(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0123002
(43) 공개일자 2011년11월14일

(51) Int. Cl.
A61K 31/235 (2006.01) *A61K 31/11* (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0042410
(22) 출원일자 2010년05월06일
심사청구일자 2010년05월06일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
정성현
서울특별시 서초구 반포동 반포자이아파트 111동 1701호
황파
서울 동대문 휘경동 168-61
(74) 대리인
안소영

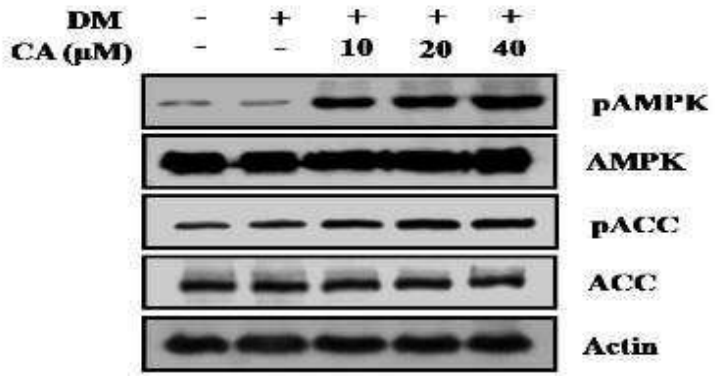
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) AMPK 활성화제

(57) 요 약

본 발명은 신남알데하이드를 유효성분으로 함유하는 AMPK 활성화제를 제공한다. 본 발명의 AMPK 활성화제는 AMPK 활성화효과가 뛰어나며, 그로 인해 비만, 2형 당뇨, 대사증후군, 알츠하이머형 치매 및 암 등의 예방 또는 치료에 효과적이다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

신남알데하이드를 유효성분으로 함유하는 AMPK(5' 아데노신 모노포스페이트-활성화 단백질 카이네이즈) 활성화제.

청구항 2

제1항에 있어서, 비만, 2형 당뇨, 대사증후군, 알츠하이머형 치매 및 암 중에서 선택된 하나 이상의 치료 또는 예방용인 AMPK 활성화제.

청구항 3

제1항 내지 제2항 중 어느 한 항에 있어서, 약학 조성물 또는 식품조성물인 AMPK 활성화제.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 AMPK 활성화제에 관한 것으로, 보다 상세하게는 비만, 2형 당뇨, 대사증후군, 알츠하이머형 치매 및 암의 치료 또는 예방에 효과적인 AMPK활성화제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] AMPK 활성화제는 AMPK(5'AMP-활성화 단백질 카이네이즈; 5' 아데노신 모노포스페이트-활성화 단백질 카이네이즈)의 활성을 증가시키는 물질로, AMPK는 세포 에너지 항상성에 중요한 역할을 하는 효소이다. AMPK를 활성화시킴으로써, 2형 당뇨, 대사증후군, 비만, 암, 퇴행성질환 (치매) 등의 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다는 것이 알려져 있어, AMPK 활성화제에 대한 연구가 지속되고 있다{AMPK and the biochemistry of exercise: Implications for human health and disease. Biochem J 418(2), 261-275 (2009), Mechanisms linking obesity, chronic kidney disease, and fatty liver disease: the roles of fetuin-A, adiponectin, and AMPK. J Am Soc Nephrol 2010 Mar.; (21) 3: 406-12}.

[0003] 한편, 신남알데하이드와 관련하여 AMPK활성화 효과는 전혀 알려진 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는 AMPK활성화제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명은 신남알데하이드를 유효성분으로 함유하는 AMPK(5' adenosine monophosphate-activated protein kinase; 5' 아데노신 모노포스페이트-활성화 단백질 카이네이즈) 활성화제를 제공한다.

[0006] 상기 신남알데하이드는 구입하거나, 계지에서 추출한 것일 수 있다.

[0007] 상기 신남알데하이드는 활성화제 총 중량에 대하여 1~10 중량%로 포함할 수 있으며,1 중량% 미만에서 효과가 충분하지 않을 염려가 있고, 10 중량%초과에서 효과가 더 이상 커지지 않을 가능성이 있다.

