10 솔젠트 주식회사

비니카하다

인천 남구 인하로 인하대학교 5동 205B

(74) 대리인

김승진, 양부현

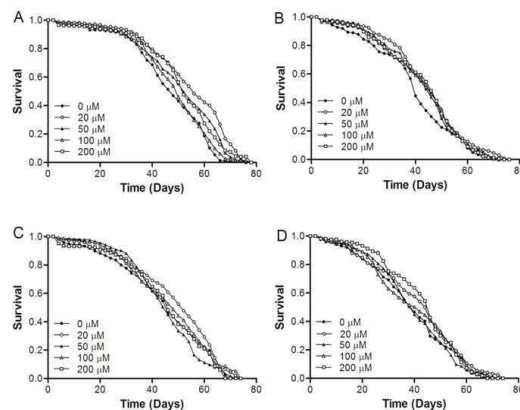
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 D-카이로-이노시톨 또는 피니톨을 유효성분으로 포함하는 항스트레스 조성물

(57) 요약

본 발명은 D-카이로-이노시톨, 피니톨 또는 이들의 유사 화합물을 유효성분으로 포함하는 항노화 조성물 및 항스트레스 조성물을 제공한다. 본 발명의 D-카이로-이노시톨, 피니톨 또는 이들의 유사 화합물은 운동능력 증대와 수명연장 효능을 나타내며, 산화 스트레스 및 기아 스트레스에 대한 저항성을 크게 증진시킨다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

D-카이로-이노시톨, 피니톨 또는 이들의 유사 화합물을 유효성분으로 포함하는 노화 방지용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 D-카이로-이노시톨, 피니톨, 또는 이들의 유사 화합물은 인슐린 신호 전달 경로 (insulin signaling pathway)를 불활성화시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 D-카이로-이노시톨, 피니톨, 또는 이들의 유사 화합물은 전사인자 FOXO를 활성화시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

D-카이로-이노시톨, 피니톨 또는 이들의 유사화합물을 유효성분으로 포함하는 항 스트레스 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 D-카이로-이노시톨, 피니톨 또는 이들의 유사화합물은 산화 스트레스 또는 기아 (starvation) 스트레스에 대한 저항성을 증대시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

(a) D-카이로-이노시톨, 피니톨 또는 이들의 유사화합물의 식품학적 유효량; 및 (b) 식품학적으로 허용되는 담체를 포함하는 항 스트레스 기능성 식품 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 D-카이로-이노시톨, 피니톨 또는 이들의 유사화합물은 산화 스트레스 또는 기아 (starvation) 스트레스에 대한 저항성을 증대시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 D-카이로-이노시톨, 피니톨 또는 이들의 유사화합물을 유효성분으로 포함하는 항노화 또는 항스트레스용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 노화(aging)는 사망률이 증가되는 것과 연관되어 기능 및 번식능의 퇴화가 증대되는 것으로 정의될 수 있다(1).

이러한 노화는 다수의 생물학적 경로(biological pathway)를 포함하여 이루어지는데, 약학적 및 식물학적 화합물을 사용하여 이들 경로를 조작하고자 하는 것이 최근의 항노화 연구의 주요 목표가 되고 있다(2). 이러한 경로중의 하나는 매우 높은 정도로 보존된 인슐린/인슐린 유사 성장인자(insulin/insulin like growth factor, IGF) 신호전달(IIS) 경로이다. IIS 경로는 효모로부터 인간에 이르기까지 수명을 조절하기 위한 진화적으로 보존된 경로이다(3-6). IIS는 성장, 대사, 번식 및 스트레스 저항성 및 수명을 조절하는 데 있어서 중요한 작용을 한다(4, 7). 장 수명의 ISS 변이체가 산화 스트레스에 대해 저항성이 증대된다는 것이 보고되었다(8). 초파리(*drosophila*)에서, 수명 조절에 IIS가 관여되어 있다는 것은 초파리 인슐린 수용체(single fly Insulin receptor, dINR) 및 인슐린 수용체 기질(Insulin receptor substrate, IRS))에서의 변이, 치코(chico)가 수명을 연장시킨다는 것이 규명됨으로써 입증되었다(5, 9, 15). 또한, 마우스에서 인슐린 또는 IGF 경로를 봉쇄시켰을 때 마우스의 수명이 연장된다는 사실을 발견함으로써 IIS 경로에 의한 수명의 조절 기작이 포유동물에서 진화적으로 보존되어 있다는 사실이 확인되었다(10-13). IIS를 구성하는 단일 유전자들에서의 다수의 변이가 꼬마선충(*C. elegans*)에서 수명을 크게 연장시킨다는 사실이 보고되어 있다(6). 다운 스트림 전사인자인 dFOXO는 변형된 IIS에 의한 수명연장에 있어서 필수 요소로 알려져 있다(14, 15). 자극된 IIS는 Akt 키나아제를 활성화시키고, 활성화된 Akt 키나아제는 Foxo3A를 인산화시켜 이를 불활성화시킨 후에 세포질로 이동시킨다(16). 반면, IIS를 불활성화시키면 FOXOs가 활성화된다(6). 이들은 대사, 스트레스 보호, 세포 분화, 세포주기 중지 및 아포토시스에 관여한다고 알려져 있다(17-19). 초파리에서, 전신적으로 인슐린/IGF-1 신호전달을 억제하거나 또는 지방조직에서 FOXO(DAF-16의 초파리 상동성 유전자)의 활성을 증가시키면 수명이 연장된다(20). IIS 변이체의 경우 성체 지방체(adult fat-body)에서 dFOXO가 발현되는 것과 함께 수명이 연장된다(14). 변이가 인슐린/IGF-1 신호전달 유입을 감소시키고 DAF-16/FOXO 유사 단백질이 활성화되는 한, 동물은 세포 유지 방향으로의 생리학적 변화를 일으키고 수명이 연장된다(20).

[0003] 영양실조가 아닌 영양감소인 식이제한(dietary restriction, DR)에 의해 다양한 유기체에서 수명을 연장시킨다는 것이 알려져 있으나, 이의 정확한 분자 메커니즘에 대해서는 거의 알려진 바가 없다(21). 인간을 제외한 영장류에서 식이제한(DR)은 나이 관련된 질환의 발생을 늦추고 나이-바이오마커를 지연시킨다(22). 레수스 원숭이(rhesus monkey)에서 칼로리제한(calorie restriction, CR) 연구로부터 얻어진 데이터에 의하면 이러한 영양학적 중재 패러다임(nutritional intervention paradigm)이 장수명 포유동물에 있어서 유의한 효과를 가질 수 있다는 것을 암시한다. 식이제한(DR)은 종종 칼로리제한으로도 알려져 있는데, 식이중의 특정의 영양소의 감소보다는 칼로리의 감소가 설치류에서 수명을 연장시킨다고도 알려져 있기 때문이다(23). 식이제한(DR)은 몇개의 비-배타적인 유전적 경로, 시르투인(sirtuin), SKN-1, 및 TOR 경로를 통해 매개된다(20, 21, 24).

[0004] 수명 연장 현상은 기아(starvation)에 대한 저항성(25)과 번식 가능한 나이가 연장된 것으로 선별된 초파리 계통에서의 파라콰트(paraquat) 내성과 관련이 있는 것으로 나타나고 있다. 장기간 생존하는 계통은 상이한 환경 스트레스에 대한 저항성이 비교적 뛰어나다(27). 초파리(*Drosophila*)에서 JNK/FOXO 신호전달의 신경 활성화는 산화적 스트레스에 대한 저항성을 부여하고, 수명을 연장시킨다고 알려져 있다(28, 29). 산화적 스트레스는 다양한 질환의 병리와 노화에 관련되어 있다. 따라서, 산화적 스트레스에 대한 저항성을 증대시키는 것은, 질병의 발생을 예방하거나 지연시키고, 유기체의 생존을 증진시키며 노화를 지연시키는 전략이 될 수 있다.

[0005] 초파리는 항-노화 연구에서 매우 훌륭한 모델이다. 초파리와 인간은 DNA 수리 시스템, 수퍼옥사이드 대사 및 인슐린-유사 신호전달과 같은 핵심 대사 경로를 공유한다. 초파리는 키우는데 적은 비용이 소요되고, 비교적 수명주기가 짧고, 노화가 진행됨에 따라 다수의 행동 및 기능의 쇠퇴가 나타난다. 초파리는 90년 이상 동안 노화에 대한 모델 시스템으로 사용되어 왔다(31).

[0006] 이노시톨 패밀리에 속하는 DCI (D-카이로이노시톨, D-chiro-inositol)은 인체에서 인슐린 민감성을 증진시키는 데 있어서 매우 중요한 역할을 한다. 인슐린의 기능을 지지함으로써, DCI는 정상 글루코오스 및 지질 항상성에 기여한다. DCI는 콩류, 특히 메밀, 콩 및 다른 식물에서 모노에틸레이티드 또는 글리코실레이티드 형태로 발견되고, 미생물에서는 복합체 구조로 존재한다. 피니톨(pinitol)은 이노시톨(inositol)과 유사한 화학구조 및 생화학적 작용을 갖는다. 부겐빌레아 스펙타빌리스(*Bougainvillea spectabilis*), 당소나무(*Sugar pine*, *Pinus lambertiana*) 및 대두(*soybean*, *Glycine max*)로부터 주로 분리된 주요 구성성분이다. 다양한 선행문헌에 의해, 피니톨 및 이의 유도체들은 예컨대 항당뇨, 항염증, 항암 효과와 같은 다양한 생물학적 활성을 갖는 것으로 알려져 있다(32).

