



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년02월15일

(11) 등록번호 10-1593539

(24) 등록일자 2016년02월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/20 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)

A61K 31/225 (2006.01) A61K 31/23 (2006.01)

(52) CPC특허분류(Coo. Cl.)

A61K 31/20 (2013.01)

A23L 1/30 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0095529

(22) 출원일자 2015년07월03일

심사청구일자 2015년07월03일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020040010681 A

KR1020120064604 A

J. Physiol. Biochem., 2015, 71:29-42

Biochimie, 2013, Vol. 95, pp. 1239-1244

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

이성준

서울특별시 강남구 도산대로96길 39, 104동 402호 (청담동, 청담공원아파트)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 박수진

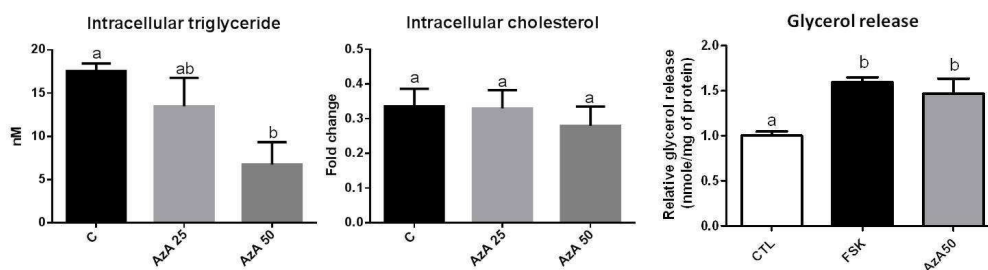
(54) 발명의 명칭 지방조직 중성지질 분해 효능을 가지는 아젤라산 조성물

(57) 요약

본 발명은 아젤라산(Azelaic Acid)을 유효성분으로 함유하는 의약 조성물 또는 기능성 식품에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 지방조직 세포막에 발현되는 GPCR인 Olfr544가 아젤라산의 결합으로 활성화되어 cAMP-PKA-HSL 신호전달 과정을 통해 지방조직 내 중성지질의 가수분해를 촉진하고, 중성지질 축적의 강하 효능이 있는 아젤라산을 유효성분으로 함유하는 의약 조성물 및 건강기능성 식품에 관한 것이다.

본 발명에 따른 아젤라산(Azelaic Acid)을 함유하는 조성물은 지방조직 내 지질 축적 및 지방조직 지질대사 개선에 효과가 우수한 바, 체중감소 및 체지방 감소와 같은 지방조직 지질대사 개선(비만 개선)을 위한 식품소재, 의약조성물 및 건강기능성 식품에 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류(Coo. Cl.)
A61K 31/225 (2013.01)
A61K 31/23 (2013.01)
A23V 2200/332 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2013R1A2A2A01016176
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	이공)중견연구자지원_핵심연구
연구과제명	이소발현 후각수용체 활성조절을 통한 식품 향기 성분의 지질대사 조절기작 규명
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교
연구기간	2013.06.01 ~ 2016.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 의약조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 아젤라산이 지방조직의 중성지방 가수분해를 촉진하는 것을 특징으로 하는 의약조성물.

청구항 4

아젤라산을 유효성분으로 함유하는 비만 개선용 건강기능성 식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 함유하는 의약 조성물 또는 기능성 식품에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 지방조직 세포막에 발현되는 GPCR인 Olfr544가 아젤라산의 결합으로 활성화되어 cAMP-PKA-HSL 신호전달 과정을 통해 지방조직 내 중성지방의 가수분해를 촉진하고, 중성지방 축적의 강하 효능이 있는 아젤라산을 유효성분으로 함유하는 의약 조성물 및 건강기능성 식품에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 생체 내 에너지 과다 축적은 여러 가지 대사성 질환을 유발한다. 비만은 생체 에너지 대사 밸런스가 붕괴되어 발병하는 대표적인 질환으로 인슐린 저항성을 유발하며 고지혈증 및 고혈압 등 다른 질환의 원인이 되기도 한다. 생체 에너지 대사를 적절히 유지하는 것은 생활습관 조절이 필수적으로, 적절한 식습관을 통해 운동량을 늘리고 식이섭취를 줄이면 어느 정도 치료 가능한 것으로 알려져 있다.

[0003] 가장 중요한 것은 식이요법과 운동을 비롯한 생활양식의 변화를 유도하는 것이지만 대부분의 만성질환자들은 생활습관만으로는 교정이 어려운 경우가 많아 지질저하 약물 치료를 비롯한 관리가 필요한 실정이다. 비만을 치료하기 위한 연구의 결과로 몇몇 약물이 개발되어 이용되어 왔는데 중추신경계에 작용하여 식욕을 억제하는 물질들은 fenfluramine/phentermine이나 sibutramine의 예와 같이 심혈관 질환 발생 등 심각한 부작용으로 인해 시판 약물이 시장에서 퇴출되는 등 문제가 발생하여 왔고, 식이성 지방 분해 효소 억제제인 orlistat의 경우, 고지방 식이를 하지 않는 한국인 등에게는 효과가 크지 않은 등 기존의 약물 효용성이 높지 않아 새로운 물질의 개발이 필요한 실정이다. 한편, 약물 투여에 거부감과 부담감을 갖는 사람도 많이 있어 안전한 식품 성분이나 체내에서 생성되는 물질을 이용하여 비만이나 만성질환을 치료 혹은 예방하는 유효 성분에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있다.

[0004] 아젤라산의 화학명은 노난디산(Nonanedioic Acid)으로 탄소수가 9개인 디카르복시산으로서 체내에서 오메가-산 화과정이나 리놀레산의 과산화물로 생성되기도 하고, 천연물질로 밀, 보리,オート밀, 수수 등 여러 가지 곡류에서 생성되어 식품의 형태로 섭취되기도 한다(도 1). 지금까지 연구된 바에 의하면 아젤라산은 홍조, 여드름 등 염증성 피부질환에 효능이 알려져 있고, 동맥경화, 혈당조절, 항암작용 등의 연구 내용이 일부 보고되어 있으나 표적 단백질 규명 등 상세 기전 연구는 수행된 바 없다. 아젤라산의 체지방 감소 관련 연구는 보고된 바가 없으며 관련 작용 기작도 연구된 바가 없다.

[0005] Olfr544는 후각 수용체(이하, Olfr544이라 함)로서 일반적으로 후각 수용체는 후각 상피세포에서 발현되어 냄새 정보를 대뇌에 전달하는 기능을 하는 것으로 알려지고 있으나 최근 보고에 의하면 후각 조직 이외의 다양한 조직에서 후각 수용체가 발현됨이 알려지고 있다. 사람의 경우 400개 이상의 후각 수용체 유전자가 존재하며 이는 인간 유전체의 1-2%에 해당하는 것으로서, 이렇게 유전체에서 차지하는 비중이 큰 후각 수용체가 후각 정보 전달 이외에 일반 조직 세포에서 필요한 기능을 수행한다는 것은 놀라운 사실이 아니다.