[0008] 상기 AMPK 활성화제는 이로써 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 비만, 2형 당뇨, 대사증후군, 알츠하이머형 치매 및 암 중에서 선택된 하나 이상의 치료 또는 예방용일 수 있다.

[0009] 상기 AMPK 활성화제는 약학 조성물 또는 식품조성물일 수 있다. 상기 식품조성물에 있어서, 치료 또는 예방은 개선 또는 방지를 포함하는 의미이다. 상기 식품조성물은 건강기능식품일 수 있으며, 제형은 통상의 방법에 따라 제조하며, 담체와 함께 건조한 후 캡슐화하거나 기타 정제, 과립, 분말, 음료, 죽 등의 형태로 제형화할 수 있으며, 상기 기재한 것 외에도 모든 식품 형태로 제조 가능하다.

[0010] 상기 신남알데하이드는 AMPK 활성화 작용을 나타낸다.

[0011] 따라서, 본 발명은 신남알데하이드의 AMPK 활성화 용도를 제공한다.

[0012] 또한, 신남알데하이드의 AMPK 활성화제 제조를 위한 용도를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 신남알데하이드를 필요로 하는 포유류(인간을 포함함)에게 투여하는 단계를 포함하는 AMPK 활성화방법을 제공한다.

[0014] 별도의 언급이 없는 한, 본 발명의 AMPK 활성화제에 관한 내용은 본 발명의 AMPK 활성화 용도, AMPK 활성화제 제조 용도, AMPK 활성화방법에도 동일하게 적용된다.

[0015] 상기 신남알데하이드와 그를 포함하는 AMPK 활성화제는 인간을 포함한 포유류에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며, 유효성분을 약학적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 제제화하여 투여할 수 있다. 제제화할 경우 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 신남알데하이드에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스, 및 젤라틴 등을 첨가하여 제조한다. 또한, 마그네슘, 탈크 등 윤활제도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 주사가능한 액제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 비강세척제 및 좌제가 포함된다. 주사가능한 액제, 현탁제, 유제는 물, 비수성용제나 현탁용제와 유효성분을 혼합하여 제조할 수 있으며, 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등일 수 있다.

[0016] 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및 젤라틴 등의 사용될 수 있다. 상기 신남알데하이드 또는 그를 포함하는 AMPK 활성화제는 비경구 투여시 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사로 투여가능하다.

[0017] 본 발명의 AMPK 활성화제, 용도 및 방법에 있어서, 신남알데하이드 기준으로 성인 기준 1일 10~50 mg/kg의 용량으로 사용가능하다.

[0018] 상기 신남알데하이드는 약학적으로 또는 식품학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제 등을 첨가하여 제제화할 수 있으며, 제제화에 관한 내용은 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA 등의 문헌을 참조할 수 있다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 AMPK 활성화제는 AMPK 활성화 효과가 뛰어나며, 그로 인해 비만, 2형 당뇨, 대사증후군, 알츠하이머형 치매, 암 등의 예방 또는 치료에 효과적이다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 신남알데하이드를 동물에 투여한 후 지방조직에서 AMPK 단백질의 발현을 웨스턴 블롯 방법으로 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] <실시예 1> 신남알데하이드의 AMPK 활성화 효과 확인

[0022] 1-1. 신남알데하이드의 준비

[0023] 신남알데하이드를 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) 에서 구입하였다. 상기 신남알데하이드는 세포실험의 경우 0.01% dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해시켜 사용하였고, 동물실험의 경우 0.5% sodium carboxymethyl cellulose에 용해시켜 사용하였다.