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문

현의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

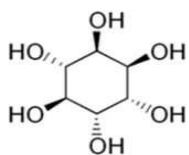
해결하려는 과제

- [0008] 본 발명자들은 스트레스로부터 인체를 보호하여 노화를 억제 또는 지연시킬 수 있는 물질을 발굴하기 위해 연구 노력한 결과, D-카이로-이노시톨(D-chiro-inositol)과 피니톨(pinitol)이 초파리를 모델로 한 실험에서 생식력의 변화 없이 수명을 연장시키고, 운동능 및 스트레스 저항성을 향상시키는 효능을 보인다는 사실을 입증하였으며, 이러한 효과는 인슐린 신호전달 경로의 불활성화 및 dFOXO 전사인자의 활성화를 통해 이루어진다는 것을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0009] 따라서, 본 발명의 목적은 D-카이로-이노시톨, 피니톨 또는 이들의 유사화합물을 유효성분으로 포함하는 노화 방지용 조성물을 제공하는 데에 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 D-카이로-이노시톨, 피니톨 또는 이들의 유사화합물을 유효성분으로 포함하는 항스트레스 조성물을 제공하는 데에 있다.
- [0011] 본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 D-카이로-이노시톨, 피니톨, 또는 이들의 유사 화합물을 유효성분으로 포함하는 노화 방지용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 D-카이로-이노시톨, 피니톨 또는 이들의 유사화합물을 유효성분으로 포함하는 항 스트레스 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명자들은 스트레스로부터 인체를 보호하여 노화를 억제 또는 지연시킬 수 있는 물질을 발굴하기 위해 연구 노력한 결과, D-카이로-이노시톨(D-chiro-inositol)과 피니톨(pinitol)이 초파리를 모델로 한 실험에서 생식력의 변화 없이 수명을 연장시키고, 운동능 및 스트레스 저항성을 향상시키는 효능을 보인다는 사실을 입증하였으며, 이러한 효과는 인슐린 신호전달 경로의 불활성화 및 dFOXO 전사인자의 활성화를 통해 이루어진다는 것을 규명하였다.
- [0015] 본 발명 조성물의 활성성분 “D-카이로-이노시톨” 은 다음의 화학식 1로 표시된다.

화학식 1



- [0016]
- [0017] 본 명세서에서 용어 “D-카이로-이노시톨의 유사 화합물(D-chiro-inositol like compound)” 은 “D-카이로-이노시톨” 과 공통되는 기능적 특징을 공유하고 있기 때문에 직접적으로 또는 인 비보(in vivo) 대사과정 후에 “D-카이로-이노시톨” 과 동등한 생리적 효과를 갖는 화합물을 통칭하는 의미이다. 상기 “D-카이로-이노시톨-유사 화합물” 은 “D-카이로-이노시톨의 적합한 유도체 또는 대사체”, “D-카이로-이노시톨 함유 화합물”, 또는 “D-카이로-이노시톨의 프로드럭(prodrug)” 을 지칭한다.
- [0018] 상기 “D-카이로-이노시톨의 적합한 유도체 또는 대사체” 의 예는 D-카이로-이노시톨 포스페이트(D-chiro-inositol phosphate), D-카이로-이노시톨 에스테르(D-chiro-inositol ester), 바람직하게는 D-카이로-이노시톨

아세테이트, D-카이로-이노시톨 에테르(D-chiro-inositol ester), 바람직하게는 D-카이로-이노시톨의 저급 알킬 에테르, D-카이로-이노시톨 아세탈(D-chiro-inositol acetal) 및 D-카이로-이노시톨 케탈(D-chiro-inositol ketal)을 들 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

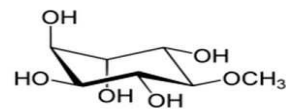
[0019] 상기 “D-카이로-이노시톨 함유 화합물”은 D-카이로 이노시톨 부분(D-chiro-inositol moiety)을 보다 큰 구조의 한 부분으로서 포함하는 화합물을 의미하며, 예를 들어, D-카이로-이노시톨과 하나 이상의 추가 당 또는 당의 유도체(글루코오스, 갈락토오스, 만노오스, 글루코사민, 갈락토사민, 만니톨)를 포함하는 폴리사카라이드, D-카이로-이노시톨-포스포리피드 및 D-카이로-이노시톨과 하나 이상의 금속 이온과의 복합체 또는 킬레이트 화합물을 들 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0020] 상기 “D-카이로-이노시톨의 프로드럭”은 D-카이로-이노시톨의 유도체로서, 인 비보에서 효소적 또는 화학적 공정에 의해 진정한 D-카이로-이노시톨로 전환되며, 보다 향상된 전달 특성 및/또는 치료 효능을 나타내는 화합물을 의미한다. 당류의 프로드럭, 예를 들어 메틸화 또는 아세틸화된 히드록실 그룹의 형태의 당류 프로드럭을 제조하는 방법과 이를 투여하는 방법에 대해서는 당업계에서 공지되어 있다 (Baker et al., *J. Med. Chem.*, 27:270-274, 1984).

[0021] D-카이로-이노시톨 또는 이의 유사화합물은 천연식물 예컨대 메밀(buckwheat), 캐롭(carob), 야생호박(cucurbita ficifolia) 등으로부터 추출하거나, 미오-이노시톨(myo-inositol)에 에피머라아제(epimerase)를 처리하여 얻을 수 있으며, 또는 화학적 합성을 통해 얻을 수 있다.

[0022] 본 발명 조성물의 활성성분 “피니톨”은 다음의 화학식 2로 표시된다.

화학식 2



[0024] 본 명세서에서 용어 “피니톨의 유사 화합물(pinitol like compound)”은 “피니톨”과 공통되는 기능적 특징을 공유하고 있기 때문에 직접적으로 또는 인 비보(in vivo) 대사과정 후에 “피니톨”과 동등한 생리적 효과를 갖는 화합물을 통칭하는 의미이다. 상기 “피니톨 유사 화합물”은 “피니톨의 적합한 유도체 또는 대사체”, “피니톨 함유 화합물”, 또는 “피니톨의 프로드럭(prodrug)”을 지칭한다.

[0025] 본 발명에서 상기 “피니톨의 적합한 유도체 또는 대사체”는 예를 들어 피니톨 글라코사이드(pinitol glycosides), 피니톨 포스포리피드(pinitol phospholipids), 에스테르화된 피니톨(esterified pinitol), 지질-결합 피니톨(lipid-bound pinitol), 피니톨 포스페이트(pinitol phosphate) 및 피니톨 파이테이트(pinitol phytates) 및 이들의 혼합물을 들 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0026] 본 발명에서 상기 “피니톨 함유 화합물”은 피니톨 부분(pinitol moiety)을 보다 큰 구조의 한 부분으로서 포함하는 화합물을 의미하며, 예컨대 피니톨과 하나 이상의 추가적인 당 또는 당의 유도체(글루코오스, 갈락토오스, 만노오스, 글루코사민, 갈락토사민, 만니톨)를 포함하는 폴리사카라이드, 피니톨과 하나 이상의 금속 이온과의 복합체 또는 킬레이트 화합물을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0027] 본 발명에서 상기 “피니톨의 프로드럭(pro-drug)”은 피니톨의 유도체로서 인 비보에서 효소적 또는 화학적 공정에 의해 진정한 피니톨로 전환되며 보다 향상된 전달 특성 및/또는 치료 효능을 나타내는 화합물을 의미한다. 당류의 프로드럭, 예를 들어 메틸화되거나 또는 아세틸화된 히드록실 그룹의 형태의 당류의 프로드럭을 제조하는 방법 및 이를 투여하는 방법에 대해서는 당업계에서 공지되어 있다(Baker et al., *J. Med. Chem.*, 27:270-274, 1984).

[0028] 피니톨 및 이의 유사 화합물은 다수의 식물, 예를 들어 솔잎, 병아리콩(chick peas), 부겐빌레아 잎(Bougainvillea leaves), 자주개자리(alfalfa), 대두(soy beans) 및 그 밖에 다른 콩과식물(legumes)로부터 얻을 수 있거나 합성 공정을 통해서 얻을 수 있다.

[0029] 본 발명의 D-카이로-이노시톨, 피니톨, 또는 이들의 유사 화합물은 하기 실시예에서 입증되는 바와 같이, 초과리 모델에서 대조군과 비교하여 생식력에 영향을 주지 않고 운동능력과 수명을 연장시키는 효능을 보인다.

- [0030] 상기 D-카이로-이노시톨, 피니톨, 또는 이들의 유사 화합물의 수명연장 효과는 인슐린 신호전달 경로(insulin signaling pathway)의 불활성화 및 전사인자 dFOXO의 활성화에 기인한 것으로 설명된다.
- [0031] 따라서, 본 발명의 D-카이로-이노시톨, 피니톨, 또는 이들의 유사 화합물은 노화를 억제, 예방 또는 지연하는 항노화제(anti-aging agent)로 사용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명은 (a) D-카이로-이노시톨, 피니톨 또는 이들의 유사화합물의 억제학적 유효량; 및 (b) 억제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 노화 예방용 억제학적 조성물을 제공한다.
- [0033] 본 명세서에서 용어 “억제학적 유효량”은 상기 D-카이로-이노시톨, 피니톨 또는 이들의 유사화합물의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0034] 본 발명의 억제학적 조성물에 포함되는 억제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 진분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 억제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 억제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0035] 본 발명의 억제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여 방식으로 적용된다. 본 발명의 억제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 억제학적 조성물의 일반적인 투여량은 성인 기준으로 0.001-1000 mg/kg 범위 내이다.
- [0036] 본 발명의 억제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 억제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명은 (a) D-카이로-이노시톨, 피니톨 또는 이들의 유사화합물의 식품학적 유효량; 및 (b) 식품학적으로 허용되는 담체를 포함하는 항노화 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [0038] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로서 D-카이로-이노시톨, 피니톨 또는 이들의 유사화합물 뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 소리쟁이 추출물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.
- [0039] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 D-카이로-이노시톨, 피니톨, 또는 이들의 유사 화합물을 유효성분으로 포함하는 항 스트레스 조성물을 제공한다.
- [0040] 하기 본 명세서의 실시예에서 입증되는 바와 같이, D-카이로-이노시톨, 피니톨, 또는 이들의 유사화합물은 초과 리를 모델로 한 실험에서 대조군과 비교하여 산화 스트레스(oxidative stress) 및 기아 스트레스(starvation stress)에 대한 저항성을 크게 향상시키는 효능을 보인다.
- [0041] 따라서, 본 발명의 D-카이로-이노시톨, 피니톨, 또는 이들의 유사 화합물은 스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 항 스트레스제(anti-oxidative agent)로 사용될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명은 (a) D-카이로-이노시톨, 피니톨 또는 이들의 유사화합물의 식품학적 유효량; 및 (b) 식품학적으로 허용되는 담체를 포함하는 항노화 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [0043] 식품 조성물에 대한 구체적인 설명은 상기 항노화 기능성 식품 조성물을 설명하면서 기술된 내용과 동일하므로,

중복하여 기재하지 않는다.

