(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년06월17일
(11) 등록번호 10-0839185
(24) 등록일자 2008년06월11일

(51) Int. Cl.
A61K 31/7028 (2006.01) *A61K 36/68* (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0034732
(22) 출원일자 2007년04월09일
심사청구일자 2007년04월09일
(56) 선행기술조사문헌
JP2003026694 A
KR100157298 B1
KR1020030059952 A

(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 심품공학과411호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인아주

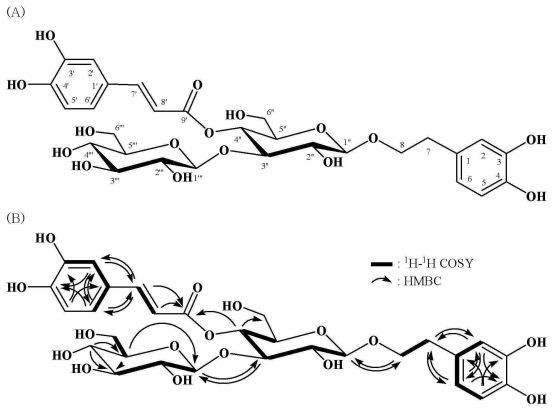
전체 청구항 수 : 총 10 항 심사관 : 이종국

(54) 플랜타마조사이드를 유효성분으로 함유하는 당뇨 및당뇨합병증 예방/치료용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 플랜타마조사이드를 유효성분으로 하는 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 의하면, 부작용과 독성이 없고 종래의 당뇨/당뇨 합병증 억제물질보다 효능이 증대된, 플랜타마조사이드를 유효성분으로 하는 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물이 제공된다. 이는 천연식물에서 유래되어 안전성이 보강된 것으로, 건강기능식품 소재나 의약품으로 널리 사용될 수 있다.

대표도 - 도10



(72) 발명자

홍충의

서울 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대학 동관 식품공학과411호

정성훈

서울 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대학 동관 식품공학과411호

김종탁

서울 금천구 가산동 60-18 한신IT 타워2차 9층

특허청구의 범위

청구항 1

플랜타마조사이드를 유효성분으로 하는 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 플랜타마조사이드는 질경이(*Plantago asiatica*)로부터 유래하는 것인 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, AGE(Advanced glycation end-product)를 억제하는 기작으로 작용하는 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제1항의 조성물을 포함하는 당뇨/당뇨합병증 개선을 위한 건강기능식품.

청구항 5

제1항의 조성물을 포함하는 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 의약품.

청구항 6

i) 질경이의 알콜 추출물을 수득하여 분말화하는 단계;

ii) 단계 i)에서 얻어진 분말을 물에 녹인 후 1종 이상의 유기 용매를 이용하여 극성에 따라 순차적으로 추출하는 단계; 및

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

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 질경이의 알콜 추출물은 질경이를 알콜에서 환류 냉각 추출하고, 이를 원심분리하여 얻은 상등액을 건조시켜 얻어지는 것인, 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물의 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 유기 용매 추출은 헥산, 글로로포름, 에틸아세테이트, 및 부탄올의 순서로 수행되는, 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물의 제조방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 젤 여과 크로마토그래피는 silca gel 60 또는 Sepadex LH-20 컬럼을 이용하여 수행되는, 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 젤 여과 크로마토그래피의 용출은 에틸아세테이트 및 메탄올의 혼합용액을 이용하여 수행되는, 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물의 제조방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<11> 본 발명은 플랜타마조사이드를 유효성분으로 하는 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

<12> 당뇨병은 인슐린의 분비량이 부족하거나 정상적인 기능이 이루어지지 않아 혈중 포도당 농도가 높아지는 질환이다.

<13> 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.

<14> 이러한 최종당화산물(AGEs)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.

<15> 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.

<16> 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.

<17> 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.

<18> 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

<19> 본 발명의 목적은 당뇨/당뇨 합병증의 예방 또는 치료용으로 사용될 수 있는 단일 물질 및 이를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

<20> 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 물질을 포함하는 건강기능식품 및 의약품을 제공하는 것이다.

<21> 아울러, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 물질의 제조방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<22> 상기 목적을 달성하기 위하여,

<23> 본 발명의 일 측면에 따르면, 플랜타마조사이드를 유효성분으로 하는 당뇨 및 당뇨 합병증의 예방/치료용 조성물을 제시할 수 있다.

<24> 당뇨병은 인슐린의 분비량이 부족하거나 정상적인 기능이 이루어지지 않아 혈중 포도당 농도가 높아지는 질환이다.

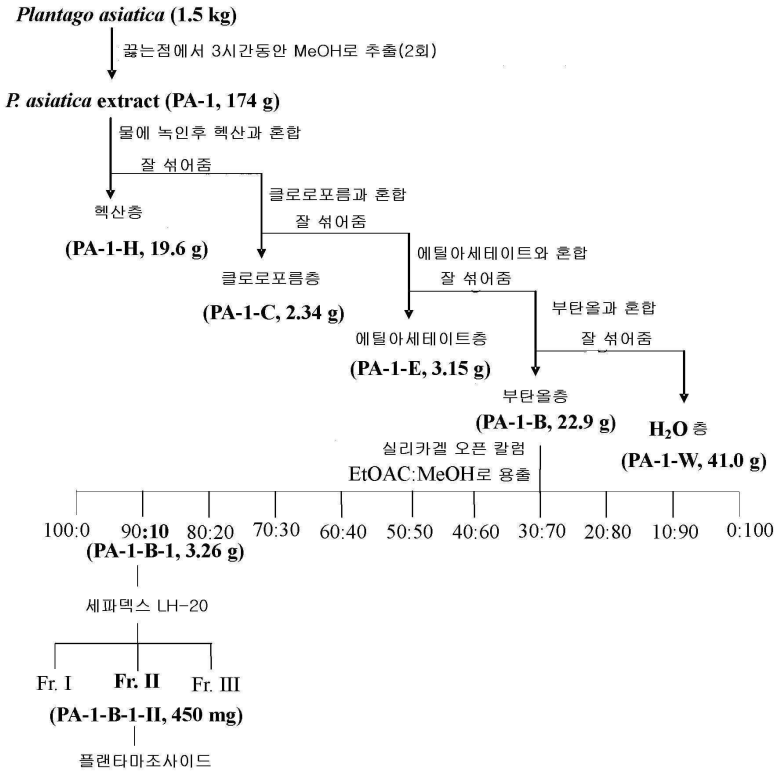
<25> 이렇게 농도가 높아진 당의 카르보닐기와 단백질, 핵산, 인지질의 아미노기가 일련의 비효소적 반응을 포함하여 아마도리 재배열과 비산화적, 산화적 변형에 의한 취프 베이스(Schiff base)를 형성하여 최종당화산물(advanced glycation end-products, AGEs)을 형성한다.