[0024] 1-2. 세포의 준비 및 처리

[0025] 3T3-L1 지방전구세포를 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입하여 사용하였다. 세포배양은 10% FBS(fetal bovine serum), 페니실린(100U/ml), 스트렙토마이신(100U/ml)을 포함한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지(Gibco)를 사용하였고, CO_2 배양기에 섭씨 37도, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 3T3-

L1 preadipocyte는 분화유도 배지 (5% fetal bovine serum, 0.5 mM isobutylmethylxanthine, 1mM dexamethasone 그리고 10 μg/mL 인슐린이 포함된 DMEM)와 신남알데하이드 (20 μM, 40 μM)를 함께 처리 하여 2일 간격으로 교환하고 총 4일 동안 배양한 후 10 μg/mL 인슐린이 포함된 DMEM으로 교환하여 2일을 더 배양하였다. 그 후 FBS만 포함된 DMEM으로 2일 배양하여 총 8일 동안 분화 유도하였다.

[0026] 1-3. AMPK 활성화 효과 확인

[0027] 상기 1-2.에서 준비한 지방세포를 이용하여 Western blot 방법으로 AMPK 활성화 효과를 확인하기 위한 실험을 하였다.

[0028] 단백질 분석을 위해 지방세포를 lysis buffer로 균질화 하였다. 단백질 정량은 Bio Rad assay reagent (Bio-Rad, USA)를 이용하여 측정하였으며, 정량한 단백질 20 μg을 8% SDS-PAGE로 분리하였다. 이 후 gel을 membrane (Milipore, Cat. No: IPVH00010)에 transfer 하고 5% skim milk로 상온에서 1시간 blocking하였으며 1:1000 비율로 희석시킨 primary antibody (P-AMPK, Cell Signaling, 2531; AMPK, Cell Signaling, 2532; P-ACC, Cell Signaling, 3661; ACC, Cell Signaling, 3662)와 4℃에서 overnight 반응하였다. Tris-buffered saline tween-20 (TBST)로 3번 washing 한 후 1:2000 비율로 희석시킨 secondary antibody(Santa Cruz, sc-2313)와 상온에서 1시간 반응시켰다. 이후 TBST로 3번 washing하고 ECL solution (Amersham, Sweden)을 이용하여 X-ray 필름에 developing하였다.

[0029] 그 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1은 AMPK 및 ACC의 활성의 발현을 Western blot 방법으로 확인한 결과를 나타낸 도이다. 도 1의 DM은 분화유도배지를 의미하고, CA는 신남알데하이드를 의미하고, - 는 해당 성분으로 처리하지 않은 것, + 는 처리한 것을 의미하며, 각각의 숫자는 농도(uM)를 의미한다. 또한, pAMPK는 인산화된 AMPK 단백질양을 의미하고, AMPK는 base level의 AMPK 단백질양을 의미한다. 마찬가지로 pACC는 인산화된 ACC 단백질양을 의미하고, ACC는 base level의 ACC 단백질양을 의미하며, Actin은 loading control로서 대조군 단백질을 의미한다.

[0030] 상기 결과로 부터 신남알데하이드는 농도의존적으로 AMPK의 인산화를 증가시킴을 알 수 있다. 그 결과 신남알데하이드는 AMPK를 활성화함을 알 수 있다. 또한, Acetyl-CoA carboxylase(ACC)는 지방대사가 증가할 경우에 생성되는 효소 물질 중 하나로서 신남알데하이드에 의한 상기 AMPK의 활성화에 의해 지방산 합성에서 ACC 등 핵심 효소를 억제함으로써 ATP의 추가적 사용을 억제하여 그와 관련된 비만, 대사증후군, 2형 당뇨, 알츠하이머형 치매, 암 등의 치료 또는 예방에 효과적임을 알 수 있다.

[0031] 1-4. 동물의 준비 및 처리

[0032] 5주령 수컷 ICR(Imprinting Control Region) 마우스((주) 오리엔트)를 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 식사방법인 과식(overfeeding)과 에너지 과밀도 식사(energy dense diet)를 제공하여 비만을 유도하는 DIO(diet-induced obese) 모델로 변형시켰다. 실험군은 정상식이(10% Kcal% fat, Research DIETS)를 제공한 대조군, 고지방식이(45% Kcal% fat, Research DIETS)를 섭취시킨 고지방식이군, 고지방식이와 실시예 1-1.의 신남알데하이드(20mg/kg)를 투여한 실시예 1-1(20mg/kg) 투여군, 고지방식이와 실시예1-1.의 신남알데하이드(40mg/kg)를 투여한 실시예 1-1(40mg/kg) 투여군으로 나누었다. 실시예 1-1.의 신남알데하이드는 하루에 한 번 2주간 경구로 투여하였으며, 체중과 혈당은 매주 측정하고, 혈중 인슐린, 트리글리세라이드, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 혈장 nonesterified fatty acid(NEFA)는 실험종료시 측정하였다. 신남알데하이드는 투여시 0.5% CMC (carboxymethylcellulose)에 용해하여 투여하였다.