[0006] 최근 연구결과에 의하면 일반 조직에서 후각 수용체의 다양한 기능이 보고되고 있는데 정자에서 후각 수용체가 페로몬 물질을 탐색하는 기능, 피부의 각질형성세포(keratinocyte에서 OR2AT4가 피부재생에 관여하고, Olfr544가 신장조직에서 발현되어 레닌 호르몬 분비를 조절하는 연구 등이 보고되고 있다. 최근 본 발명자들도 OR1A1이 간조직에서 발현되어 간조직 중성지방 대사를 조절한다는 보고(Wu C et al., *Int J Biochem Cell Biol.*, 64:75-80, 2015)를 하는 등 다수의 연구자들이 후각 수용체의 새로운 기능을 보고하고 있다.

[0007] 이러한 기술적 배경 하에서, 본 발명자들은 아젤라산이 지방조직 내 중성지방 함량을 효과적으로 저하시켜, 체지방 감소로 지질대사를 개선(비만 개선)하는 식물 유래 성분을 개발하고자 예의 노력한 결과, 3T3-L1 지방세포에 이소발현(ectopic expression)되는 후각 수용체인 Olfr544의 리간드로 아젤라산이 작용하여 cAMP-PKA-HSL 신호전달 과정을 활성화시킴으로써 지방조직의 지질축적을 억제하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 지방조직 내 지질대사 개선(비만 개선) 효과가 있는 지방조직 내 중성지방 가수분해를 촉진하여 체지방 축적을 효과적으로 저하시키는 효능을 갖는 아젤라산(Azelaic Acid)을 함유하는 지방조직 내 지질대사 개선(비만 개선)용 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아젤라산(Azelaic Acid)을 유효성분으로 함유하는 비만 치료용 의약조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한, 아젤라산(Azelaic Acid)을 유효성분으로 함유하는 비만 개선용 건강기능성 식품을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 아젤라산(Azelaic Acid)을 함유하는 조성물은 지방조직 내 지질 축적 및 지방조직 지질대사 개선에 효과가 우수한 바, 체중감소 및 체지방 감소와 같은 지방조직 지질대사 개선(비만 개선)을 위한 식품소재, 의약조성물 및 건강기능성 식품에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 아젤라산(트랜스 아젤라산)의 화학 구조, 분자식 및 분자량을 나타낸 것이다.

도 2는 아젤라산(Azelaic Acid)의 표적 분자인 Olfr544가 3T3-L1 지방세포 및 생쥐 지방조직(adipose tissue)에서 유의적으로 발현되는 것을 나타낸 것으로, (A) RT-PCR, (B) qPCR, (C) 웨스턴 블랏(Western blot), (D) 면역조직염색법(Immunohistochemistry)을 통해 Olfr544의 발현을 확인한 것이다.

도 3은 MTT 어세이(assay)에 의한 아젤라산의 3T3-L1 지방세포에서의 세포독성 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 아젤라산(Azelaic Acid)에 대한 Olfr544의 리간드 활성 효능을 탐색하기 위해 후각 수용체의 발현 효율을 높인 세포주인 Hana3A 배양세포계에 Olfr544 발현벡터와 CRE-Luciferase 리포터 벡터를 도입한 다음, 리포터 유전자 어세이(reporter gene assay)를 수행한 결과를 나타낸 것이다. EC₅₀ 값은 최대 효율의 50%에 해당되는 효능제(agonist)의 농도를 의미한다.

도 5는 아젤라산(Azelaic Acid, AzA)을 3T3-L1 지방세포에 처리한 다음, 세포 내 신호전달에 관여하는 주요 이차 전령물질(이차 전달자, second messenger)인, (A) cAMP, (B) IP-one; IP₃의 대사물(metabolite) 및 (C) 세포 내 칼슘(intracellular calcium)의 농도를 측정한 것이다.

도 6은 아젤라산(Azelaic Acid, AzA)을 3T3-L1 지방세포에 30분간 처리했을 때 PKA(protein kinase A)의 활성을 측정한 것이다. control, 음성대조군; 1 μ M FSK(forskolin), 양성대조군; 50 μ M AzA(Azelaic Acid). 각기 다른 알파벳은 ANOVA를 통한 Tukey test에서 $P < 0.05$ 수준에서 통계적으로 유의성이 있음을 의미한다.

도 7은 아젤라산(Azelaic Acid, AzA)을 3T3-L1 지방세포에 2시간 동안 처리했을 때 PKA의 표적 단백질인 CREB(cAMP-response element binding protein) 및 HSL(hormone-sensitive lipase)의 인산화 여부(정도)를 웨스턴 블랏(Western blot)을 통해 나타낸 것이다. C(control), 음성대조군; 1 μ M FSK(forskolin), 양성대조군; 50 μ M AzA(Azelaic Acid).

도 8은 아젤라산(Azelaic Acid, AzA)을 3T3-L1 지방세포에 2시간 동안 처리했을 때 세포 내 지질 농도와 중성지질이 가수분해되어 글리세롤이 방출되는 양을 측정한 것이다. (A) 세포 내 중성지질 농도, (B) 세포 내 콜레스테롤 농도; (C) 세포에서 방출된 글리세롤 농도. C(control), 음성대조군; 1 μ M FSK(forskolin), 양성대조군; 50 μ M AzA(Azelaic Acid). 각기 다른 알파벳은 ANOVA를 통한 Tukey test에서 $P < 0.05$ 수준에서 통계적으로 유의성이 있음을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명에서는 3T3-L1 지방세포에서 아젤라산 처리에 따른 Olfr544 후각 수용체의 활성화로 중성지질 가수분해 촉진 및 중성지질 축적 강하 효능을 확인하였다. 더욱 상세하게는, 아젤라산의 지방조직 중성지질 축적 억제 효능을 평가하기 위해, 아젤라산으로 처리된 3T3-L1 지방세포에서 중성지질 함량을 분석하고, 중성지질 분해산물인 글리세롤 배출량을 분석함으로써 3T3-L1 지방세포에서의 중성지질 분해 효능을 평가하였다. 본 발명은 또한, 3T3-L1 지방세포 및 Olfr544를 발현하는 Hana3A 세포주에서의 아젤라산의 Olfr544 효능제(agonist)로서의 특징을 확인함으로써 Olfr544에 의한 cAMP-PKA-HSL 신호전달 과정에서의 아젤라산의 중성지질 분해 효능의 기전을 규명하였다.
- [0014] 아젤라산은 인체 내에서 자연스럽게 생성되거나 사람이 주식으로 섭취하는 보리, 귀리, 호밀 등 곡류에 존재하는 식품 성분이다. 보고된 연구 결과에 따르면, 인체 내 아젤라산의 농도는 10~50 μ M 정도이고, 일반적으로 안전하게 섭취할 수 있는 특징이 있는 것으로 널리 알려져 있다. 아울러, 본 발명의 MTT 독성실험에서도 3T3-L1 지방세포에 아젤라산을 500 μ M 농도까지 처리해도 독성이 전혀 나타나지 않는 것으로 확인되었다.
- [0015] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 아젤라산(Azelaic Acid)을 유효성분으로 함유하는 비만 치료용 의약조성물에 관한 것이다.
- [0016] 본 발명에서, 상기 비만 치료는 지방조직 내 중성지질 감소, 지방조직 내 지질 축적 억제, 체중감소, 또는 체지방 감소인 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 아젤라산(Azelaic Acid)은 후각 수용체(olfactory receptor, OR)의 활성을 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 후각 수용체는 Olfr544(olfactory receptor 544)인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 아젤라산(Azelaic Acid)은 지방조직 중성지질 가수분해를 촉진하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0017] 지방세포에서의 지방(또는 지질) 및 과잉 에너지의 축적은 비만을 유발할 뿐만 아니라 다양한 지질 관련 대사성 질환인 당뇨, 고지혈증, 지방간, 동맥경화, 고혈압, 심혈관 질환 또는 상기 질환들이 동시다발적으로 발생하는 대사증후군 등의 주요한 원인이 되는 것으로 알려지고 있다. 대사증후군(Metabolic syndrome)이란 고지혈증, 고혈압, 당대사 이상, 비만과 같은 위험인자가 함께 나타나는 증후군을 지칭한다. 최근 세계보건기구와 미국 국립보건연구원의 심폐혈액 연구소가 제정한 성인 치료프로그램 III(Adult Treatment Program III: ATP III)을 통해 대사증후군 또는 인슐린저항성증후군(Insulin resistance syndrome)이라 공식 명명되었다.
- [0018] 본 명세서에서 사용되는 용어 “지방간”은 간의 지방대사 장애로 지방이 간세포에 과도한 양으로 축적된 상태를 말하며, 이는 협심증, 심근경색, 뇌졸중, 동맥경화, 지방간 및 췌장염 등과 같은 다양한 질병의 원인이 된다.
- [0019] 본 발명에서 아젤라산은 착즙 추출, 수증기 추출, 열수 추출, 초음파 추출, 용매 추출, 또는 환류냉각 추출로 수득한 것을 이용할 수 있으며, 상기 용매 추출은 에탄올, 메탄올, 아세톤, 헥산(hexane), 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 물 또는 이들의 혼합물로 추출한 것일 수 있다. 상기 아젤라산은 통상의 천연 아젤라산의 제조 방법에 사용되는 다양한 방법에 따라 추출된 것일 수 있다.
- [0020] 본 명세서에서 사용되는 용어 "아젤라산(Azelaic Acid)"은 동의어인 노난디산(Nonanedioic Acid)과 혼용해서 사