<26> 이러한 최종당화산물(AGEs)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 중요한 인자로 알려져 있다.

<27> 본 발명자는 천연식물인 질경이 (차전초, *Plantago asiatica*)에서 분리·정제한 플랜타마조사이드 및 이것을 포함하는 분획물이 상기 AGEs의 생성을 크게 억제함으로써 당뇨 또는 당뇨 합병증의 예방/치료에 사용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

<28> 아래에 본 발명의 일 실시예에 따라 질경이로부터 플랜타마조사이드를 분리정제하는 과정을 나타내었다.

<29> [개요도 1]



<30>

<31> 본 발명자 등은 우선, 질경이 알콜 추출물(이하, PA-1이라 칭함, 상기 개요도 1 참조)이 AGEs의 생성을 억제함으로써 당뇨/당뇨합병증 억제능을 가지는지 여부를 살펴본 결과, 처리 농도 1000 μg/mL에서 74.1 ± 1.6 %, 100 μg/mL에서는 69.4 ± 1.0 %, 10 μg/mL에서 62.5 ± 2.3 %, 1 μg/mL에서 51.5 ± 3.1 %, 0.1 μg/mL에서 41.1 ± 1.8 %의 높은 글리케이션 억제 활성을 보임을 확인할 수 있었다).

<32> 이 질경이 알콜 추출물(PA-1)을 물에 녹인 뒤 유기용매의 극성도를 달리하여 순차적으로 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올을 이용하여 분액깔대기로 분획화한 결과, 부탄올 층(PA-1-B)이 높은 당뇨/당뇨합병증 억제 활성을 보였다 (도 1 참고, 1000 μg/mL의 농도에서 74.6 ± 2.2 %, 100 μg/mL에서는 67.1 ± 2.2 %, 10 μg/mL에서 59.6 ± 0.9 %, 1 μg/mL에서 51.8 ± 0.4 %, 0.1 μg/mL에서 48.2 ± 0.2 %). 이어, 상기 부탄올 추출 획분에 대하여 silica gel 순상 크로마토그래피를 수행하였다. 이동상 조건은 PA-1-B 획분이 부탄올 층임을 감안하여 100% 에틸아세테이트 (극성도 4.4.) → 100% MeOH (극성도 5.1)로, 단계별로 MeOH 농도 (10% 씩)를 증가시키면서 컬럼 용량의 5배 이상의 이동상을 용출시켰다(개요도 1 참조). 이 과정에서 각 단계마다의 분리를 명확하게 하기 위하여 용출되어 나온 물질의 흡광도가 280nm에서 0.3 이하가 될 때까지 용출하였다.

<33> 상기와 같이 용출되어 나온 각 획분을 농축하여 건조 후 당뇨/당뇨합병증 억제능을 측정한 결과, 90% 에틸아세테이트 + 10% MeOH에서 용출된 PA-1-B-1 획분의 활성이 1000 μg/mL의 농도에서 74.4 ± 0.6 %, 100 μg/mL에서는 60.3 ± 0.1 %, 10 μg/mL에서 50.7 ± 1.9 %, 1 μg/mL에서 41.3 ± 0.9 %, 0.1 μg/mL에서 21.4 ± 1.0 %의 높은 활성을 보임을 알 수 있었다. 이 획분에 대하여 Sephadex LH-20 column을 이용하여 이동상의 조건을 (D.W. 80% : MeOH 20%) → (D.W. 0% : MeOH 100%)로 하여 농도구배를 걸어 3가지 획분을 얻었다(도 3 참조). 이 3가지 획분 중 높은 흡광도를 보이는 PA-1-B-1-Ⅱ가 단일물질 획분임을 확인(도 4 참조)하고 NMR을 이용한 구조분석을 수행하였다.

<34> 대부분의 유기화합물의 관능기들은 자외선 영역의 전자기파를 흡수하는데, 포화 유기분자는 근자외선 및 가시광선(200~800 nm)에서 전혀 흡수가 없지만, C=C, C-O 등의 다중결합과 같은 발색단(chromophore)이 존재하면 흡수가 일어난다. 따라서 정제된 PA-1-B-1-Ⅱ 획분의 구조적 특징을 규명하기 위하여, 이 물질의 UV 스펙트럼 스캐닝을 실시한 결과, 290 nm와 330 nm 근처에서 높은 흡광도를 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

<35> 또한, PA-1-B-1-Ⅱ 획분의 구조를 파악하기에 앞서 기본적으로 가지고 있는 작용기 그룹의 특징을 파악하고자 IR 스펙트럼을 실시하였다. 그 결과, (도 5 참조), 3400 cm^{-1}에서 OH 신축진동(stretching vibration, υ(O-

H)), 1701 cm^{-1}에서 공액 에스테르(njugated ester)(C=O), 1632 cm^{-1}에서 공액 이중결합(conjugated double bond) (C=C), 1609, 1522 cm^{-1}에서 방향족 환(aromatic ring)(C=C), 1450 cm^{-1}에서 CH_2, 1389 cm^{-1}에서 CH_3 구조를 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 이로부터 PA-1-B-1-Ⅱ 획분의 글리케이션 억제물질은 방향족 환을 가지고 있음을 추정할 수 있다.