[0044] 본 발명 조성물의 이점을 정리하면 다음과 같다.

[0045] (i) D-카이로-이노시톨, 피니톨 또는 이들의 유사 화합물은 운동능력 증대와 수명연장 효능을 나타내며, 산화 스트레스 및 기아 스트레스에 대한 저항성을 크게 증진시킨다.

[0046] (ii) 따라서, 본 발명의 상기 활성 화합물들은 노화를 지연 또는 방지하는 항노화제(anti-aging agent) 및 스트레스에 대한 저항성을 증대시키는 항스트레스제(anti-stress agent)로 개발될 수 있다.

발명의 효과

[0047] 이상에서 상세하게 설명된 바와 같이, 본 발명은 D-카이로-이노시톨, 피니톨 또는 이들의 유사 화합물을 유효성분으로 포함하는 항노화 조성물 및 항스트레스 조성물을 제공한다. 본 발명의 D-카이로-이노시톨, 피니톨 또는 이들의 유사 화합물은 운동능력 증대와 수명연장 효능을 나타내며, 산화 스트레스 및 기아 스트레스에 대한 저항성을 크게 증진시킨다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 초파리에서 인슐린/IGF(insulin like growth factor) 신호전달(IIS) 경로를 보여준다.

도 2는 D-카이로-이노시톨(A)와 피니톨(B)의 화학구조식을 보여준다.

도 3은 Canton-S 초파리의 수명에 미치는 DCI 및 피니톨의 영향을 보여준다. 패널 A: 대조군 (0 μ M DCI) 먹이 급여의 경우 수컷의 중간 수명은 48 일(n=279)이었고, 20 μ M DCI 먹이 급여의 경우는 56 일(n=289)이었다(p < 0.001, log-rank test). 패널 B: 대조군 (0 μ M DCI) 먹이 급여의 경우 암컷의 중간 수명은 40 일(n=262)이었고, 20 μ M DCI 먹이 급여의 경우는 46 일(n=264)이었다(p < 0.001, log-rank test). 패널 C: 대조군 (0 μ M 피니톨) 먹이 급여의 경우 수컷의 중간 수명은 46 일(n=293)이었고, 20 μ M 피니톨 먹이 급여의 경우는 50 일(n=281)이었다(p < 0.05, log-rank test). 패널 D: 대조군 (0 μ M 피니톨) 먹이 급여의 경우 암컷의 중간 수명은 40 일(n=276)이었고, 20 μ M 피니톨 먹이 급여의 경우는 45 일(n = 271)이었다(p < 0.05, log-rank test).

도 4는 DCI (패널 A) 및 피니톨 (패널 B)이 생식력에 미치는 영향을 측정한 결과를 보여준다. 통계학적으로 유의성이 없으나, DCI와 피니톨 모두 식이 급여된 초파리는 대조군에 비해 생식력이 증가됨을 보여준다.

도 5는 20 μ M의 DCI가 투여된 초파리의 대조군과 비교한 등반능력을 1주령 및 4주령의 수컷 초파리(패널 A) 및 암컷 초파리(패널 B)에서 비교한 결과를 보여준다. 또한, 20 μ M의 피니톨이 투여된 초파리의 대조군과 비교한 등반능력을 1주령 및 4주령 수컷 초파리(패널 C) 및 암컷 초파리(패널 D)에서 비교한 결과를 보여준다. DCI 투여된 1주령 및 4주령의 수컷 초파리는 등반능력이 현저하게 향상된 것을 보여준다. 피니톨 급여된 1주령 초파리도 등반능력이 유의성 있게 증가하였음을 보여준다. DCI 및 피니톨 급여된 1주령 및 4주령 암컷 초파리와 피니톨 급여된 4주령 수컷 초파리는 대조군과 비교하였을 때 등반능력에 유의성 있는 차이가 없음을 확인하였다.(*) p < 0.05.

도 6은 피니톨이 DR 경로에 독립적으로 수명 연장의 효과가 있음을 보여준다. 피니톨 식이된 수컷 초파리(패널 A) 및 암컷 초파리(패널 B)의 중간 수명을 측정하였다. 10 μ M의 피니톨은 CSY 식이내에서 2%(log rank test, p<0.001) 및 12%(log rank test, p<0.001) 효모 농도에 무관하게, 수컷 및 암컷 모두에서 중간 및 최대 수명을 증가시켰다. (**) p < 0.001, log rank test.

도 7은 DCI 및 피니톨이 산화 스트레스 (oxidative stress) 및 기아 스트레스 (starvation stress)에 대한 저항성을 향상시키는 실험결과를 보여준다. 0 μ M 또는 20 μ M DCI 또는 피니톨이 첨가된 식이를 초파리에 급여하고 10일 경과 후에 초파리를 20 mM의 파라콰트에 노출시킨 경우로서, 패널 (A), 패널 (B), 패널 (C) 및 패널 (D)는 각각 순서대로, DCI 급여한 Canton-S 수컷 초파리, DCI 급여한 Canton-S 암컷 초파리, 피니톨 급여한 Canton-S 수컷 초파리, 피니톨 급여한 Canton-S 암컷 초파리의 생존율을 백분율로 표시한 그래프이다. 대조군과 비교하였을 때, DCI와 피니톨을 투여한 수컷 및 암컷 초파리 모두에서 통계학적으로 유의한 생존율의 증대가 입증되었다. 0 μ M 또는 20 μ M DCI 또는 피니톨이 첨가된 식이를 초파리에 급여하고 10일 경과 후에 초파리

를 기아 상태에 둔 경우로서, 패널 (E), 패널 (F), 패널 (G) 및 패널 (H)는 각각 순서대로, DCI 급여한 Canton-S 수컷 초파리, DCI 급여한 Canton-S 암컷 초파리, 피니톨 급여한 Canton-S 수컷 초파리, 피니톨 급여한 Canton-S 암컷 초파리의 생존율을 백분율로 표시한 그래프이다. 대조군과 비교하였을 때, DCI을 급여한 수컷 및 암컷 초파리 모두에서 통계학적으로 유의한 생존율의 증대가 입증되었다. 그러나, 피니톨을 급여한 수컷 및 암컷 초파리는 대조군과 비교하여 수명이 증가되었으나, 통계학적으로 유의성을 가지지는 않았다(**) $p < 0.001$.

도 8은 DCI 및 피니톨이 인슐린 신호전달 경로(insulin signaling pathway)를 감소시킨다는 것을 보여준다. DCI 및 피니톨이 급여된 초파리의 경우 대조군과 비교하였을 때, dFOXO가 핵내에 최대로 존재하게 되었다. 백색의 화살표는 dFOXO가 핵내로 이동하는 것을 보여주며, 붉은색 화살표는 dFOXO가 핵내로 진입하지 않은 것을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0050] 실시예

[0051] 실험재료 및 방법

[0052] 1. 초파리 스탱 (stock) 및 사육

[0053] 모든 실험은 야생형의 Canton-S 초파리를 사용하여 행하였다. 모든 초파리는 500 mL 케이지내에서 온도 25℃, 습도 50%에서 12시간:12시간 명-암 사이클을 행하여 유지하였다. DCI 및 피니톨 스탱 용액을 제조하고 초파리 배지(먹이)에 첨가하였다. 성체의 수크로오스/효모/한천 배지는 100 mL의 물에, 10 g의 수크로오스, 10 g의 효모, 1.1 mL의 20% tegosept (wt/vol in ethanol) 및 0.79 g의 한천을 첨가하여 제조하였다. 증류수를 사용하여 서로 다른 농도를 갖는 DCI 및 피니톨 수용액을 제조하였다. 배지를 끓인 후에, 60℃으로 식히고, DCI 및 피니톨 스탱 용액 또는 증류수만을 첨가하여 2-3주 내에 사용하였다. Canton-S 초파리는 생 효모 과립이 첨가된, 표준 CSY 배지[100 mL의 물내에 5.2 g 콘밀, 11 g 수크로오스, 11 g 영양 효모(MP Biomedicals, Solon, OH), 1.1 mL의 20% tegosept, 0.79 g 한천]상에서 사육하였다.

[0054] 2. 수명 (Life-span)

[0055] 새로 우화된 Canton-S 성충 초파리를 48 시간에 걸쳐 회수한 후, 최종 밀도가 케이지당 수컷 100 마리 및 암컷 100 마리가 되도록 500 mL의 데모그래피 케이지(demography cage)에 무작위로 배분하여 넣었다. 각각 0, 20, 50, 100, 200 μ M 의 신선한 배지가 담긴 바이얼을 매 2주간 마다 교환시켜주면서 죽은 성충의 수를 기록하였다. 각 화합물에 대해 3회의 반복 실험을 행하였다.