용할 수 있다.

- [0021] 본 발명의 아젤라산은 천연물질이므로 독성이 전혀 없어서 의약품으로 지속적으로 다량 사용할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 아젤라산을 포함하는 조성물은 이미 사용되고 있는 항히스타민제, 소염진통제, 항암제 및 항생제 등의 약제와 함께 제제화하거나 병용하여 사용될 수 있다.
- [0023] 본 명세서에서 사용되는, "치료하는"이란 용어는, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "치료"란 용어는 "치료하는"이 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다.
- [0024] 용어 "약제학적 조성물(pharmaceutical composition)" 또는 "의약조성물"은 본 발명의 아젤라산을 함유하는 화합물과 희석제 또는 담체와 같은 다른 화학 성분들의 혼합물을 의미한다.
- [0025] 용어 "약리학적으로 허용되는(physiologically acceptable)"은 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는 담체 또는 희석제로 정의된다.
- [0026] 용어 "담체(carrier)" 또는 "비이클(vehicle)"은 세포 또는 조직 내로의 화합물의 부가를 용이하게 하는 화합물로 정의된다. 예를 들어, 디메틸설폭사이드(DMSO)는 생물체의 세포 또는 조직 내로의 많은 유기 화합물들의 투입을 용이하게 하는 통상 사용되는 담체이다.
- [0027] 용어 "희석제(diluent)"는 대상 화합물의 생물학적 활성 형태를 안정화시킬 뿐만 아니라, 화합물을 용해시키게 되는 물에서 희석되는 화합물로 정의된다. 버퍼 용액에 용해되어 있는 염은 당해 분야에서 희석제로 사용된다. 통상 사용되는 버퍼 용액은 포스페이트 버퍼 식염수이며, 이는 인간 용액의 염 상태를 모방하고 있기 때문이다. 버퍼 염은 낮은 농도에서 용액의 pH를 제어할 수 있기 때문에, 버퍼 희석제가 화합물의 생물학적 활성을 변형하는 일은 드물다.
- [0028] 여기에 사용된 아젤라산을 함유하는 화합물들은 인간 환자에게 그 자체로서, 또는 결합 요법에서와 같이 다른 활성 성분들과 함께 또는 적당한 담체나 부형제와 함께 혼합된 약제학적 조성물로서, 투여될 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 사용에 적합한 의약조성물 또는 약제학적 조성물에는, 활성 성분들이 그것의 의도된 목적을 달성하기에 유효한 양으로 함유되어 있는 조성물이 포함된다. 더욱 구체적으로, 치료적 유효량은 치료될 객체의 생존을 연장하거나, 질환의 증상을 방지, 경감 또는 완화시키는데 유효한 화합물의 양을 의미한다. 치료적 유효량의 결정은, 특히, 여기에 제공된 상세한 개시 내용 측면에서, 당업자의 능력 범위 내에 있다.
- [0030] 본 발명의 아젤라산을 함유하는 화합물에 대한 치료적 유효량은 세포 배양 분석으로부터 초기에 측정될 수 있다. 예를 들어, 선량(dose)은 세포 배양에서 결정된 IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) 또는 EC_{50} (half maximal effective concentration)를 포함하는 순환 농도 범위를 얻기 위하여 동물 모델에서 계산될 수 있다. 그러한 정보는 인간에서의 유용한 선량을 더욱 정확히 결정하는데 사용될 수 있다.
- [0031] 아젤라산의 투여량은 채용된 투여 형태와 이용된 투여 루트에 따라 상기 범위에서 변화될 수 있다. 정확한 산정, 투여 루트 및 투여량은 환자의 상태를 고려하여 개개의 의사에 의해 선택될 수 있다(예를 들어, Fingl *et al.*, 1975, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p. 1 참조).
- [0032] 본 발명의 아젤라산의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 통상적으로, 환자에게 투여되는 조성물의 선량 범위는 환자 체중의 약 0.5 내지 1000 mg/kg 일 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 아젤라산은 1일 0.0001 내지 200mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 경구 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명의 아젤라산은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 아젤라산 외에 다른 성분이 첨가된 혼합물로 제공되는 경우, 상기 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 아젤라산을 0.001 중량% 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.1 중량% 내지 99 중량 %, 더욱 바람직하게는

1 중량% 내지 50 중량%로 포함할 수 있다.

[0035] 본 발명의 조성물의 약학적 투여 형태는 이들의 약제학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0036] 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은, 화합물이 투여되는 유기체에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는, 화합물의 제형을 의미한다. 용어 "수화물", "용매화물" 및 "이성질체" 역시 상기와 같은 의미를 가진다. 상기 약제학적 염은, 본 발명의 아젤라산을 함유하는 화합물을, 염산, 브롬산, 황산, 질산, 인산 등의 무기산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, p-톨루엔술폰산 등의 술폰산, 타타르산, 포름산, 시트르산, 아세트산, 트리클로로아세트산, 트리플루오로아세트산, 카프릭산, 이소부탄산, 말론산, 석신산, 프탈산, 글루콘산, 벤조산, 락트산, 푸마르산, 말레인산, 살리실산 등과 같은 유기 카본산과 반응시켜 얻어질 수 있다. 또한, 본 발명의 아젤라산을 함유하는 화합물을 염기와 반응시켜, 암모니움 염, 나트륨 또는 칼륨 염 등의 알칼리 금속염, 칼슘 또는 마그네슘 염 등의 알칼리 토금속염 등의 염, 디시클로헥실아민, N-메틸-D-글루카민, 트리스(히드록시메틸) 메틸아민 등의 유기염기들의 염, 및 아르기닌, 리신 등의 아미노산 염을 형성함으로써 얻어질 수도 있다.