<36> 조그만 자석과 같은 원자핵에 자기장을 걸면, 무질서하게 흩어져 있던 핵들이 몇 가지 에너지 상태로 배열하게 된다. 원자핵은 이들 각 상태들의 에너지 차이에 해당하는 만큼의 전자기파를 흡수하여 낮은 에너지 상태에서 높은 에너지 상태로 옮겨간다. 이것을 공명현상이라고 한다. 이러한 기법을 이용해 2차원적인 측면에서 수소간의 결합이나 수소와 탄소의 결합을 해석한다. 또한 CI-MS를 이용하여 분자량을 측정하는데, PA-1-B-1-Ⅱ 획분의 글리케이션 억제 물질의 분자량은 m/z 641$[M+H]^+$과 m/z 663$[M+Na]^+$을 통하여 640임을 확인할 수 있었다(도 6 참조).

<37> 일반적으로 ^{1}H-NMR을 이용하면 물질의 산화도 패턴(oxygenation pattern), 메톡실기의 수 및 당의 존재와 결합 위치 등을 알 수 있다. 일반적으로 6 ppm 이상에서는 방향족 수소가, 5 ppm 이하에서는 지방족 수소가 검출되는데, PA-1-B-1-Ⅱ 획분의 글라이케이션 억제활성을 가지고 있는 단일물질의 ^{1}H-NMR 스펙트럼 (도 7 참조)을 보면 6 ppm 이상 부근에서 방향족 피크를 확인할 수 있었다. ^{1}H-NMR 스펙트럼의 5.1 ppm 에 이중 피크(doublet peak)인 7"-양성자와 메톡실 (3.77 ppm) 그리고 커플링이 없는 6-양성자와 2"-양성자가 있음을 확인할 수 있었고, 또한 아주 약하게 커플링을 하는 7.02 ppm 이 2"-양성자라는 것을 알 수 있었다. COSY의 결과 (도 9 참조)를 보면 7"와 커플링을 하는 것은 8"-양성자밖에 없으니 4.24 ppm 에 보이는 것이 8"-양성자이고 또한 8"-양성자와 연결되는 것이 9"-양성자이므로 3.39 ppm과 연결되는 부분이 약하게 나오고 또한 그것과 강한 커플링을 하는 것이 3.65 ppm에 나오는 것을 확인하였고 3.65 ppm, 3.39 ppm 의 피크가 9"-양성자임을 확인하였다. 3.39 ppm 부근의 브로드한 부분은 물(H_2O) 피크인데, 이 부분에 9"-양성자가 하나 숨어 있다는 것을 알 수 있으며 2'-양성자와 3'-양성자, 5"-양성자와 6"-양성자 사이에도 교차 피크(cross peak)를 볼 수 있었다. HMQC (도 9 참조)의 결과로부터 5-OH(b)의 양성자가 나온 이유는 5개의 -OH 피크 중 6-탄소와 연관이 되는 것은 ^{1}H NMR 11.92 ppm인 5-OH(b)라는 것을 확인하였다. 또한 5-OH(b)에서 각각 2-결합(5-탄소), 3-결합(6, 10-탄소), 4-결합(4, 7-탄소) 들과 연결이 되어 있으며, 7"-H 피크를 따라 내려오면 6개의 칸투(contous)와 만나게 되는데 그들은 각각 2-결합(1", 8"-탄소), 3-결합(2", 6", 9", 7-탄소) 임을 확인하였다.

<38> 위의 스펙트럼 분석데이타를 기초로 하여, 질경이로부터 얻은 PA-1-B-1-Ⅱ 획분의 당뇨/당뇨합병증 억제 효능물질은 플랜타마조사이드(plantamajoside)로 최종 확인되었다.

<39> 상기 플랜타마조사이드의 당뇨/당뇨합병증 억제능 측정 실험인 글리케이션 억제능을 측정한 결과(표 4 참조), 10 mM, 25 mM에서 각각 95.2±0.2%와 96.1±0.2% 글리케이션 억제 활성을 보였으며, 기존에 당뇨 / 당뇨합병증 억제 효능물질로 잘 알려져 있는 아미노구아니딘의 경우 10 mM, 25 mM에서 각각 89.8±0.6%와 95.0±0.9%의 글리케이션 억제 활성을 보였다.

<40> 위 결과로부터, 질경이에서 분리·정제한 단일물질인 플랜타마조사이드가 기존에 당뇨/당뇨합병증 억제 효능물질로 잘 알려져 있는 아미노구아니딘보다 더 높은 당뇨/당뇨합병증 억제 활성을 보임을 확인할 수 있으므로, 플랜타마조사이드를 유효성분으로 포함하는 조성물은 당뇨/당뇨합병증의 예방 또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

<41> 본 발명에서 플랜타마조사이드는 질경이로부터 분리, 정제되었으나, 질경이과에 속하는 다른 식물 및 플랜타마조사이드가 존재하는 여러 식물에서 분리할 수 있으며, 이러한 천연물에서 분리하는 것만이 아니라 화학적으로 합성하여 사용하여도 무방하다.

<42> 또한, 본 발명의 다른 일 측면에 따르면, 상기 플랜타마조사이드를 유효성분으로 함유하는 조성물을 포함하는 건강기능식품을 제시할 수 있다.

<43> 앞에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 플랜타마조사이드 및 이를 포함하는 질경이 추출물(또는 분획물)은 기존 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료제로 사용되었던 아미노구아니딘보다 글리케이션 억제 효과가 높으므로, 당뇨/당뇨합병증의 예방 또는 치료를 위한 건강기능식품 소재로 유용하게 사용될 수 있다.

<44> 상기 건강기능식품은 최종 제품의 상품성과 소비자 기호도에 따라 다른 식품소재를 첨가하여 제조될 수 있다.

<45> 유효 성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 플랜타마마조사이드를 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.

<46> 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 포함한다.

<47> 본 발명의 건강기능식품은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

<48> 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 간은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

<49> 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 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

<50> 아울러, 본 발명의 또다른 일 측면에 따르면 상기 조성물을 포함하는 의약품을 제시할 수 있다.

<51> 따라서, 본 발명의 조성물은 최종당화산물의 생성에서 기인되는 당뇨 또는 당뇨성 망막병증, 당뇨성 백내장, 당뇨성 신증, 당뇨성 신경병증 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.

<52> 본 발명의 조성물은 상기 플랜타마조사이드에 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.

<53> 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.

<54> 통상적으로 담체는 전분, 밀크, 당, 특정종류의 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.