[0056] 3. 생식력 (Fecundity)

[0057] 성체 Canton-S 초파리를 우화후 최초 24 시간 내에서 회수하고, 각각의 바이얼(vial)을 암컷 1 마리 및 수컷 2 마리의 밀도가 되도록 하였다. 각 암컷은 알을 낳기 까지 정확히 24 시간을 할당해 주었다. 초파리는 매일 새로운 바이얼로 옮겨 주었다. 바이얼당 알의 수를 10일 동안 기록하였다. 각 바이얼은 증류수 또는 20 μ M의 DCI 또는 피니톨이 혼합된 표준 SYA 배지를 포함하였다. 하나의 처리당 총 20개의 바이얼을 테스트하였다.

[0058] 4. RING (Rapid iterative negative geotaxis) 분석

[0059] RING 분석은 종래 선행문헌(33)에 상술된 방법에 따라 수행하였다. 간략히 설명하면, 초파리에게 상기 수명 분석에서 설명된 바와 같이 DCI 및 피니톨 식이 분석을 수행하기 전에 1주 및 4주간 수행하였다. 수직 등반(vertical climbing) 분석을 1주 및 4주에서 수행하였다. 초파리를 잠깐의 CO₂ 마취(1-2분)하에서 수집한 후

분석 수행 전에 25 - 50% 상대습도하에서 적어도 18시간 동안의 회복 기간을 주었다. RING 분석을 수행하기 위해, 20 마리의 단일 성(sex)을 갖는 초파리를 튜브안으로 넣었다. 초파리가 들어 있는 튜브를 RING 기기안으로 로딩하고, 음성 주지성 반응(negative geotaxis response)를 개시하기 위해 테이블 위에서 빠르게 연속적으로 3회 두드렸다. 튜브내에서의 초파리의 위치를 행동을 개시한 후 4초 시점에서 디지털 이미지로 포착하였다. 모든 실험에서, 초파리는 1 m의 휴식으로 분리된 연속 시도에 의해 평가하였다. 모든 실험에서 각 그룹(DCI 및 피니톨 0 μ M 및 20 μ M)에 대해 5회 반복하고 4회 시도하였다.

[0060] 5. 스트레스 테스트

[0061] 생존율은 (i) 20 mM 파라콰트(paraquat, 메틸 비올로겐 디클로라이드 하이드레이트, Sigma)가 첨가된 배지(산화 스트레스 조건) 또는 (ii) 1% 한천(기아 조건)에서 측정하였다(34). 별개의 성(sex)을 갖는 총 20 마리의 초파리를 바이얼안에 넣고 15회 반복실험을 행하여 평균값을 취하였다. 초파리의 생존율은 매 6시간 마다 체크하였다. 양쪽 실험에 대해서 초파리에게 DCI 및 피니톨 식이를 10 일간 급여하였다.

[0062] 6. 식이 제한 (Dietary Restriction, DR)

[0063] 성체의 표준 당/효모/한천(SYA) 배지는 12% 효모 먹이인 경우, 100 ml의 증류수에 대해 10 g의 수크로오스, 12 g의 효모, 1.1 mL의 20% tegosept (wt/vol in 에탄올) 및 0.79 g의 한천으로 제조하였다. 2% 효모 먹이의 경우는 12 g의 효모 대신 2 g의 효모를 첨가하였다. 제조한 배지를 끓이고 60°C 까지 냉각시킨 후, DCI 스타크 용액, 피니톨 스타크 용액 또는 증류수 단독을 19:1의 부피 비율로 첨가하였다. 이어서, 5 mL의 배지를 10-x75-mm 셀 바이얼에 분배하고, 40°C에서 저장한 후, 2-3주 내에 사용하였다. 모든 실험에서, 초파리는 표준 유충 밀도에서 배양하였고, 우화되는 성충은 약한 CO₂ 마취하에서 24 시간 기간에 걸쳐 수집하였다(35).

[0065] 7. 면역 염색 (Immunostaining)

[0066] 세 번째 영(instar) 유충의 지방체(fat body)를 PBS 내에서 절개하고 상온, 4% 포름알데히드내에서 30분간 고정하였다. 샘플을 dFOXO 항체 (1:300 in 2% BSA)로 4°C에서 하룻밤 반응시키고, Alexa Fluor 488-컨쥬게이트된 항-래빗 IgG (1: 300 in 2% BSA)으로 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 조직을 DNA 염색하기 위해 DAPI와 함께 Vector H1200 마운팅 배지내에 올렸다(Vector Laboratories, Burlingame, CA). 공초점 레이저 현미경 (Confocal Laser Scanning Microscope, LSM 510 META)을 사용하여 형광이미지를 얻었다.

[0067] 8. 통계 분석

[0068] 통계분석은 Prism software (GraphPad)를 사용하여 행하였다. 수명과 스트레스 생존율 곡선에 대해 Log-rank 테스트를 수행하였다. ANOVA (One-way analysis of variance)를 사용하였다. 편차막대(error bar)는 평균의 표준편차를 나타내고 별표는 대조군과의 유의성 있는 차이를 나타낸다(**p<0.001 및 *p<0.05). 각 실험에 대해 사용된 테스트와 샘플의 크기를 표시하였다.

[0069] 실험결과

[0070] 1. 표준 식이를 급여한 초파리의 수명에 미치는 DCI 및 피니톨의 영향

[0071] 수명에 미치는 DCI 및 피니톨의 영향을 테스트하기 위해, 막 우화된 Canton-S 초파리에, 0, 20, 50, 100 및 200 μ M의 다양한 농도의 DCI를 포함하는 표준 초파리 배지를 초파리 일생동안 급여하였다. 20 μ M 농도의 DCI 급여의 경우 수컷 중간 수명을 16.7% 현저히 증대시켰고(도 3의 패널 A 및 표 1, p<0.001), 암컷 중간 수명은 13% 증가시켰다(도 3의 패널 B, p<0.001). 이와 유사한 방식으로, 초파리의 수명에 대한 피니톨의 영향을 다양한 피니톨 농도, 0, 20, 50, 100 및 200 μ M로 검사하였다. 수컷 및 암컷 초파리 모두에 대해, 20 μ M의 피니톨을 첨가한 경우 중간 수명을 각각 13%(도 3의 패널 C, p<0.05) 및 12.5%(도 3의 패널 D, p<0.05) 증대시켰다.

표 1

Compound	Gender	Concentration	n life-span	Media life-span	Mean life-span	P values	Total N of flies
DCI	M	0 μ M	48	47.129			279
DCI	M	20 μ M	56	54.325	<0.001		289
DCI	M	50 μ M	52	50.48	<0.001		285
DCI	M	100 μ M	50	48.176	0.0829		274
DCI	M	200 μ M	52	51.291	<0.001		289
DCI	F	0 μ M	40	39.123			262
DCI	F	20 μ M	46	44.447	<0.001		264
DCI	F	50 μ M	44	42.684	<0.05		263
DCI	F	100 μ M	42	42.579	<0.05		235
DCI	F	200 μ M	46	42.786	<0.05		224
Pinitol	M	0 μ M	46	44.533			293
Pinitol	M	20 μ M	50	48.634	<0.05		281
Pinitol	M	50 μ M	46	45.071	0.304		284
Pinitol	M	100 μ M	48	46.634	0.1296		242
Pinitol	M	200 μ M	46	45.199	0.5399		255
Pinitol	F	0 μ M	40	39.059			276
Pinitol	F	20 μ M	45	41.504	<0.05		271
Pinitol	F	50 μ M	40	39.442	0.3034		255
Pinitol	F	100 μ M	42	40.152	0.5959		213
Pinitol	F	200 μ M	46	43.121	0.2244		259

[0072]

[0073] 2. 생식력(fecundity)에 미치는 DCI 및 피니톨의 영향

[0074] 상기 확인된 수명 증대 효과가 DCI 및 피니톨 처리의 직접적인 효과인지 아니면 DCI 및 피니톨의 2차적인 생리적 효과 유도에 의한 것인지를 알아보기 위해, DCI 및 피니톨이 식이로 급여된 초파리의 생식력을 검사하였다. 초파리에서의 수명 증가는 초기 번식(early reproduction)의 감소와 연관되어 있다고 보고되었다(36). 실험결과, DCI와 피니톨을 급여한 암컷 초파리에서 생식력이 감소하지는 않았다(도 4). 즉, DCI 또는 피니톨 성분이 첨가된 식이로 급여한 초파리에서 수명기간 동안의 산란능은 수명연장이 관찰된 용량 범위내에서 감소하지 않았다. 이러한 결과는 DCI 및 피니톨 성분 첨가에 의한 수명연장 효과가 생식력 감소에 기인한 것이 아님을 확인시켜 주는 것이다.