[0037] 본 발명에 따른 아젤라산을 포함하는 약학 조성물 또는 의약조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 아젤라산을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0038] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 아젤라산에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 60, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0039] 후각 수용체는 GPCR(G-protein coupled receptor) 단백질 superfamily 중 가장 큰 부분을 차지하는 단백질 군으로 일반적으로 세포막에서의 발현량이 높지 않다. 따라서, 본 발명자들의 선행된 마이크로어레이(microarray) 연구에서 확인되었던 Olfr544 후각 수용체의 지방조직(또는 3T3-L1 지방세포)에서의 발현 여부(정도)를 RT-PCR, qPCR, 웨스턴블롯(Western blot) 및 면역조직염색법(Immunohistochemistry)을 통해 최종 확인하고자 하였다.

[0040] 본 발명의 일 실시예에서는, 생쥐(mouse)의 지방조직(adipose tissue) 및 3T3-L1 지방세포에서의 Olfr544 유전자 및 단백질의 발현을 확인하였다. 그 결과, 도 2A 및 2B에 나타난 바와 같이, RT-PCR 및 qPCR 실험에서 지방조직과 3T3-L1 지방세포에서의 Olfr544의 유전자 발현(RNA 레벨에서)이 유의적으로 나타나는 것을 확인하였다. 특히, 두 실험 모두에서 3T3-L1 지방세포보다 지방조직에서 더 높은 수준의 Olfr544 발현이 관찰되었다.

[0041] 한편, 도 2C에 나타난 바와 같이, 웨스턴 블롯 실험에서 Olfr544 단백질은 3T3-L1 지방세포의 세포기질(cytosol)에서 검출되지 않았고, 세포막(membrane protein) 분획에서 높은 수준으로 발현되었다. 또한, 도 2D에 나타난 바와 같이, 면역조직염색법(Immunohistochemistry)을 수행한 결과, Olfr544 단백질은 세포막 마커와 함께 3T3-L1 지방세포의 세포막에 공존(colocalization)하며, 세포막에 유의적으로 발현되는 것으로 나타났다.

[0042] 본 발명의 다른 실시예에서는, 아젤라산의 세포독성을 평가하기 위해 MTT 어세이(MTT assay)를 수행하였다. 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 3T3-L1 지방세포에 아젤라산을 500 μ M의 고농도에 처리해도 세포독성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다.

[0043] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 아젤라산의 Olfr544 리간드 효능 평가를 수행하였다. 그 결과, 도 4에 나타난

바와 같이, CRE(cAMP response element)-Luciferase 리포터 유전자 어세이를 사용하면, 아젤라산이 1~1000 μM 농도 구간에서 농도 의존적으로 Olfr544 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. 또한, EC_{50} 값은 29.71 μM 로 나타나 상기 농도에서 약 50%의 Olfr544가 활성화되었다.

[0044] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 아젤라산이 Olfr544 활성화를 통해 신호전달 과정에 관여하는지 규명하고자 아젤라산이 처리된 3T3-L1 지방세포에서 이차 전령물질의 농도변화를 확인하였다. 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 아젤라산으로 처리된 3T3-L1 지방세포에서 cAMP 농도만이 특이적으로 아젤라산의 농도에 비례하여 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다.

[0045] 한편, 지방세포에서의 cAMP의 증가는 CREB 활성을 증가시킬 뿐만 아니라, PKA 활성을 자극하여 지방분해(lipolysis)를 유도하는 것으로 알려져 있다.

[0046] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 이차 전령물질인 cAMP의 하위경로인 PKA(protein kinase A) 신호전달 경로를 확인하고자 아젤라산에 의한 PKA 활성 조절 효능 평가를 수행하였다. 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 아젤라산이 3T3-L1 지방세포에서 PKA 활성을 유의적으로 증가시켰다. 아젤라산을 50 μM 농도를 2시간 처리하였을 때 대조군과 비교하여 PKA 활성이 113.8% 증가하는 결과를 확인하였다. 따라서, 아젤라산 처리에 따른 지방세포의 cAMP 증가로 PKA 활성이 증가하였다.

[0047] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 아젤라산에 의한 CREB(cAMP-response element binding protein) 및 HSL(hormone-sensitive lipase) 단백질 인산화 변화를 확인하였다. 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 아젤라산을 50 μM 농도로 2시간 처리한 경우 대조군(C)에 비해 CREB과 HSL의 인산화가 급격히 증가하였다. 3T3-L1 지방세포에서 cAMP 농도의 증가는 PKA 활성을 자극하여 HSL의 인산화가 증가되고 이에 따른 HSL의 활성화는 지방소적(lipid droplet)에 저장된 중성지질 가수분해를 촉진한다. 따라서, 아젤라산은 지방세포의 중성지질을 가수분해하는 효능이 있음을 시사하는 결과이다.

[0048] 결국, 지방조직(또는 지방세포)에서 후각 수용체인 Olfr544가 리간드인 아젤라산에 의해 활성화되면, 이차 전령물질인 cAMP의 농도 증가에 따라 PKA 단백질이 활성화되고, PKA 단백질의 주요 표적인 CREB과 HSL을 인산화시킴으로써 활성화되었다. 결론적으로 아젤라산 처리에 따른 Olfr544의 활성화는 세포 내 cAMP-CREB 신호 전달 과정을 활성화시키는 것으로 확인되었다.

[0049] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 아젤라산이 cAMP-PKA-HSL 신호전달 과정을 활성화하여 3T3-L1 지방세포의 중성지질 가수분해를 촉진하는 효능을 확인하기 위해 지방세포 내 중성지질 및 콜레스테롤의 농도를 측정하고, 중성지질 가수분해 산물인 글리세롤의 배출량을 측정하였다. 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 3T3-L1 지방세포에 50 μM 아젤라산을 2시간 동안 처리시 세포 내 중성지질이 61.5%로 저하되고($P < 0.05$), 중성지질의 분해산물인 글리세롤이 46.7% 증가되는 효능을 보였다. 이는 아젤라산이 지방조직에서 중성지질 가수분해를 촉진하여 중성지질 축적을 억제하는 효능이 있음을 의미한다.

[0050] 실시예들의 결과를 종합하면, 아젤라산 처리에 따른 지방조직(또는 지방세포)의 중성지질 가수분해 촉진 및 지질축적 억제 효과는 아젤라산이 Olfr544의 리간드로 작용하여 세포 내 cAMP-PKA-HSL 신호전달 과정을 활성화한 결과이다. 즉, 아젤라산은 지방세포 세포막에 발현된 Olfr544 수용체의 효능제(agonist)로서 작용하여 세포 내 cAMP 농도를 특이적으로 증가시키며 이를 통해 PKA 활성을 높이고 CREB과 HSL의 인산화를 증가시켜 지방 가수분해 촉진을 통해 중성지질 분해를 유도한다. 따라서, 아젤라산은 지방조직에서 중성지질의 축적을 감소시켜 비만 및 대사증후군 완화 효능을 가진다.

[0051] 본 발명의 아젤라산을 함유하는 화합물 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염은 다양한 기능성 식품 및 건강 기능성 식품의 제조시 식품의 주성분 또는 첨가제 및 보조제로 사용될 수 있다.

[0052] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, 아젤라산(Azelaic Acid)을 유효성분으로 함유하는 비만 개선용 건강기능성 식품에 관한 것이다.