<55> 본 발명의 플랜타마조사이드를 유효성분으로 함유한 조성물을 투여하기 위한 제제는 통상적인 방법으로 경구, 정맥내, 근육내, 경피 투여의 방법에 의해 투여할 수 있지만, 이들 방법에만 한정되는 것은 아니다. 실제 임상 투여시에 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.

<56> 또한, 본 발명의 조성물은 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사에 의한다. 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위해서는 상기 플랜타마조사이드를 포함하여 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제제한다.

<57> 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 플랜타마조사이드를 유효성분으로 함유하는 경우, 그 유효용량은 1~2000 ㎎/㎏/day 이고, 바람직하기로는 20~100 ㎎/㎏/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.

<58> 본 발명에서 상기 플랜타마조사이드를 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.

<59> 본 발명의 조성물은 당뇨/당뇨합병증의 예방 및 치료, 노화의 방지 및 지연을 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

<60> 이하, 본 발명은 하기 실시예에 의해 상세하게 설명하나 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

<61> 실시예 1: 질경이로부터 당뇨 / 당뇨합병증 억제 지표물질인 플랜타마조사이드의 분리 및 정제

<62> 건조된 질경이 (차전초, plantago asiatica) 1.5 ㎏을 메탄올 또는 에탄올 18 L를 이용하여 3시간 동안 환류 냉각 추출하고 7,500 rpm, 30 min, 4℃에서 원심분리하여 상등액을 얻었다. 여기에 남아 있을지 모르는 불용성 물질을 제거하기 위하여 이것을 whatman No.42 필터로 여과하였다. 여과된 상등액을 감압증류한 다음 동결건조하여 분말 형태의 질경이 알콜 추출물 (PA-1)을 얻었다. 이렇게 얻어진 PA-1 추출물을 물에 녹인 뒤 순차적으로 유기용매의 극성도를 달리하며 헥산(hexane), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethylacetate), 부탄올(butanol), DW 획분으로 극성에 따라 일차적 분리를 하였다(개요도 1 참조). 글리케이션 억제 활성이 가장 높은 부탄올 층을 연속적으로 silica gel 60 레진에 흡착 후 에틸아세테이트 : 메탄올 혼합용출액의 농도 구배(gradient)로 용출(elution) 하였고, 이중 90% 에틸아세테이트 : 10% 메탄올 용액에서 용출된 획분을 다시 Sephadex LH-20이 충진된 컬럼을 이용하여 질경이의 당뇨합병증 억제 지표물질인 플랜타마조사이드를 분리하였다. 용출된 활성물질은 표 4의 조건으로 순도를 확인하였다.

<63> 실시예 2: 질경이 추출물, 분리·정제 단계에서의 각 획분 및 플랜타마조사이드의 AGEs 생성억제능(항글리케이션 활성) 측정 (표 1, 4, 도 1 및 2 참조)

<64> 0.02% 소듐 아자이드를 포함하는 0.1 M 포스페이트 완충용액(pH 7.4) 1 mL에 5 mg의 BSA(bovine serum albumin), 25 mM 트레오스(threose), 1 mM DTPA, 농도를 달리한 질경이 추출물(PA-1), 분리·정제 단계에서의 각 획분 및 플랜타마조사이드(1000, 100, 10, 1, 0.1 ug/ml, 10 mM, 25 mM)를 넣은 후, 37℃ 배양기에 넣어 7일간 밀폐한 채로 반응시켰다. 반응 일주일 후 글리케이션(glycation) 정도를 여기 파장 370 ㎚, 방출 파장 440 ㎚를 이용한 형광측정을 통하여 수행하였다. 글리케이션 억제 활성의 측정에 있어서, 대조군은 글리케이션 반응이 전혀 일어나지 않은 군(트레오스 비첨가)의 측정값을 100% 억제된 값으로, 추출물이나 아미노구아니딘이 전혀 첨가되지 않고 당과 단백질만이 결합(BSA + 트레오스) 하여 글리케이션 반응이 일어난 군의 값을 0 %의 값으로 하여 상대적 활성도(%)로 나타내었다. 글리케이션 반응의 억제 정도를 알아보기 위한 양성 대조군으로는 기존에 잘 알려져 있는 아미노구아니딘을 사용하였다.

표 1

	농도	글리케이션 억제[b] (%)
PA-1 ug/mL	0.1	41.1± 1.8
	1	51.5 ± 3.1
	10	62.5 ± 2.3
	100	69.4 ± 1.0
	1000	74.1 ± 1.6
AG[c] mM	25	90.1 ± 2.0

a 각 값은 3번 반복실험의 평균 표준편차를 나타낸다.

b 글리케이션 억제활성은 다음 식에 의하여 측정되었다.

각 블랭크(트레오스 없음)의 활성은 각 샘플의 활성으로부터 감해졌다.

억제 백분율은 다음식에 의해 결정되었다.

억제(%)=100-[형광강도(샘플)-형광강도(샘플의 블랭크)]

×100/[형광강도(대조군)-형광강도(대조군의 블랭크)]

<65> c AG=아미노구아니딘

<66> 표 1은 당뇨/당뇨합병증 발병의 중요한 인자인 AGE 생성 억제능을 질경이 (차전초, *Plantago asiatica*) 알콜 추출물(PA-1)을 처리하여 글리케이션 억제 활성을 본 실험 데이타이다. 비교 데이타로 기존에 당뇨/당뇨합병증을 억제한다고 잘 알려져 있는 아미노구아니딘을 양성대조군으로 사용하였다.

표 2

장치	: Varian Pro Star (model 210)
탐지기	: Varian Pro Star (model 310) 330nm 파장
컬럼	: Waters `SymmetryPrep C18 7 μm (역상타입)
이동상	: 0% → 100% MeOH (선상구배용출)
유속	: 1.0 mL/min
주입 부피	: 20 μL

<67>

<68> 표 2는 PA-1-B-1 획분을 Sephadex LH-20 column에 걸어 얻은 PA-1-B-1-Ⅱ 획분에 대한 HPLC 분석 조건을 보여준다.