[0075] 3. 초파리의 운동능에 미치는 DCI 및 피니톨의 영향

[0076] 생식력과 같은 노화의 생리학적 특성에 대한 DCI 및 피니톨의 영향을 측정한 것에 이어서, DCI 및 피니톨에 대해, 건강하게 살 수 있는 기간(health span)의 바이오 마커라고 할 수 있는 운동능에 미치는 영향을 테스트하였다. 운동능과 노화 사이의 연관관계는 초파리를 포함하여 여러 종에서 입증되어 왔는데, 1987년에 Le Bourg는 초파리(Drosophila)에서 운동능과 노화가 연관성을 갖는다는 것을 보고하였다(37, 38). 주지성(geotaxis)은 초파리에서 바닥을 두드린 후에 용기의 벽을 타고 오르는 선천적인 회피 반응인 음성 주지성(negative geotaxis)를 측정함으로써 정량화가 가능하기 때문에 쉽게 평가할 수 있는 행동 타입이다(39-42). 음성 주지성을 측정하기 위해 RING(rapid iterative negative geotaxis) 테스트를 사용하였다. 1 주령 및 4 주령 암컷의 등반능이 DCI를 투여한 초파리에서 현저하게 향상되었다(도 5의 패널 A, $p < 0.05$). 피니톨을 급여한 1 주령의 초파리도 등반능력이 크게 개선되었음을 보여주었다(도 5의 패널 C, $p < 0.05$). 그러나, DCI(도 5의 패널 B) 및 피니톨(도 5의 패널 D) 투여한 1주령 및 4주령 암컷 초파리 및 피니톨 투여한 4주령 수컷 초파리(도 5의 패널 C)는 대조군과 비교할 때, 등반능력에서 유의적인 차이가 발견되지 않았다.

[0077] 4. DCI 및 피니톨이 DR 식이로 급여한 초파리의 수명에 미치는 영향

[0078] 식이제한(DR)으로 알려져 있는 영양분 섭취의 감소에 의해, 선충류(*C. elegans*), 초파리(*D. melanogaster*), 효모(*S. cerevisiae*)를 포함하는 다양한 종에서 수명을 연장시킨다고 알려져 있다(43, 44). DCI 및 피니톨이 동일하거나 또는 상이한 경로를 통해 영향을 미치는지 결정하기 위해, DCI 및 피니톨을 첨가하거나 첨가하지 않은 2% CSY (DR) 및 12% CSY (임의) 식이로 급여한 초파리의 수명을 측정하였다. DCI 및 피니톨이 유사한 구조를 갖기 때문에, 이들이 기능도 유사하게 나타낼 것으로 가정하였다. 따라서, 피니톨만이 투여된 DR 조건에서의 수명을 검사하였다. 피니톨이 보충된 CSY 2% 식이로 급여된 수컷 및 암컷 모두에서, DR 식이 단독만의 경우보다 이들의 수명이 현저하게 증가하였다(log rank test, $p < 0.001$ for all comparisons)(도 6). 이러한 결과는 피니톨의 연장효과가 DR 경로에 독립적이라는 것을 시사한다. 이와 유사하게, 피니톨-급여 수컷 및 암컷이 임의 식이(SY 12%) 조건에서 대조군 초파리와 비교하여 이들의 수명이 현저하게 증가하였다(log rank test, 모든 비교에 대해 $p < 0.001$). 이러한 결과는 이들 화합물들이 고-효모 식이의 역효과를 제한할 수 있고, 고-효모 식이에 대한 초파리의 생존능을 촉진한다는 것을 암시한다.

[0079] 5. 스트레스 저항성에 미치는 DCI 및 피니톨의 영향

[0080] 다양한 스트레스에 대한 저항성의 증가는 기아(starvation) 스트레스 및 산화 스트레스를 포함하여 수명 연장의 중재(intervention)와 종종 관련되어 있다(34). DCI 및 피니톨이 산화 스트레스 및 기아 스트레스로부터 초파리를 보호하는 효과를 가지는지를 평가하기 위해, DCI와 피니톨을 투여한 초파리를 파라콰트(paraquat) 및 기아에 노출시켰다. 그 결과, DCI 및 피니톨 식이를 급여한 수컷 및 암컷 초파리 모두가 20 mM 파라콰트에서 대조군과 비교하여 생존율이 더욱 연장되는 결과를 보여주었다(도 7, 모든 비교에 대해, $p < 0.001$). 또한, 이들 화합물로 급여된 초파리는 대조군과 비교하여 기아에 대한 저항성도 증대되었다(도 7).

[0081] 6. DCI 및 피니톨은 dFOXO의 핵내 국재화(localization)을 증가시킨다

[0082] DCI, 피니톨 및 PIP3는 유사한 구조를 공유하고, PIP3가 IGF 신호전달경로에서 2차 전달자로서 작용하기 때문에(6), DCI 및/또는 피니톨이 IGF 신호전달경로상에서 어떠한 작용하는지에 대해 조사하였다. 또한, IGF-유사 신호전달의 감소가 초파리에서의 수명연장에 관련되어 있기 때문에, DCI 및 피니톨이 초파리내에서 IGF 신호전달 경로를 통해 수명연장 효과를 나타내는지에 대해 조사하였다. 일반적으로, 내재성 dFOXO(endogenous dFOXO)는 모든 세포의 세포질(cytoplasm)에 고르게 분산되어 있다(15). 인슐린 유사 수용체(insulin-like receptor)에서 리간드의 결합이 없으면, dFOXO가 인산화되지 않은 상태로 남고 핵안으로 이동하게 되며, 이동된 핵안에서 세포 성장 및 증식을 지연시키고, 수명을 연장시키는 인자들을 촉진시킨다(45, 46). 따라서, 본 발명자들은 DCI 및 피니톨을 급여한 초파리에서 유충 복부 지방체(abdominal fat body)의 핵내에서 dFOXO의 국재화를 검사하였다. 면역염색분석 결과, DCI와 피니톨을 급여한 초파리의 지방체에서 dFOXO가 핵내에 국재화가 대조군과 비교하여 크게 증가되어 있음을 확인하였다(도 8). 이러한 결과는 DCI와 피니톨 화합물에 의한 수명연장 효과가 인슐린 신호전달경로의 감소 및 dFOXO 활성화를 통해 이루어진다는 것을 입증하는 것이다.

[0083] 논의 (Discussion)

[0084] 본 발명의 실험결과는 DCI 및 피니톨이 초파리에서 성(sex)에 관계없이 수명연장 효능을 나타냄을 증명하고 있다. 동물에서 노화에 영향을 줄 수 있는 것으로 밝혀진 최초의 경로는 인슐린/IGF-1 (IIS) 경로이다(20). IIS 경로에 의한 수명의 연장은 선형동물 꼬마선충(*C. elegans*), 초파리(*Drosophila*), 마우스(mouse) 등에서 진화적으로 보존되어 있다(6, 43). FOXO 인자는 IIS 경로에 의해 하향조절(downregulate)되고(47), 인슐린/IGF-1 경로를 억제하면 FOXO가 활성화되고, 이에 의해 세포유지 및 수명연장의 방향으로 세포의 생리적 상태가 변화된다(20). daf-16는 forkhead 전사인자 FOXO 패밀리에 대한 꼬마선충(*C. elegans*)에서의 유일한 유사체이고, daf-2는 인슐린-유사 수용체(insulin-like receptor)를 코딩한다(48). daf-16 활성이 수반되면서 daf-2가 돌연변이된 경우 꼬마선충(*C. elegans*)의 수명이 2배 연장되는 것으로 보고되었다(49). 초파리 인슐린 수용체 기질 단백질인, 치코(chico)의 돌연변이에 의해 초파리의 중간 수명이 동형접합체의 경우 48% 및 이형접합체의 경우 36% 연장되었다(6, 5). 또한, IGF-I 수용체 유전자에 변이가 있는 마우스 이형접합체 모델에서 정상군보다 수명이 26% 연장되는 효과가 확인되었다(49).

[0085] DCI 및 피니톨은 PIP3와 구조적으로 유사하다. IIS 세포내 신호전달 매개물질인 PIP3는 dPDK1 및 PKB와 같은

키나아제를 활성화시키고, 활성화된 키나아제는 다시 전사인자 dFOXO를 인산화시킴으로써 이를 불활성화시켜 세포질(cytoplasm)내로 이동하게 한다(6, 45, 46). 본 발명자들은 DCI 및/또는 피니톨이 IGF 신호전달경로에 개입하여 수명연장 효능을 발휘할 것으로 가정하였다. 이를 입증하기 위한 실험을 수행한 결과, DCI 및 피니톨이 인슐린/IGF-1 경로를 감소시키고, dFOXO를 활성화시킴으로써 수명을 연장한다는 것을 확인하였다. 꼬마선충에서 인슐린/IGF-1 경로의 구성요소인 daf-2 및 age-1 유전자의 돌연변이에 의해 스트레스 저항성이 증진되고 성체의 수명이 최고 200% 연장된다는 것이 보고되어 있다(44). Maria E는 dFOXO-TM의 머리 지방체 특이적(head fat-body-specific) 과발현이 암컷의 생식능에는 아무런 영향을 주지 않으나, 파라콰트(paraquat)에 대한 내성을 증진시키고 머리 지방체 뿐만 아니라 주변 지방체(peripheral fat body)에도 지질축적을 가져온다고 보고하였다. 이와 유사하게, 본 발명의 실험결과에서도 DCI 및 피니톨이 초파리 지방체에서 IIS를 감소시키고 dFOXO를 활성화시켜 생식능의 감소 없이 수명을 연장시키며, 산화 스트레스 및 기아 스트레스에 대한 저항성을 증가시킨다는 것이 확인되었다.