[0053] 본 발명에서, 상기 비만 개선은 지방조직 내 중성지질 감소, 지방조직 내 지질 축적 억제, 체중감소, 또는 체지방 감소인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0054] 본 발명에서 '기능성 식품'이란, 일반 식품에 본 발명의 아젤라산(Azelaic Acid)을 첨가함으로써 일반 식품의 기능성을 향상시킨 식품을 의미한다. 기능성은 물성 및 생리기능성으로 대별될 수 있는데, 본 발명의 아젤라산

(Azelaic Acid)을 일반 식품에 첨가할 경우, 일반 식품의 물성 및 생리기능성이 향상될 것이고, 본 발명은 이러한 향상된 기능의 식품을 포괄적으로 '기능성 식품'이라 정의한다.

[0055] 본 발명의 기능성 식품은 체지방 축적 감소를 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 기능성 식품은, 예를 들어, 각종 식품류, 캔디, 초콜릿, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

[0056] 본 발명의 상기 조성물은 지방조직 지질 분해 촉진을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강 기능 식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 50 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 20 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0057] 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 조성물을 함유하는 외에는 액체성분에는 특별한 제한 점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등의 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

[0058] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 중점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0059] 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 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0060] 실시예 1: 아젤라산의 분자 표적인 Olfr544의 유전자 및 단백질 발현 분석

[0061] 아젤라산의 분자 표적인 Olfr544 후각 수용체(이하, Olfr544이라 함) 단백질의 지방세포(adipose cell)에서의 발현을 확인하기 위해 유전자 및 단백질의 발현을 측정하는 실험을 수행하였다(도 2). 생쥐(mouse)의 지방조직(adipose tissue)과 분화 배양된 3T3-L1 지방세포에서의 Olfr544의 발현을 각각 RT-PCR 및 qPCR(quantitative real time PCR)로 Olfr544의 유전자 발현을 확인하였고, 웨스턴 블랏(Western blot)과 면역조직염색법(Immunohistochemistry)을 통해 세포 내 Olfr544 단백질의 발현을 확인하였다.

[0062] 1-1: 세포 배양

[0063] 실시예 1~7에서 사용된 지방세포(adipose cell)는 생쥐의 3T3-L1 지방전구세포(pre-adipocyte)(KCLB No. 10092.1)를 분화(differentiation)한 것으로 한국세포주은행에서 입수하였으며, 상기 세포는 10% FCS(fetal calf serum)가 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지 중 5% CO₂, 37℃ 조건 하에서 50% 밀집도(증식정도, confluency)로 세포가 자랐을 때 계대배양하여 유지하였다(Green H *et al.*, *Cell*, 3(2):127-33, 1974; Green H *et al.*, *Cell*, 5(1):19-27, 1975; Atanasov, A. G *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-General Subjects* 1830(10):4813-9).

[0064] 1-2: 세포 분화

[0065] 3T3-L1 지방전구세포의 분화과정은 다음과 같다. 먼저, 6-웰 플레이트(well plate)에 웰(well) 당 1 x 10⁶ 세포

를 분주하여 세포가 100% 밀집되게 배양하였다. 2일 후 상기 배양된 3T3-L1 지방전구세포를 10% FBS(fetal bovine serum)와 MDI 용액(0.5mM IBMX, 0.5 μ M 텍사메사손(dexamethasone), 10 μ g/mL 인슐린(insulin))이 포함된 DMEM 배지에서 3일 동안 처리하였다. 그다음, 상기 처리된 세포를 10% FBS 및 10 μ g/mL 인슐린이 포함된 DMEM에서 배양하여 세포 내 지방방울(lipid droplet)의 형성 여부(정도)를 확인하여 이를 근거로 지방 세포를 분화시켰다(Green H *et al.*, *Cell*, 3(2):127-33, 1974; Green H *et al.*, *Cell*, 5(1):19-27, 1975; Atanasov, A. G *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-General Subjects* 1830(10):4813-9).

그 결과, 총 12일간의 분화과정을 통해 약 80% 이상의 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화되는 것을 확인하였다(데이터 미도시).

1-3: Olfr544 유전자 발현

Olfr544 유전자의 RNA 발현을 확인하기 위해 RT-PCR 및 qRT-PCR을 수행하였다.

(1) cDNA 합성

먼저, 실시예 1-1 및 1-2의 방법으로 분화된 3T3-L1 지방세포로부터 당업자에게 공지된 방법으로 RNA를 추출하고, 상기 추출된 RNA를 ReverTra Ace[®] qPCR RT kit(TOYOBO, 오사카, 일본)를 사용하여 cDNA 합성을 수행하였다. 더욱 상세하게는, RT-PCR 반응의 효율을 높이기 위해 상기 추출된 RNA를 65℃에서 5분간 처리한 다음, 바로 얼음에 보관하였다. 이후 gDNA 제거제가 포함된 2 μ l의 4x DNA Master Mix와 0.5 μ g의 RNA, 증류수(nuclease-free water)로 총 8 μ l의 반응물을 제조하여 37℃에서 5분 동안 반응시켰다. 그다음, 상기 반응생성물에 5x RT Master mix를 첨가하고 37℃-5분, 50℃-5분, 98℃-5분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

(2) PCR

상기 (1)의 방법으로 합성된 cDNA는 당업자에게 공지된 방법으로 표 1에 개시된 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 그다음, 수득된 PCR 산물은 전기영동으로 아가로스젤에 내려 밴드로 Olfr544 유전자의 RNA 발현 여부를 확인하였다. 이때, 대조군으로 GAPDH(Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase, 당업자에게 통상적으로 공지된 서열)를 사용하였다.

하기 표 1은 Olfr544 프라이머 서열을 나타낸 것이다.

표 1

이름	타입	서열(5' → 3')	서열번호
m olfr544_F	센스	GGG GAC ATC TCG CTG AAT AA	1
m olfr544_R	एं티센스	ATG AGG ACA TGG TGG AGG AG	2

(3) qPCR(quantitative real-time PCR)

상기 (1)의 방법으로 합성된 cDNA를 사용하여 qPCR은 당업자에게 공지된 방법으로 표 1에 개시된 프라이머를 사용하여 THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix(TOYOBO, 오사카, 일본)와 iQ5 iCycler 시스템(Bio-rad, 캘리포니아, 미국)를 이용하여 수행하였으며, 더욱 상세하게는 95℃에서 4분 30초 동안 변성한 후 같은 온도에서 10초 동안 40 사이클(cycle)에 걸쳐 변성 과정을 추가로 거친 다음, 55℃~60℃에서 30초간 가열 냉각 과정을 수행하였고 68℃에서 20초간 신장해주었다. 각 유전자 발현 정도는 GAPDH 발현을 이용하여 표준화시켰다. 프라이머 디자인은 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 nucleotide blast software를 이용하여 디자인하였으며 Bionics(서울, 한국)에서 구매하였다.

그 결과, 도 2A 및 2B에 나타난 바와 같이, RT-PCR 및 qPCR 실험에서 생쥐(mouse)의 지방조직(adipose tissue)과 3T3-L1 지방세포에서의 Olfr544의 유전자 발현(RNA 레벨에서)이 유의적으로 나타나는 것을 확인하였다. 특

히, 두 실험 모두에서 3T3-L1 지방세포보다 지방조직에서 더 높은 수준의 Olfr544의 유전자 발현이 관찰되었다.