표 3

No.	C	H	No.	C	H
어글리콘(aglycone)	131.4		**포도당(내부)**		
1	117.1	6.72(1H, d, *J* = 2.0Hz)	1"	104	4.44 (1H, d, *J* = 7.5 Hz)
2	146.1		2"	75.1	3.51 (1H, m)
3	144.7		3"	84.2	3.97 (1H, t, *J* = 9.5 Hz)
4	116.3		4"	70.9	4.96 (1H, t, *J* = 9.5 Hz)
5	121.3	6.70 (1H, d, *J* = 8.5 Hz)	5"	75.9	3.58 (1H, m)
6	121.3	6.59 (1H, dd, j = 8.5, 2.0 Hz)	6"	62.4	3.68(1H, m),3.58(1H, m)
7	36.5	2.28 (2H, m)			
8	72.2	4.06 (1H, m), 3.76 (1H, m)	**포도당(외부)**		
카페오일(caffeoyl)			1'''	105.8	4.56 (1H, d, *J* = 7.5 Hz)
1'	127.7		2'''	76	3.17 (1H,dd, *J* = 9.5,7.5Hz)
2'	115.3	7.09 (1H, d, *J* = 2.0)	3'''	77.7	3.35 (1H, m)
3'	146.8		4'''	71.2	3.25 (1H, t, *J* = 9.0Hz)
4'	149.7		5'''	77.9	3.19 (1H, m)
5'	116.6	6.81 (1H, d, *J* = 8.5)	6'''	62.3	3.17 (1H, m), 3.53 (1H, m)
6'	123.1	7.00 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.0)			
7'	147.4	7.61(1H, d, *J* = 16.0)			
8'	115.2	6.34(1H, d, *J* = 16.0)			
9'	168.5				

화학적 이동(Chemical shift)은 내부 표준으로서 테트라메틸실란으로부터 구하였다.(단위 ppm)

IH 및 13C NMR은 각각 400MHz 및 100 MHz에서 측정되었다.

<69>

<70> 표 3은 PA-1-B-1-Ⅱ 획분에 대하여 구조분석을 하기 위하여 실시한 1D NMR의 ^{1}H과 ^{13}C-NMR의 spectrum data의 결과를 보여준다.

표 4

	글리케이션 억제 (%)[b]	
	10mM	25mM
플랜타마조사이드	95.2 ± 0.25	96.1 ± 0.20
AG	89.8 ± 0.65	95.0 ± 0.90

a 각 값은 3번 반복실험의 평균 표준편차를 나타낸다.

b 글리케이션 억제활성은 다음 식에 의하여 측정되었다.

각 블랭크(트레오스 없음)의 활성은 각 샘플의 활성으로부터 감해졌다.

억제 백분율은 다음식에 의해 결정되었다.

억제(%)=100-[형광강도(샘플)-형광강도(샘플의 블랭크)]

×100/[형광강도(대조군)-형광강도(대조군의 블랭크)]

<71> **c AG=아미노구아니딘**

<72> 표 4는 플랜타마조사이드의 글리케이션 억제 활성을 본 실험 데이타이다. 이로부터 플랜타마조사이드가 당뇨/당뇨합병증 발병의 중요한 인자인 AGEs 생성 억제능 활성이 높음을 알 수 있으며, 기존에 당뇨/당뇨합병증을 억제한다고 잘 알려져 있는 아미노구아니딘과 같은 농도에서 비교했을 때 보다 더 활성이 큼을 확인하였다.

<73> 실시예 3 : 랫트에 대한 경구투여 급성독성실험

<74> 본 발명의 플랜타마조사이드의 급성 독성을 알아보기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<75> 실험동물로 6주령의 특정병원부재(SPF) SD계 랫트를 사용하여 급성독성실험을 실시하였다. 8마리씩의 동물에 플랜타마조사이드를 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 임상증상은 없었고 폐사된 동물도 없었으며, 또한 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학검사, 부견소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과 본 발명의 플랜타마조사이드는 모두 랫트에서 1g/kg 까지 독성변화를 나타내지 않았으며, 경구투여 최소치사량(LD_{50})은 적어도 1g/kg 이상인 안전한 물질로 판단되었다.

<76> 제제예 1 : 정제의 제조

<77> 플랜타마조사이드 100㎎, 옥수수전분 90.0㎎, 유당 175.0㎎, 엘-히드록시프로필셀룰로오스 15.0㎎, 폴리비닐피롤리돈 905.0㎎ 및 에탄올 적량의 원료를 균질하게 혼합하여 습식과립법으로 과립화하고 스테아린산 마그네슘 1.8㎎을 가하여 혼합한 후 1정이 400㎎이 되도록 타정하였다.

<78> 제제예 2 : 캅슐제의 제조

<79> 플랜타마조사이드 100㎎, 옥수수전분 80.0㎎, 유당 175.0㎎ 및 스테아린산 마그네슘 1.8㎎을 균일하게 혼합하고 1캅셀에 360㎎씩 충전하였다.

<80> 제제예 3 : 기능성음료의 제조

<81> 꿀 522㎎

<82> 치옥토산아미드 5㎎

<83> 니코틴산아미드 10㎎

<84> 염산리보플라빈나트륨 3㎎

<85> 염산피리독신 2㎎

<86> 이노시톨 30㎎

<87> 오르트산 50㎎

<88> 플랜타마조사이드 100㎎

<89> 물 200㎖

<90> 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

<91> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 의하면 부작용과 독성이 없고 종래의 당뇨/당뇨 합병증 억제물질보다 효능이 증대된, 플랜타마조사이드를 유효성분으로 하는 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물이 제공된다. 이는 천연식물에서 유래되어 안전성이 보강된 것으로, 건강기능식품 소재나 의약품으로 널리 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 당뇨/당뇨합병증 발병의 중요한 인자인 AGEs 생성 억제능을 평가하기 위해, 질경이 알콜 추출물(PA-1)에서 분리한 극성별 유기용매 층의 글리케이션 억제활성을 본 실험 데이타로서, 여기서 PA-1-B(부탄올 층)의 활성이 높음을 알 수 있다. 비교 데이타로 기존에 당뇨 / 당뇨합병증을 억제한다고 잘 알려져 있는 아미노구아니딘을 양성 대조군으로 사용하였다.