[0033] 체중은 체중계(OHAUS, Adeventurer Pro AVG812)로 측정하고, 혈당은 SMARTLAB(Erba, USA)기기로 측정하였다. 혈중 인슐린, 트리글리세라이드(TG), 총 콜레스테롤(TC), HDL-콜레스테롤(HDL-cholesterol), 혈장 nonesterified fatty acid(NEFA), GOT(Glutamic oxaloacetic transaminase), GPT(Glutamic pyruvic transaminase), BUN(Blood urea nitrogen)은 각각 심장에서 혈액을 채취한 후 4℃에서 원심분리하여 혈청을 취하여 ELISA reader (Labsystems, Finland) assay로 측정하였다. 또한, 인슐린 저항성 지표인 HOMA-IR(homeostasis model assessment of insulin resistance)수치를 계산하였다. 그 계산 방법은 Insulin (μU/mL) × glucose (mM)/22.5 이다.

[0034] 데이타의 통계처리는 SPSS 14.0 통계 프로그램을 이용하여 산출한 평균±표준편차로 $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ 수준에서 일원배치 분산분석법 (one-way analysis of variance)을 시행하고 LSD(최소유의차검정법)로 각 실험군 평균치간의 유의성을 검정하였다.

[0035] 1-5. 항비만 효과 확인

[0036] 상기 1-4.에서 처리한 마우스에 대한 체중 측정 결과를 다음 표에 정리하였다.

[0037] [표 1]

군	체중(g)		체중증가량(g)
	최초	종료	
대조군	31.3 ± 1.6	32.1 ± 2.0	1.4 ± 0.5
고지방식이군	31.7 ± 1.1	42.1 ± 2.1†††	10.4 ± 2.2†††
실시예 1-1(20mg/kg) 투여군	31.6 ± 1.7	41.0 ± 1.4*	8.9 ± 2.3*
실시예 1-1(40mg/kg) 투여군	31.7 ± 1.2	35.1 ± 3.0***	3.4 ± 3.3***

상기 표에서 데이타는 평균±표준편차, $^{\dagger\dagger\dagger}p<0.001$ vs. 대조군, $^{*}p<0.05$,

[0038] $^{***}p<0.001$ vs. 고지방식이군 을 의미한다.

[0039] 상기 표에서 보는 바와 같이, 고지방식이군은 대조군에 비해 체중 증가량이 현저하여 비만이 유도되었음을 확인할 수 있다. 고지방식이군과 동일한 조건에서 신남알데하이드를 투여한 경우, 신남알데하이드에 농도의존적으로 체중 증가량이 감소함을 알 수 있다. 따라서, 신남알데하이드는 항비만 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[0040] 1-6. 항당뇨 효과 확인

[0041] 상기 1-4.에서 처리한 마우스에 대한 혈당과 혈중 인슐린 측정 결과를 다음 표에 정리하였다.

[0042] [표 2]

군	혈당(mg/dL)	Insulin (μU/ml)	HOMA-IR
대조군	86 ± 6.7	60.2 ± 4.1	13.5 ± 1.3
고지방식이군	131 ± 3.7†††	162.7 ± 9.3†††	52.3 ± 3.9†††
실시예 1-1(20mg/kg) 투여군	102 ± 6.6**	138.6 ± 5.1*	39.8 ± 5.5*
실시예 1-1(40mg/kg) 투여군	87 ± 5.5***	96.4 ± 6.9***	23.6 ± 2.5***

표에서 데이타는 평균±표준편차, $^{\dagger\dagger\dagger}p<0.001$ vs. 대조군, $^{*}p<0.05$, $^{**}p$

[0043] <0.01, $^{***}p<0.001$ vs. 고지방식이군을 의미한다.