[0078] 1-4: Olfr544 단백질 발현

[0079] Olfr544 유전자의 최종 산물인 단백질 발현을 확인하기 위해, 단백질 전기영동(SDS-PAGE), 웨스턴 블랏(western blot) 및 면역조직염색법(Immunohistochemistry)을 수행하였다.

[0080] (1) 단백질 추출(protein extraction)

[0081] 실시예 1-1 및 1-2의 방법으로 분화된 3T3-L1 지방세포로부터 단백질을 추출하였다.

[0082] 세포막 단백질(membrane protein) 분획을 수득하는 경우, 3T3-L1 지방세포(또는 지방조직(adipose tissue))를 PBS(phosphate-buffered saline)로 헹구어 세포(또는 조직) 펠렛만을 모으고, 용액 C(120mM NaCl, 5mM KCl, 1.6mM MgSO₄, 25mM NaHCO₃, 7.5mM D-glucose, pH 7.4)로 세척한 다음, 용액 D(용액 C + 10mM CaCl₂)를 넣고, 20분간 교반시켜 원심분리하였다. 원심분리 후 수득한 상층액을 다시 원심분리하여 수득된 침전물을 TEM 완충용액(10mM Tris, 3mM MgCl₂, 2mM EDTA, pH 8.0)와 글리세롤(glycerol)에 용해시켜 세포막 단백질(membrane protein) 분획으로 최종 수득하였다. 상기과 같은 단백질 추출방식은 기존 세포막 분획법인 기계적 교반 방법보다 단백질 수율이 높은 칼슘이온 충격법으로 알려져 있다.

[0083] 한편, 세포기질 단백질(cytosol protein) 분획을 수득하는 경우, 3T3-L1 지방세포(또는 지방조직(adipose tissue))를 PBS로 헹구어 펠렛만을 모아 디기토닌(digitonin)이 함유된 완충용액(150mM NaCl, 50mM HEPES, 25 μg/ml 디기토닌(digitonin), pH 7.4)을 첨가하고 10분간 얼음 위에 방치한 뒤, 원심분리하여 상층액을 세포기질 단백질(cytosol protein) 분획으로 최종 수득하였다.

[0084] 한편, 분획 과정 없이 총 단백질(whole protein extract)을 수득하는 경우, 3T3-L1 지방세포에 세포 용해 완충용액(50mM Tris, 1% Triton-X 100, 1mM EDTA, PI(proteinase inhibitor))을 첨가하고 세포를 용해한 다음, 13,000rpm로 4℃에서 20분간 원심분리하여 상층액을 수득하였다.

[0085] (2) 단백질 전기영동(SDS-PAGE)과 웨스턴 블랏(western blot)

[0086] Olfr544 단백질 발현 여부의 확인을 위해, 상기 (1)의 방법으로 추출된 단백질 분획(세포막 단백질(membrane protein), 세포기질 단백질(cytosol protein)) 및 총 단백질(whole protein extract)은 Bradford 방법으로 정량하였다. 각각의 시료는 약 40 μg의 단백질을 취해, 추출된 단백질 유형(분획된 단백질, 총 단백질 또는 인산화된 단백질, 등)에 따라 적절하게 가열 및/또는 용해시켜 변성된 단백질을 사용하여 12% SDS-PAGE를 수행하였다.

[0087] 웨스턴 블랏은 SDS-PAGE 젤로부터 블랏팅된 단백질을 함유하는 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane, NC membrane)에 비특이적 결합을 방지하기 위해 블랏킹(blocking)한 다음, 검출하고자 하는 단백질에 대한 1차 항체(항-Olfr544 토끼 항체(Abcam, 영국), 항-β-actin 항체(로딩 컨트롤(loading control), Santa Cruz, 캘리포니아, 미국)) 및 2차 항체(HRP-접합-항-토끼 IgG, Santa Cruz, 캘리포니아, 미국)를 순차적으로 처리한 다음, 각각 실온에서 1시간 동안 처리하였다. 그다음, 웨스턴 블랏에서의 단백질 밴드의 함량 비교는 소프트웨어(Gel-Pro Analyzer 4.0)를 통해 정량 및 수치화하였다.

[0088] (3) 면역조직염색법(Immunohistochemistry)

[0089] 면역조직염색법으로 Olfr544의 세포 내 발현 정도와 발현 위치를 확인하기 위하여 배양된 세포를 6-웰 플레이트(well plate)에 각 웰(well) 당 1×10^5 세포 농도로 분주하여 24시간 동안 부착 및 안정화시킨 다음, Lipofectamine 2000(Intivrogen, 캘리포니아, 미국)을 사용하여 3T3-L1 지방세포에 lucy-flag-Olfr544 발현 벡터를 24시간 동안 형질감염(transfection)시켰다. 그다음, PBS로 세포를 세척한 다음, 4% 파라포름알데히드를 20분간 처리하여 lucy-flag-Olfr544 발현 벡터로 형질감염된 3T3-L1 지방세포를 고정시키고, Olfr544 단백질, 세포막 및 핵을 후술되는 각각의 염색제(i, ii, iii)로 염색하였다.

- [0090] i) Olfr544 단백질의 염색을 위해, 3T3-L1 지방세포를 항-flag 1차 항체(Sigma, 미국) 또는 항-Olfr544 항체(Abcam, 케임브리지, 영국))로 실온에서 1시간 동안 반응시킨 다음, PBS로 3회 세척하고, 녹색 형광이 표지된 항-토끼 IgG 2차 항체를 첨가하고, 은박지로 빛을 차단한 다음, 1시간 동안 처리하였다.
- [0091] ii) 세포막 염색을 위해, 형광이 표지된 CellMask™ Orange Plasma Membrane Stains(Invitrogen, 캘리포니아, 미국)를 사용하여 37℃에서 10분간 처리하여 세포막을 염색하였다.
- [0092] iii) 핵 염색을 위해, DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)(Sigma, 미국) 용액을 처리하여 핵을 염색한 다음, 커버 슬라이드를 덮어 밀봉하였다.
- [0093] 상기와 같이, 최종 염색된 3T3-L1 지방세포는 공초점형광현미경(confocal fluorescent microscope, LSM700, Carl Zeiss)을 사용하여 촬영되었다.
- [0094] 그 결과, 도 2C에 나타난 바와 같이, 웨스턴 블랏 실험에서 Olfr544 단백질은 3T3-L1 지방세포의 세포기질(cytosol)에서 검출되지 않았고, 세포막(membrane protein) 분획에서 높은 수준으로 발현되었다. 또한, 도 2D에 나타난 바와 같이, 면역조직염색법(Immunohistochemistry)을 수행한 결과, Olfr544 단백질은 세포막 마커와 함께 3T3-L1 지방세포의 세포막에 공존(colocalization)하며, 세포막에 유의적으로 발현되는 것으로 나타났다.