<2> 도 2는 당뇨/당뇨합병증 발병의 중요한 인자인 AGEs 생성 억제능을 평가하기 위해, 질경이 알콜 추출물(PA-1)에서 분리한 PA-1-B 층(부탄올 층)을 다시 실라카 겔 컬럼에 용출시킨 획분들의 글리케이션 억제활성을 본 실험 데이타이다. 여기서 PA-1-B-1([90% 에틸아세테이트 + 10% MeOH] 획분)이 활성이 높음을 알 수 있다. 비교 데이

타로 기존에 당뇨 / 당뇨합병증을 억제한다고 잘 알려져 있는 아미노구아니딘을 양성 대조군으로 사용하였다.

<3> 도 3은 PA-1-B-1 획분을 세파덱스 LH-20 컬럼을 이용하여 이동상의 조건을 D.W. 80% : MeOH 20%부터 D.W. 0% : MeOH 100%의 조건으로 농도구배를 걸어 얻은 3가지 획분에 대한 크로마토그램을 보여준다.

<4> 도 4는 PA-1-B-1 획분을 세파덱스 LH-20 컬럼에 걸어 얻은 PA-1-B-1-Ⅱ 획분에 대하여 HPLC 분석을 하여 단일 피크를 얻음으로써 단일물질임을 확인해주는 크로마토그램을 보여준다.

<5> 도 5a 및 도 5b는 PA-1-B-1-Ⅱ 획분에 대하여 구조분석을 하기 위하여 실시한 UV-가시 스펙트럼과 IR-스펙트럼의 결과를 보여준다.

<6> 도 6은 PA-1-B-1-Ⅱ 획분에 대하여 구조분석을 하기 위하여 실시한 CI-MS 스펙트럼의 결과를 보여준다.

<7> 도 7은 PA-1-B-1-Ⅱ 획분에 대하여 구조분석을 하기 위하여 실시한 1D NMR의 ^{1}H-NMR 스펙트럼의 결과를 보여준다.

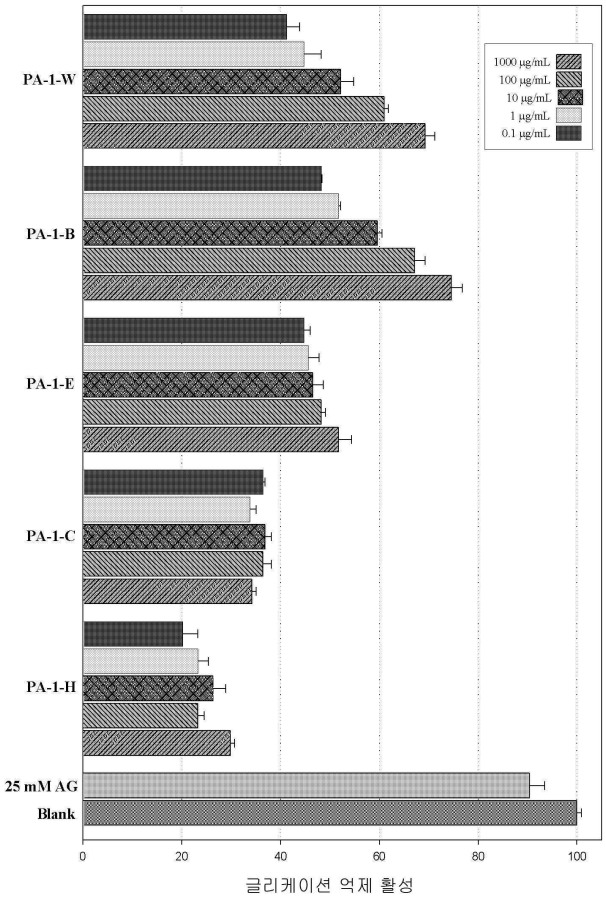
<8> 도 8은 PA-1-B-1-Ⅱ 획분에 대하여 구조분석을 하기 위하여 실시한 1D NMR의 ^{13}C-NMR 스펙트럼의 결과를 보여준다.

<9> 도 9는 PA-1-B-1-Ⅱ 획분에 대하여 구조분석을 하기 위하여 실시한 2D NMR의 COSY, HMBC 스펙트럼의 결과를 보여준다.

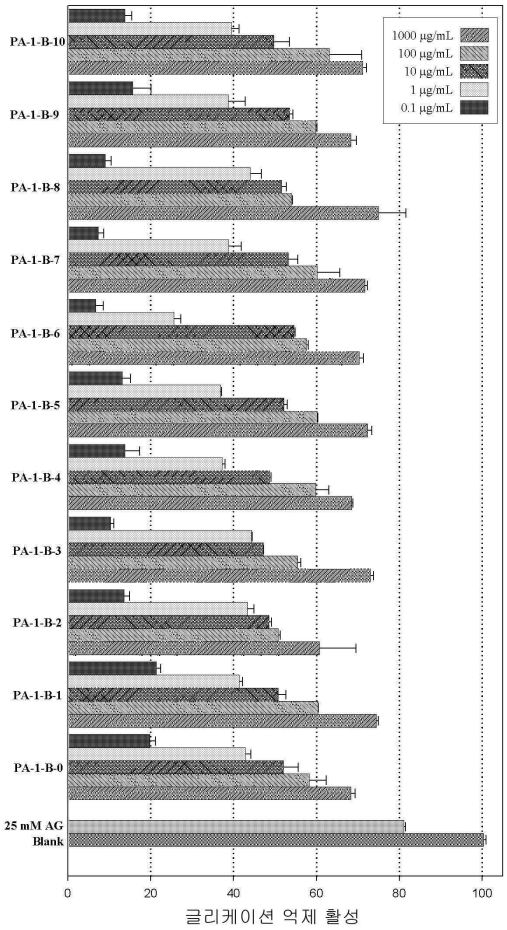
<10> 도 10은 PA-1-B-1-Ⅱ 획분에 대하여 구조분석을 하기 위하여 실시한 1D NMR과 2D NMR의 결과를 종합하여 도출된 단일 천연물질인 플랜타마조사이드(plantamajoside)의 화학구조를 보여준다.