[0086] 식이제한(dietary restriction, DR)도 수명을 증가시키는 요인 중에 하나다. 효모로부터 원숭이에 이르는 다양한 대상에 대한 연구결과 영양실조가 아닌 식이제한(DR)은 노화와 관련된 질환을 예방하거나 지연시키고 수명을 연장시키는 것으로 보고되었다(21). 레스베라톨(resveratrol)과 시르투닌(sirtuin)과 같은 일종의 화합물들은 DR과 유사한 작용을 통해 수명을 증대시킨다고 밝혀졌다(50). FOXO가 수명연장에 필요한 최적 식품 농도를 변경하지만, FOXO가 DR-유도된 수명 증가에 요구되는 인자는 아니라고 보고되었다(35). 이와 유사하게, 벌레(worms)에서 DAF-16가 DR 유사한 레스베라톨의 수명연장 효능에 반드시 필요하지 않다고 보고되었다(51). Ames dwarf 마우스(*Prop1^{df}*)와 성장호르몬 수용체가 결손된 Labron 마우스는 공통적으로, 인슐린, IGF-1, 포도당 및 갑상선 호르몬의 낮은 혈장 수준과 같은 DR 마우스의 표현형과 유사한 표현형을 갖는다(52). IIS 및 DR에 의한 수명연장은 동일한 메커니즘에 의해 작동되지 않는다(53). 본 발명자들은 FOXO의 핵내 국재화(localization)를 증가시키는 DCI 및 피니톨이, DR 조건하에서, DR 조건에 의해 연장되는 정도를 범어서는 정도로 수명을 더욱 연장시킨다는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 꼬마선충(51), 초파리(35), 마우스(53)에서의 결과와 일치하여, DCI 및 피니톨이 식이제한(DR) 경로와는 다른 별개의 경로를 통해 수명을 연장시킨다는 것을 보여주는 것이다.

[0087] 본 발명자들은 생식능과 같은 노화의 생리학적 특성에 대해 DCI 및 피니톨이 미치는 영향을 검사한 것에 추가하여, 건강하게 살수 있는 기간(health span)에 대한 바이오마커로서 운동능에 대해 미치는 영향도 테스트하였다. 노화는 유기체의 수명 전체에 걸쳐 생리학적 및 행동학적 변화의 수로 규정되기 때문에, 항노화 화합물은 건강 기간(health span)에 손상을 주지 않으면서 수명을 연장시켜야한다. 운동능과 노화의 연관성은 초파리를 포함하여 다양한 종에서 확립되어 왔다(37). 초파리에서 비록 수컷이 암컷에 비해 앞선 나이에 운동능이 더욱 좋지만, 일반적으로 노화의 진행에 따라 운동능이 자발적으로 감퇴한다고 보고되었다(37). 본 발명자들은 운동능에 대한 영향을 측정할 바와 같이, 초파리에서 DCI 및 피니톨에 의한 수명연장은 건강 기간(health span)을 위태롭게 하지 않는다는 것을 확인하였다. 다양한 형태의 생리학적인 스트레스에 대해 저항성이 증가하는 것은 종종 수명을 연장시키는 유전적인 변형과 연관되어 있고, 우연적인 것으로 가정되어 왔다(34, 54). IGF-1 수용체 1의 반수결손(haplodeficiency)을 갖는 마우스의 경우 수명의 증가와 산화 스트레스에 대한 저항성의 증가를 나타내었다(10). 유사하게, 장수명의 인슐린 신호전달 경로 변이체는 다양한 독소에 대해 증가된 저항성을 보여주었다. 본 발명의 실험결과에서 초파리에 DCI 및 피니톨을 급여하게 되면 산화 스트레스와 기아와 같은 서로 다른 종류의 스트레스에 대해 저항성이 향상됨을 보여주었다. 따라서, 산화 및 기아 스트레스에 대한 저항성의 개선이 노화 지연과 연관되어 있고, 노화 지연에 모두 필요하거나 충분한 요건이라는 것을 확인시켜 준다. 스트레스 저항성에 dFOXO가 관련되어 있기 때문에 스트레스 저항성의 증가 이외의 또 하나의 사실은 초파리의 지방체(fat-body)에서의 dFOXO의 활성화일 수 있다(6, 46).

[0088] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0089] 참고문헌

[0090] 1. Kirkwood, Tb, and Austad, Sn (2000) Why do we age? Nature 408, Page.

- [0091] 2. Jafari, M, Khodayari, B, Felgner, J, Bussel, Ii, Rose, Mr, and Mueller, Ld (2007) Pioglitazone: an anti-diabetic compound with anti-aging properties. *Biogerontology* 8, Page.
- [0092] 3. Vijg, J, and Suh, Y (2005) Genetics of longevity and aging. *Annu Rev Med* 56, Page.
- [0093] 4. Garofalo, Rs (2002) Genetic analysis of insulin signaling in *Drosophila*. *Trends Endocrinol Metab* 13, Page.
- [0094] 5. Clancy, Dj, Gems, D, Harshman, Lg, Oldham, S, Stocker, H, Hafen, E, Leivers, Sj, and Partridge, L (2001) Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* 292, Page.
- [0095] 6. Giannakou, Me, and Partridge, L (2007) Role of insulin-like signalling in *Drosophila* lifespan. *Trends Biochem Sci* 32, Page.
- [0096] 7. Broughton, S, and Partridge, L (2009) Insulin/IGF-like signalling, the central nervous system and aging. *Biochem J* 418, Page.
- [0097] 8. Van Heemst, D, Beekman, M, Mooijaart, Sp, Heijmans, Bt, Brandt, Bw, Zwaan, Bj, Slagboom, Pe, and Westendorp, Rg (2005) Reduced insulin/IGF-1 signalling and human longevity. *Aging Cell* 4, Page.
- [0098] 9. Tatar, M, Kopelman, A, Epstein, D, Tu, Mp, Yin, Cm, and Garofalo, Rs (2001) A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* 292, Page.
- [0099] 10. Holzenberger, M, Dupont, J, Ducos, B, Leneuve, P, Geloën, A, Even, Pc, Cervera, P, and Le Bouc, Y (2003) IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421, Page.
- [0100] 11. Selman, C, Lingard, S, Choudhury, Ai, Batterham, Rl, Claret, M, Clements, M, Ramadani, F, Okkenhaug, K, Schuster, E, Blanc, E, Piper, Md, Al-Qassab, H, Speakman, Jr, Carmignac, D, Robinson, Ic, Thornton, Jm, Gems, D, Partridge, L, and Withers, Dj (2008) Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. *FASEB J* 22, Page.
- [0101] 12. Bluher, M, Kahn, Bb, and Kahn, Cr (2003) Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 299, Page.
- [0102] 13. Taguchi, A, Wartschow, Lm, and White, Mf (2007) Brain IRS2 signaling coordinates life span and nutrient homeostasis. *Science* 317, Page.
- [0103] 14. Giannakou, Me, Goss, M, Junger, Ma, Hafen, E, Leivers, Sj, and Partridge, L (2004) Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body. *Science* 305, Page.
- [0104] 15. Hwangbo, Ds, Gershman, B, Tu, Mp, Palmer, M, and Tatar, M (2004) *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* 429, Page.
- [0105] 16. Brunet, A, Bonni, A, Zigmond, Mj, Lin, Mz, Juo, P, Hu, Ls, Anderson, Mj, Arden, Kc, Blenis, J, and Greenberg, Me (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, Page.
- [0106] 17. Greer, El, and Brunet, A (2008) FOXO transcription factors in ageing and cancer. *Acta Physiol (Oxf)* 192, Page.
- [0107] 18. Partridge, L, and Bruning, Jc (2008) Forkhead transcription factors and ageing. *Oncogene* 27, Page.
- [0108] 19. Salih, Da, and Brunet, A (2008) FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Curr Opin Cell Biol* 20, Page.
- [0109] 20. Kenyon, Cj The genetics of ageing. *Nature* 464, Page.
- [0110] 21. Fontana, L, Partridge, L, and Longo, Vd Extending healthy life span—from yeast to humans. *Science* 328, Page.