[0095] **실시예 2: 아젤라산의 세포독성 평가**

- [0096] 아젤라산의 세포독성을 평가하기 위해 MTT 어세이(MTT assay)를 수행하였다.
- [0097] MTT 어세이는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT 테트라졸륨(tetrazolium)을 청자색을 띄는 비수용성의 MTT 포르마잔(formazan)(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법이다. MTT 시약은 $C_{18}H_{16}BrN_5S$ (Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide)를 PBS(Phosphate buffered saline)에 2~5mg/ml의 농도로 희석하여 준비하였다.
- [0098] 먼저 96-웰 플레이트(well plate)에 3T3-L1 지방세포를(4×10^5 세포/ml) 분주하고, 37℃, 5% CO₂ 하에서 24시간 배양한 다음, 아젤라산을 0~500 μM 농도 구간에서 처리하여 24시간 배양하였다. 각 시료에 MTT 시약을 4mg/mL 농도로 100 μL 첨가한 다음, 37℃, 5% CO₂ 하에서 4시간 배양한 후, DMSO(Dimethyl sulfoxide)을 100 μL 첨가하고, 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 수치는 생존 세포 수와 비례하는 원리를 이용하여 독성에 의한 세포 사멸 효과를 정량한 것이다.
- [0099] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 3T3-L1 지방세포에 아젤라산을 500 μM의 고농도에 처리해도 세포독성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 따라서, 보리, 귀리 등 곡류를 포함한 각종 섭취 가능한 식물에 포함되어 있고, 인체 내 대사과정에서 생성되어 약 10~50 μM 농도로 존재하는 아젤라산은, 인체 내에서 안전하게 섭취될 수 있는 물질임을 알 수 있었다.

[0100] **실시예 3: 아젤라산의 Olfr544 리간드 효능 평가**

- [0101] 생체 외 어세이(*in vitro* assay)로 아젤라산의 Olfr544 리간드 활성을 평가하기 위하여 리포트 유전자 어세이(reporter gene assay)를 수행하였다. 통상적으로 후각 수용체(olfactory receptor, OR)는 조직 세포(tissue cell)에서 유전자 발현도가 낮을 뿐 아니라 세포막에서의 단백질 발현도 또한 낮아 연구에 어려움이 있다. 이를 해결하기 위해 Hana3A 세포주를 듀크대학의 Hiroaki Matsunami 교수 연구팀으로부터 공여받아 실험에 사용하였다(Zhuang H *et al.*, *Nat Protocol*, 3:1402-1413, 2008). Hana3A 세포주는 HEK293T 세포주에 OR 단백질의 세포막 발현에 필수적 보조인자인 RTP1S(receptor-transporting protein 1S)와 Ric8b(RIC8 Guanine Nucleotide Exchange Factor B)를 공동발현(co-expression)시킨 형질전환된 세포주(stable cell line)로 OR 단백질의 세포막 발현을 크게 향상(최적화)시키는 특성이 있는 세포주이다.
- [0102] 리포트 유전자 어세이(reporter gene assay)는 다음과 같이 수행하였다. 먼저, Hana3A 세포주에 Olfr544 발현 벡터와 CRE(cAMP response element)-Luciferase 리포트 벡터를 형질감염(transfection)시킨 다음, 아젤라산을 18시간 처리하고 FL(firefly luciferase) Assay kit를 사용해 루시페라아제(luciferase) 활성을 측정하고, 이를 기반으로 용량 반응 곡선(Dose responsive curve, DRC)을 그려, 리간드의 효능제(agonist)로서의 효과를 판

단하는 지표인 50% 유효 농도(EC_{50})를 계산하였다.

[0103] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, CRE(cAMP response element)-Luciferase 리포터 유전자 어세이를 사용하면, 아젤라산이 1~1000 μ M 농도 구간에서 농도 의존적으로 Olfr544 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. 또한, EC_{50} 값은 29.71 μ M로 나타나 이 농도에서 약 50%의 Olfr544가 활성화되는 것으로 확인되었다. 아젤라산은 생체 내에서 자연적으로 생성되고, 통상적으로 아젤라산의 혈중 농도는 수십~수백 μ M(micromolar) 수준으로 다양하게 보고된 바 있어, 상기 측정된 EC_{50} 값은 아젤라산이 생체 내에서 독성없이 Olfr544를 활성화할 수 있음을 나타낸다.

[0104] 결국, 도 4에서 확인된 아젤라산의 표적 단백질인 olfr544에 대한 EC_{50} 값인 29.71 μ M을 근거로 대사성 질환 약물인 Actos(피오글리타존(pioglitazone), PPAR- γ 효능제(agonist), EC_{50} =0.5 μ M, 인체투여량: 15~30mg/day) 및 비만 치료제인 Xenical(Olistat, 췌장 리파제 억제제(pancreatic lipase inhibitor), EC_{50} =0.24 μ M, 인체투여량: 120mg/day)를 토대로 아젤라산의 유효 투여량을 산출해 보면 약 900~1800mg/day이다. 이는 하루 섭취량으로 가능한 용량이며 아젤라산이 체내에서 생성되는 양과 일반 식품에서 섭취되는 양을 고려하면 실제 아젤라산의 유효섭취량은 이보다 감소할 수 있을 것으로 사료된다.

[0105] 실시예 4: 아젤라산 처리에 따른 3T3-L1 지방세포에서 이차 전령물질의 농도변화 분석

[0106] 아젤라산이 GPCR인 Olfr544를 활성화시키고, 중성지방분해 관련 신호전달 과정에 관여하는지 확인하고자 하였다.

[0107] GPCR은 리간드 결합에 따른 G-단백질 활성화를 통해 이차 전령물질로 세포 내 신호전달 과정을 조절하는 것으로 알려져 있다. G-단백질의 종류에 따라 cAMP, IP_3 및/또는 칼슘을 이차 전령물질로 사용한다.

[0108] 따라서, 3T3-L1 지방세포에서 Olfr544의 리간드인 아젤라산에 의한 이차 전령물질인 cAMP, IP-one(IP_3 대사물) 및 칼슘의 농도 변화를 측정하였다. IP_3 의 경우 안정성이 낮아 쉽게 IP-one으로 분해가 되므로 세포 내 IP-one(IP_3 대사물) 양을 대신 정량하였다.

[0109] cAMP 어세이는 cAMP 표준 검량 곡선을 이용하여 리간드에 의해 활성화된 GPCR 수용체의 이차 전령물질인 cAMP의 생성량을 추정하는 원리를 이용한다. cAMP Assay ELISA kit(Enzo Life science, 뉴욕, 미국)에 포함된 96 웰-플레이트는 GxR IgG 항체로 코팅되어 있으며, 표준 검량 곡선 작성을 위한 파란색 용액의 cAMP는 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase)와 결합한 다음, 토끼 항체에 의해 노란색으로 변화한다. 이는 cAMP와 결합된 웰이 pNpp 기질의 첨가에 의해 알칼라인 포스파타제가 활성화되면 색의 변화를 일으키고, 파장 405nm에서 비색 정량에 따라 cAMP 농도를 측정할 수 있다. 본 실험에서는 3T3-L1 지방세포를 96-웰 플레이트에서 웰 당 1×10^4 세포들로 분주하여 분화시킨 다음, 50 μ M 아젤라산 및 양성대조군인 1 μ M Forskolin을 18시간 동안 처리하여 상기 명시된 방법대로 cAMP 농도를 측정하였다.