도면

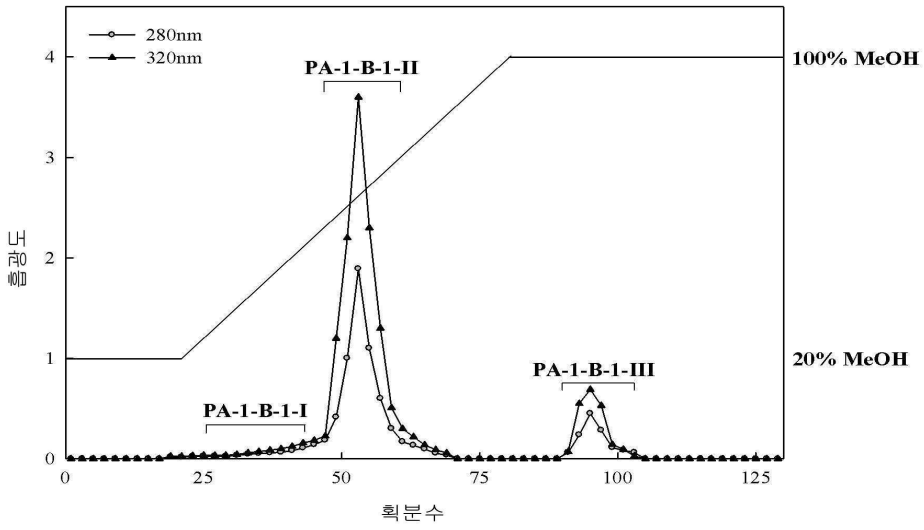
도면1



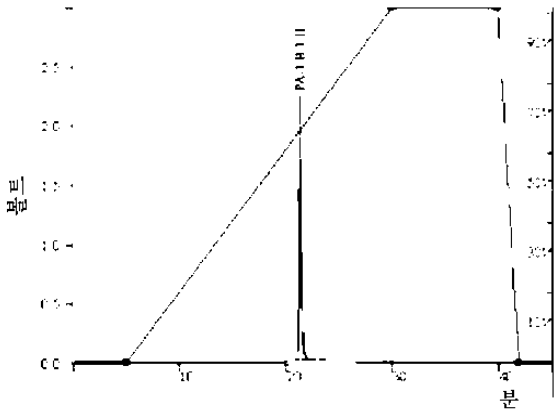
도면2


1000 μg/mL
100 μg/mL
10 μg/mL
1 μg/mL
0.1 μg/mL
PA-1-B-10
PA-1-B-9
PA-1-B-8
PA-1-B-7
PA-1-B-6
PA-1-B-5
PA-1-B-4
PA-1-B-3
PA-1-B-2
PA-1-B-1
PA-1-B-0
25 mM AG
Blank
0
20
40
60
80
100
글리케이션 억제 활성

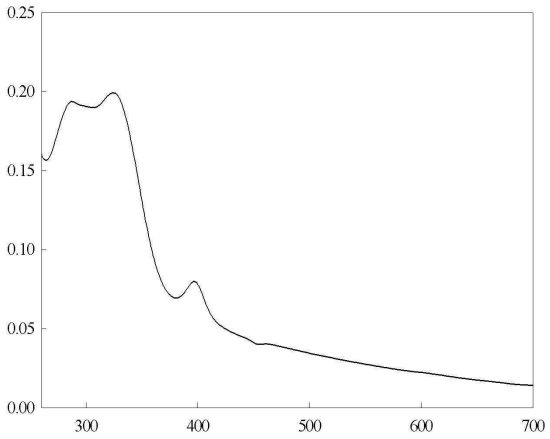
도면3


280nm
320nm
PA-1-B-1-II
100% MeOH
20% MeOH
PA-1-B-1-III
PA-1-B-1-I
흡광도
0
1
2
3
4
0
25
50
75
100
125
획분수