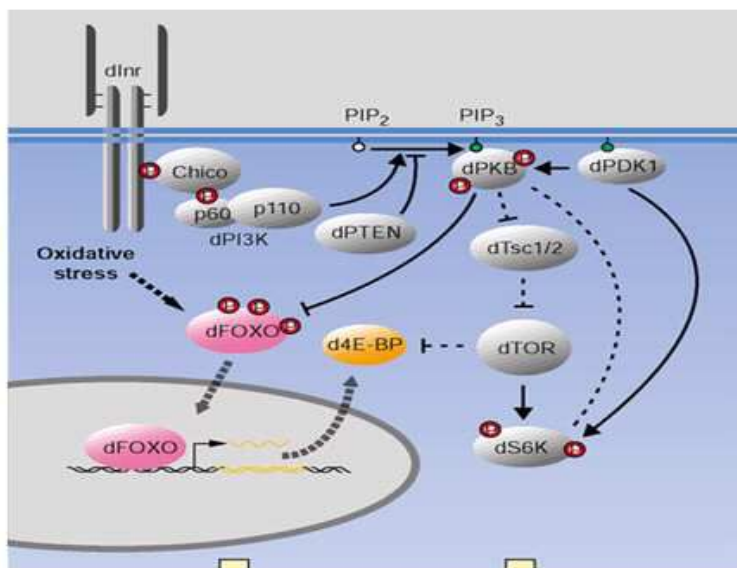
- [0111] 22. Lane, Ma, Tilmont, Em, De Angelis, H, Handy, A, Ingram, Dk, Kemnitz, Jw, and Roth, Gs (2000) Short-term calorie restriction improves disease-related markers in older male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Mech Ageing Dev* 112, Page.
- [0112] 23. Piper, M, Mair, W, and Partridge, L (2007) Comment by Matthew Piper, William Mair, Linda Partridge on Min, K.J., Flatt, T., Kulaots, I., Tatar, M. (2006) "Counting calories in *Drosophila* dietary restriction" *Exp. Gerontology*, doi:10.1016/j.exger.2006.10.009. *Exp Gerontol* 42, Page.
- [0113] 24. Longo, Vd, and Kennedy, Bk (2006) Sirtuins in aging and age-related disease. *Cell* 126, Page.
- [0114] 25. Vieira, C, Pasyukova, Eg, Zeng, Zb, Hackett, Jb, Lyman, Rf, and Mackay, Tf (2000) Genotype-environment interaction for quantitative trait loci affecting life span in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 154, Page.
- [0115] 26. Arking, R, Buck, S, Berrios, A, Dwyer, S, and Baker, Gt, 3rd (1991) Elevated paraquat resistance can be used as a bioassay for longevity in a genetically based long-lived strain of *Drosophila*. *Dev Genet* 12, Page.
- [0116] 27. Martin, Gm, Austad, Sn, and Johnson, Te (1996) Genetic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nat Genet* 13, Page.
- [0117] 28. Wang, Mc, Bohmann, D, and Jasper, H (2003) JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *Dev Cell* 5, Page.
- [0118] 29. Wang, Mc, Bohmann, D, and Jasper, H (2005) JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell* 121, Page.
- [0119] 30. Vermeulen, Cj, and Loeschcke, V (2007) Longevity and the stress response in *Drosophila*. *Exp Gerontol* 42, Page.
- [0120] 31. Jafari, M, Felgner, Js, Bussel, Ii, Hutchili, T, Khodayari, B, Rose, Mr, Vince-Cruz, C, and Mueller, Ld (2007) *Rhodiola*: a promising anti-aging Chinese herb. *Rejuvenation Res* 10, Page.
- [0121] 32. Bhat, Ka, Shah, Ba, Gupta, Kk, Pandey, A, Bani, S, and Taneja, Sc (2009) Semi-synthetic analogs of pinitol as potential inhibitors of TNF- α cytokine expression in human neutrophils. *Bioorg Med Chem Lett* 19, Page.
- [0122] 33. Gargano, Jw, Martin, I, Bhandari, P, and Grotewiel, Ms (2005) Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. *Exp Gerontol* 40, Page.
- [0123] 34. Broughton, Sj, Piper, Md, Ikeya, T, Bass, Tm, Jacobson, J, Driege, Y, Martinez, P, Hafen, E, Withers, Dj, Leivers, Sj, and Partridge, L (2005) Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, Page.
- [0124] 35. Min, Kj, Yamamoto, R, Buch, S, Pankratz, M, and Tatar, M (2008) *Drosophila* lifespan control by dietary restriction independent of insulin-like signaling. *Aging Cell* 7, Page.
- [0125] 36. Flatt, T Survival costs of reproduction in *Drosophila*. *Exp Gerontol*, Page.
- [0126] 37. Le Bourg, E (1987) The rate of living theory. Spontaneous locomotor activity, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol* 22, Page.
- [0127] 38. Simon, Af, Liang, Dt, and Krantz, De (2006) Differential decline in behavioral performance of *Drosophila melanogaster* with age. *Mech Ageing Dev* 127, Page.
- [0128] 39. Arking, R, and Wells, Ra (1990) Genetic alteration of normal aging processes is responsible for extended longevity in *Drosophila*. *Dev Genet* 11, Page.
- [0129] 40. Benguria, A, Grande, E, De Juan, E, Ugalde, C, Miquel, J, Garesse, R, and Marco, R (1996) Microgravity effects on *Drosophila melanogaster* behavior and aging. Implications of the IML-2

experiment. J Biotechnol 47, Page.

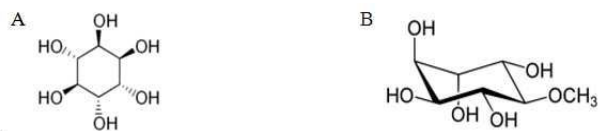
- [0130] 41. Minois, N, Khazaeli, Aa, and Curtsinger, Jw (2001) Locomotor activity as a function of age and life span in *Drosophila melanogaster* overexpressing hsp70. Exp Gerontol 36, Page.
- [0131] 42. Orr, Wc, and Sohal, Rs (1994) Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. Science 263, Page.
- [0132] 43. Partridge, L, and Gems, D (2002) Mechanisms of ageing: public or private? Nat Rev Genet 3, Page.
- [0133] 44. Guarente, L, and Kenyon, C (2000) Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. Nature 408, Page.
- [0134] 45. Puig, O, Marr, Mt, Ruhf, Ml, and Tjian, R (2003) Control of cell number by *Drosophila* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. Genes Dev 17, Page.
- [0135] 46. Junger, Ma, Rintelen, F, Stocker, H, Wasserman, Jd, Vegh, M, Radimerski, T, Greenberg, Me, and Hafen, E (2003) The *Drosophila* forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. J Biol 2, Page.
- [0136] 47. Giannakou, Me, and Partridge, L (2004) The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. Trends Cell Biol 14, Page.
- [0137] 48. Yamamoto, R, and Tatar, M Insulin receptor substrate chico acts with the transcription factor FOXO to extend *Drosophila* lifespan. Aging Cell 10, Page.
- [0138] 49. Kenyon, C, Chang, J, Gensch, E, Rudner, A, and Tabtiang, R (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. Nature 366, Page.
- [0139] 50. Kaeberlein, M Resveratrol and rapamycin: are they anti-aging drugs? Bioessays 32, Page.
- [0140] 51. Greer, El, and Brunet, A (2009) Different dietary restriction regimens extend lifespan by both independent and overlapping genetic pathways in *C. elegans*. Aging Cell 8, Page.
- [0141] 52. Dominici, Fp, Arostegui Diaz, G, Bartke, A, Kopchick, Jj, and Turyn, D (2000) Compensatory alterations of insulin signal transduction in liver of growth hormone receptor knockout mice. J Endocrinol 166, Page.
- [0142] 53. Bartke, A, Wright, Jc, Mattison, Ja, Ingram, Dk, Miller, Ra, and Roth, Gs (2001) Extending the lifespan of long-lived mice. Nature 414, Page.
- [0143] 54. Johnson, Te, Lithgow, Gj, and Murakami, S (1996) Hypothesis: interventions that increase the response to stress offer the potential for effective life prolongation and increased health. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 51, Page.