[0044] 상기 표에서 보는 바와 같이, 고지방식이군은 대조군에 비해 혈당과 혈중 인슐린이 대조군에 비해 높은 농도로 나타나나, 신남알데하이드 투여군은 농도의존적으로 농도가 감소함을 알 수 있다. 또한, HOMA-IR 값 역시 신남알데하이드 투여군이 고지방식이군에 비해 감소함을 알 수 있다.

[0045] 따라서, 신남알데하이드는 혈당 감소, 혈중 인슐린 농도 감소, 인슐린 감수성 개선 등에 의해 2형 당뇨, 대사증후군, 알츠하이머형 치매 등의 치료 또는 예방에 효과적임을 알 수 있다.

[0046] 1-7. 혈액지표 분석

[0047] 상기 1-4.에서 처리한 마우스에 대한 NEFA, 혈당과 혈중 인슐린 측정 결과를 다음 표에 정리하였다.

[0048] [표 3]

군	대조군	고지방식이군	실시예 1-1(20mg/kg) 투여군	실시예 1-1(40mg/kg) 투여군
NEFA	880.3 ± 45.9	1357.0 ± 16.6†††	1207.8 ± 71.5*	936.0 ± 38.9***
Cholesterol (mg/dL)	106.3 ± 2.7	182 ± 3.6†††	151.7 ± 5.5**	141.3 ± 5.6***
HDL-cholesterol (mg/dL)	0.29 ± 0.1	0.16 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.28 ± 0.02
TG (mg/dL)	89 ± 0.3	142.7 ± 8.8†††	107 ± 4.3**	89.3 ± 4.9***
GOT (U/L)	39.0 ± 3.47	97.2 ± 0.2†††	59.7 ± 4.01***	50.3 ± 4.22***
GPT (U/L)	14.4 ± 1.4	23.1 ± 1.3††	24.0 ± 1.7	17.5 ± 0.8*
BUN (mg/dL)	12.1 ± 0.5	14.1 ± 1.5	12.7 ± 0.5	17.0 ± 2.0

표에서 데이타는 평균±표준편차, $^{\dagger\dagger\dagger}p<0.001$ vs. 대조군, $^{*}p<0.05$,

[0049] $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ vs. 고지방식이군을 의미한다.

[0050] 상기 표에서 보는 바와 같이, 고지혈증, 동맥경화 등과 관련된 콜레스테롤의 경우 고지방식이군에서 대조군에 비해 증가하나, 신남알데하이드 투여에 의해 농도의존적으로 감소하는 경향을 나타냄을 알 수 있다.

[0051] 또한, 중성지방과 관련된 혈중 유리지방산 NEFA의 경우 고지방식이군에서 대조군에 비해 증가하나, 신남알데하이드 투여에 의해 농도의존적으로 감소하는 경향을 나타냄을 알 수 있다.

[0052] 따라서, 신남알데하이드는 metabolic sensor에 해당하는 단백질인 AMPK의 활성화와 그로 인한 지방산 산화촉진 혈당치 및 지질 프로파일이 개선되는 활성 등을 나타내어, 그와 관련된 비만, 2형 당뇨, 대사증후군, 알츠하이머형 치매 및 암 등의 치료 또는 예방에 효과적임을 알 수 있다.

[0053] <제조예 1> 약학 조성물의 제조

[0054] 실시예 1-1의 신남알데하이드 20mg, 옥수수 전분 100mg, 유당 100mg, 스테아린산 마그네슘 2mg을 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0055] <제조예 2> 식품 조성물의 제조

[0056] 실시예 1-1의 신남알데하이드(4중량 %), 액상과당(0.5중량%), 올리고당(2중량%), 설탕(2중량%), 및 식염(0.5중량%)에 물을 추가하여 잔량을 맞춘 후 균질하게 배합하여 순간 살균을 하여 건강음료를 제조하였다.

도면

도면1