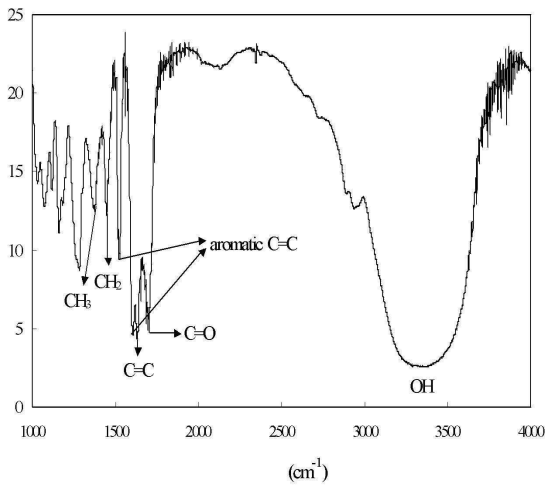
도면4



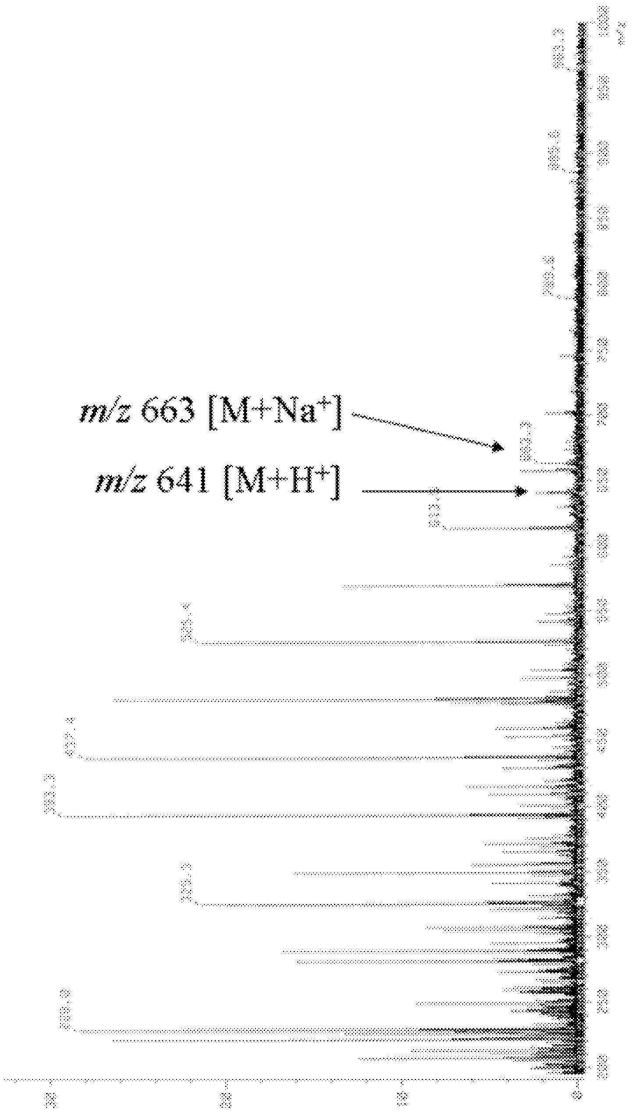
도면5a



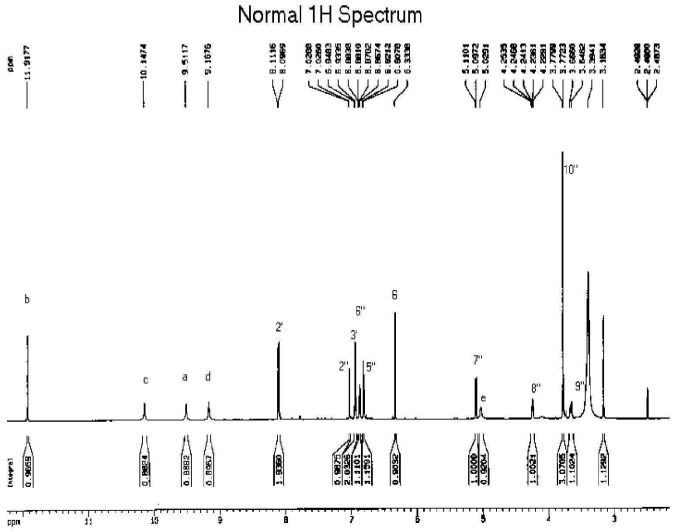
도면5b



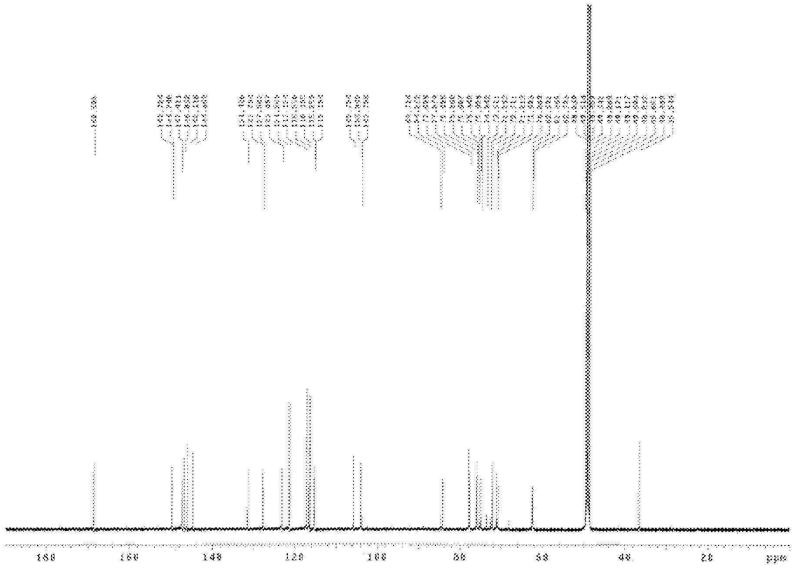
도면6



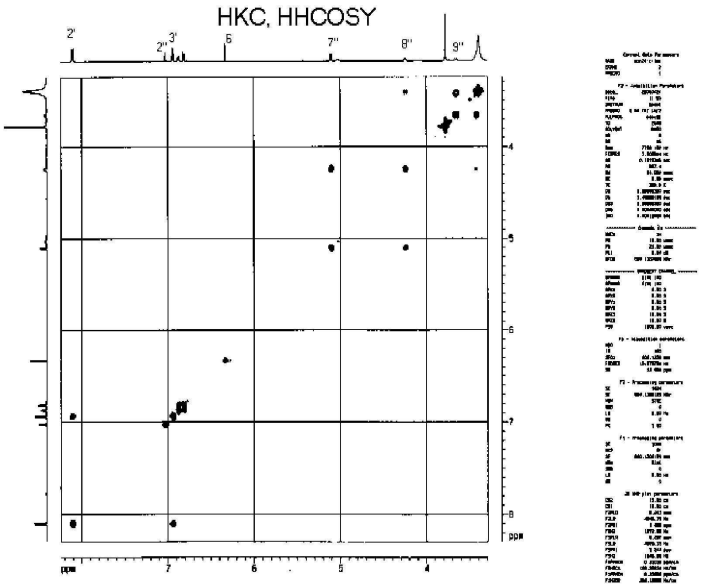
도면7

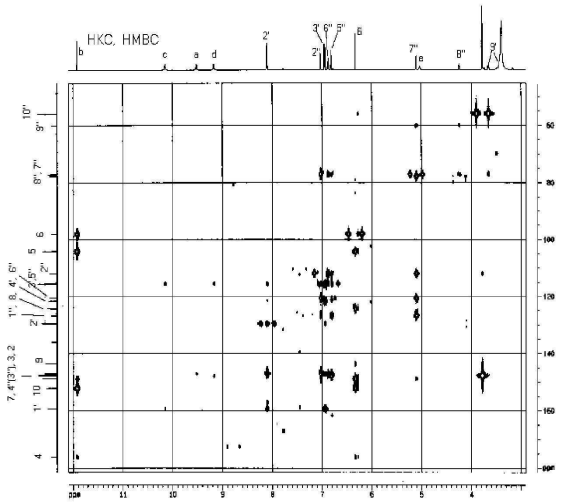


도면8



도면9


HKC, HHCOSY
2'
2''
3'
6
7''
8''
9''
ppm


HKC, HMBC
b
c
a
d
2'
3'
6''
5''
6
7''
e
8''
9''
10''
8'', 7''
1'', 8, 4', 6'
2''
5'
2
1' 10
9
7, 4''(3''), 3, 2
ppm

도면10