도면

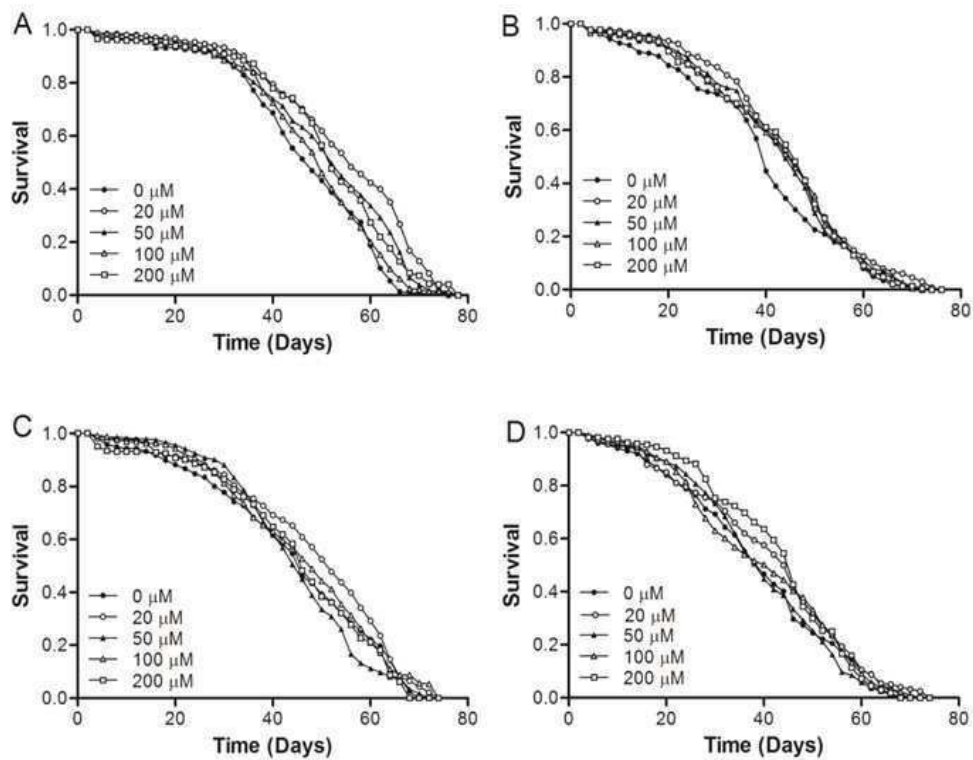
도면1



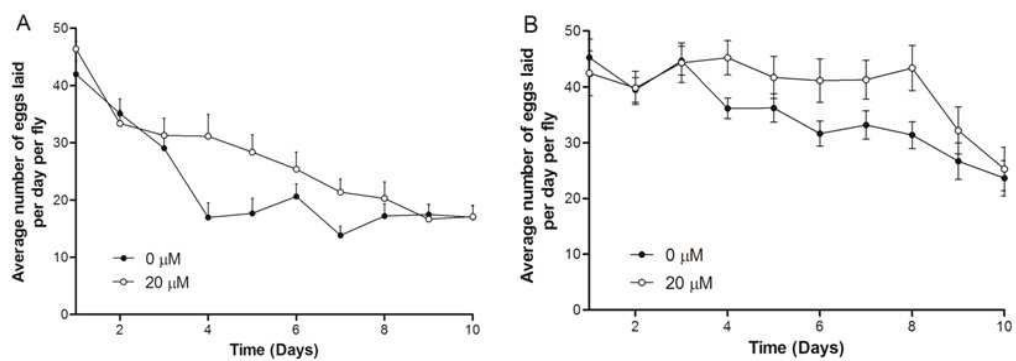
도면2



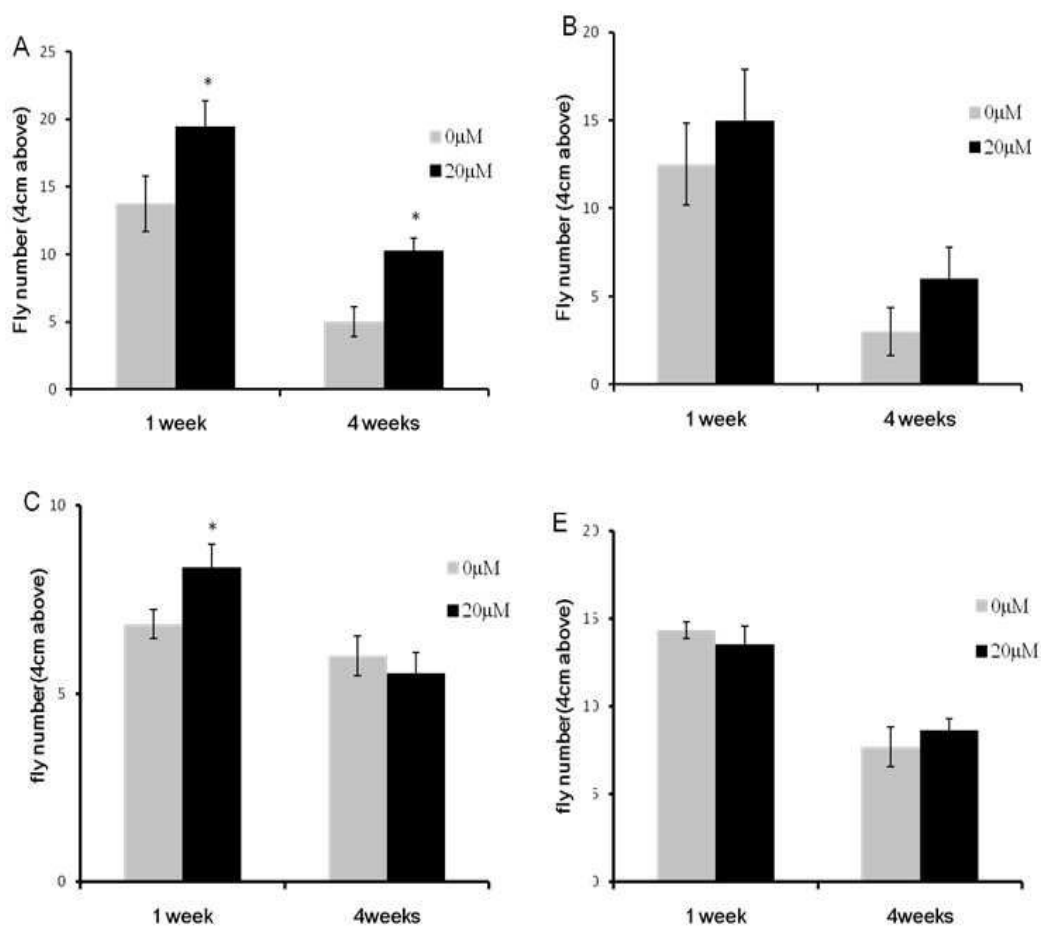
도면3



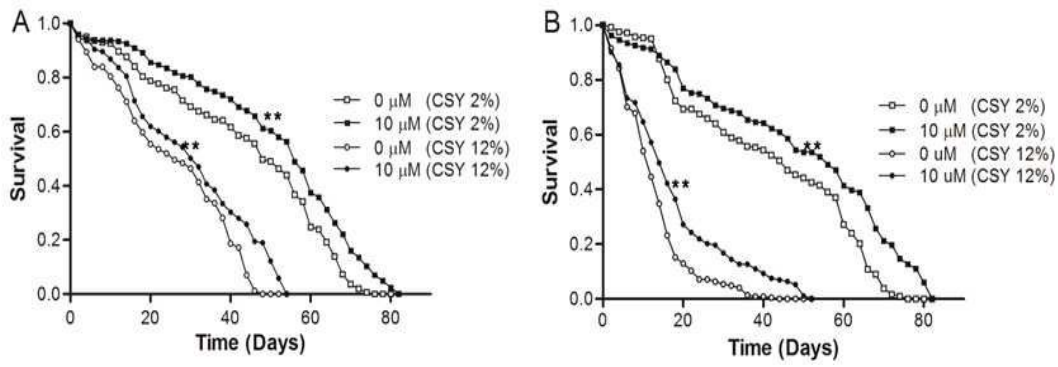
도면4



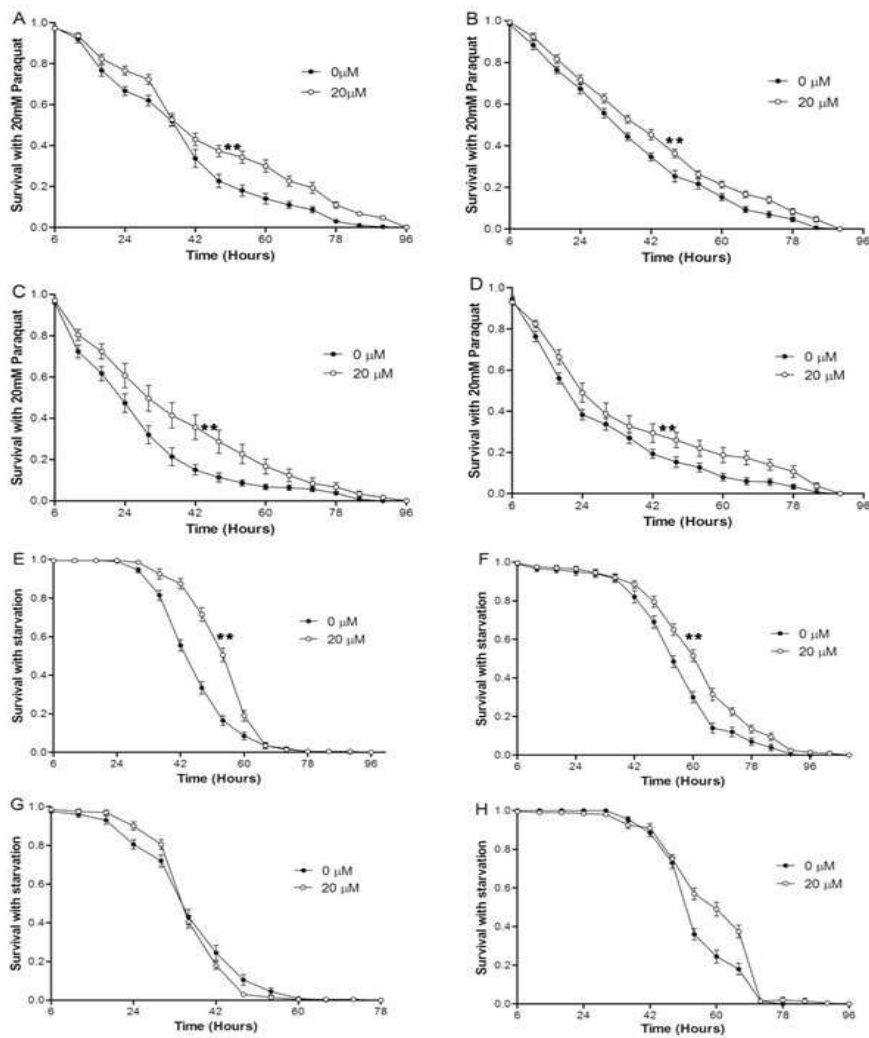
도면5



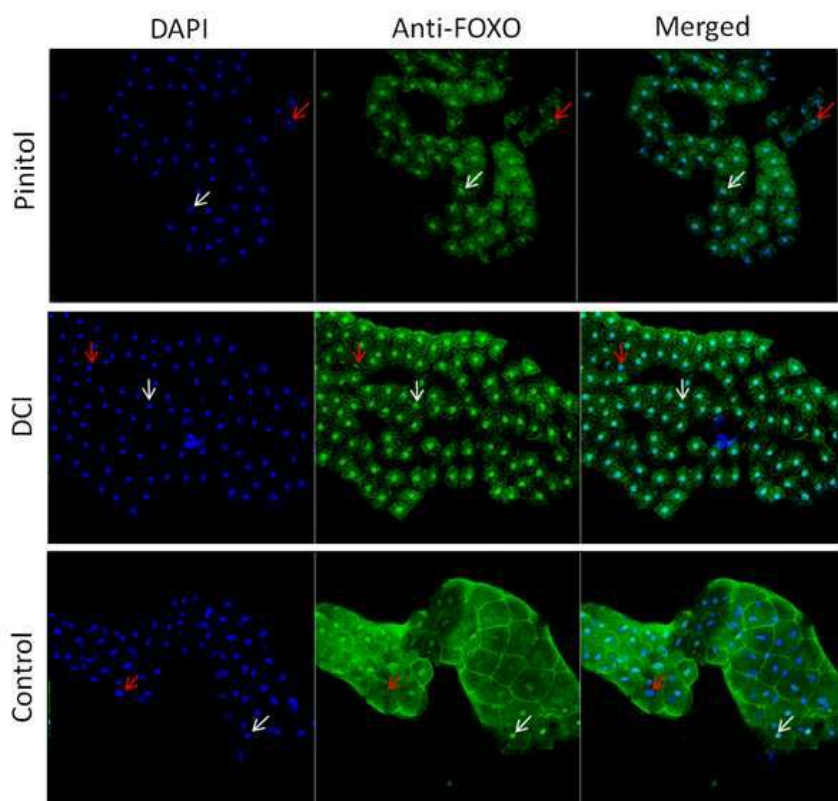
도면6



도면7



도면8



Compound	nucleus	anti-FOXO	merged
Pinitol	62	51	82.3%
DCI	104	103	98%
Control	80	31	38.8%