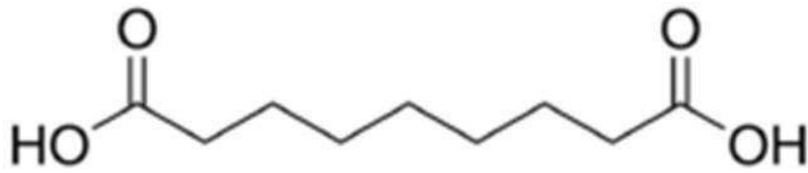
[0110] IP-one 어세이는 GPCR의 신호전달 과정 중 포스포리파아제(phospholipase)에 의해 인지질 분해로 생성된 이차 전령물질인 IP_3 의 농도를 측정하여 PKC(protein kinase C) 신호전달 과정 조절능을 측정하는 방법이다. 본 실험에서는 3T3-L1 지방세포를 96-웰 플레이트 웰에 웰 당 1×10^4 세포들로 분주하여 분화시킨 다음, 50 μ M 아젤라산을 18시간 동안 처리하여 IP_3 를 측정하기 위해 오차가 적은 세포 내 IP-one(IP_3 대사물)을 대리 표지자로 IP-one ELISA Assay kit(Cisbio, 프랑스)를 사용하여 측정하였다.

[0111] 세포 내 칼슘의 측정은 칼슘 이온을 표지하는 형광 염료인 Fluo-4 DirectTM Calcium Assay Kit(Invitrogen, 캘리포니아, 미국)를 사용하여 측정하였다. 배양된 3T3-L1 지방세포를 수득하여, 원심분리 후 펠렛만을 키트 내 함유된 Fluo-4 DirectTM calcium assay 완충용액에 2.5×10^6 세포/mL 농도로 희석시켰다. 이를 96-웰 플레이트(96-well plate)에 분주시켜 37 $^{\circ}$ C 상태의 5% CO_2 조건 하에서 60분간 배양시킨 다음, 96-웰 플레이트에 50 μ L의 2X Fluo-4 DirectTM calcium reagent loading solution을 분주하였고, 37 $^{\circ}$ C 상태의 5% CO_2 조건 하에서 30분간 플레이트에 배양한 다음, excitation 494nm 및 emission 516nm 조건에서 형광을 측정하였다.

- [0112] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 아젤라산의 경우 세포 내 cAMP 농도를 유의적으로 증가시켰으나 IP₃ 및 칼슘 농도에는 영향을 주지 않았다. 아젤라산에 의한 cAMP 농도 증가는 아젤라산의 농도에 따라 증가하는 양상을 보였다. 따라서, 아젤라산은 3T3-L1 지방세포에서 Olf544 활성화를 통해 세포 내 cAMP 농도를 특이적으로 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.
- [0113] **실시예 5: 아젤라산에 의한 PKA 활성 조절 효능 평가**
- [0114] 조직 세포 내 cAMP의 농도 변화에 따라 신호전달 관련 단백질 활성을 조절하는 대표적인 단백질이 PKA(protein kinase A)이다. 통상적인 조건에서 PKA는 단백질의 조절 도메인 부위가 효소활성부위를 가로막고 있어 활성이 억제되어 있는데 cAMP 농도가 증가하면 cAMP가 PKA의 조절부위에 결합하여 활성부위가 노출되며 이에 따라 PKA 활성이 증가된다. 본 실험에서는 아젤라산에 의한 PKA 활성 변화를 측정하였다. PKA 활성측정은 Enzo PKA kinase activity kit(Cat. # ADI-EKS-390A, Enzo Life Sciences, 한국)를 사용하여 측정하였다.
- [0115] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 아젤라산이 3T3-L1 지방세포에서 PKA 활성을 유의적으로 증가시켰다. 아젤라산을 50 μM 농도를 2시간 처리하였을 때 대조군과 비교하여 PKA 활성이 113.8% 증가하는 결과를 확인하였다. 따라서, 아젤라산 처리에 따른 지방세포의 cAMP 증가로 PKA 활성이 증가하였다.
- [0116] **실시예 6: 아젤라산에 의한 CREB 및 HSL 단백질 인산화 변화 분석**
- [0117] 아젤라산에 의해 PKA 단백질 활성이 증가되면 PKA 표적 단백질의 인산화가 증가한다. 따라서, 지방세포에서 PKA의 표적 단백질로 알려진 CREB(cAMP-response element binding protein) 및 HSL(hormone-sensitive lipase)의 인산화를 웨스턴 블랏으로 확인하였다. 웨스턴 블랏은 실시예 1에 기술된 방법을 사용하였고, 아젤라산을 3T3-L1 지방세포에 2시간 반응시킨 다음, 단백질을 추출하여 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 1차 항체는 항-phospho-CREB 및 항-phospho-HSL 항체(Santa Cruz, 캘리포니아, 미국)이다.
- [0118] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 아젤라산을 50 μM 농도로 2시간 처리한 경우 대조군(C)에 비해 CREB과 HSL의 인산화가 급격히 증가하였다. 결국, 지방세포에서 cAMP 농도의 증가는 PKA 활성을 자극하여 HSL의 인산화가 증가되고 이에 따른 HSL의 활성화는 지방소적(lipid droplet)에 저장된 중성지질 가수분해를 촉진한다. 따라서, 이는 아젤라산이 지방세포의 중성지질을 가수분해하는 효능이 있음을 시사하는 결과이다.
- [0119] **실시예 7: 아젤라산에 의한 지방세포 중성지질 농도, 콜레스테롤 농도 및 지질 가수분해 변화 분석**
- [0120] 아젤라산이 cAMP-PKA-HSL 신호전달 과정 활성화를 통해 지방세포의 중성지질 가수분해를 유도하는지 알아보기 위하여 지방세포에 아젤라산을 직접 처리한 다음, 세포 내 지질농도를 측정하였다.
- [0121] 3T3-L1 지방세포에 아젤라산을 25 또는 50 μM 농도로 처리한 다음, 세포 내 지질을 추출하여 TG assay kit(BioVision, 캘리포니아, 미국)를 사용하여 중성지질 농도를 측정하였고, Amplex Red cholesterol assay kit(Invitrogen, 캘리포니아, 미국)를 통해 콜레스테롤 농도를 측정하였다.
- [0122] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 아젤라산이 3T3-L1 지방세포에서 중성지질 농도를 유의적으로, 농도 의존적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 50 μM 아젤라산을 처리한 경우, 세포 내 중성지질 농도가, 대조군과 비교하여, 61.5% 감소하였다(P<0.05). 한편, 세포 내 콜레스테롤 농도는 유의적인 변화를 보이지 않아 아젤라산이 지방조직의 중성지질을 선택적으로 가수분해하는 것을 알 수 있었다.
- [0123] 또한, 아젤라산이 중성지질을 가수분해하는 효능이 있는지 확인하기 위해서 중성지질의 분해산물인 글리세롤 방출량을 측정하였다. 3T3-L1 지방세포에 50 μM 아젤라산을 2시간 처리한 결과, 중성지질의 분해산물인 글리세롤이, 대조군과 비교하여, 46.7% 증가하여 글리세롤 방출량이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다.
- [0124] 종합하면, 본 발명에서 아젤라산이 지방세포의 막에 발현되는 GPCR인 Olf544에 리간드로 결합하여 Olf544를 활성화시키고, cAMP-PKA-HSL 신호전달 경로 활성화를 통해 중성지질을 가수분해하여 지방세포의 중성지질 농도를 감소시키는 것을 확인하였다. 특히, 생체 내에서 자연적으로 생성되는 천연물질인 아젤라산은 보리, 호밀 등 곡류에 함유되어 있으므로 섭취가능한 성분이고, 체내의 지방세포에 작용하여 중성지질 가수분해를 촉진하여 체지방 감소와 항비만 효능을 얻을 수 있다.

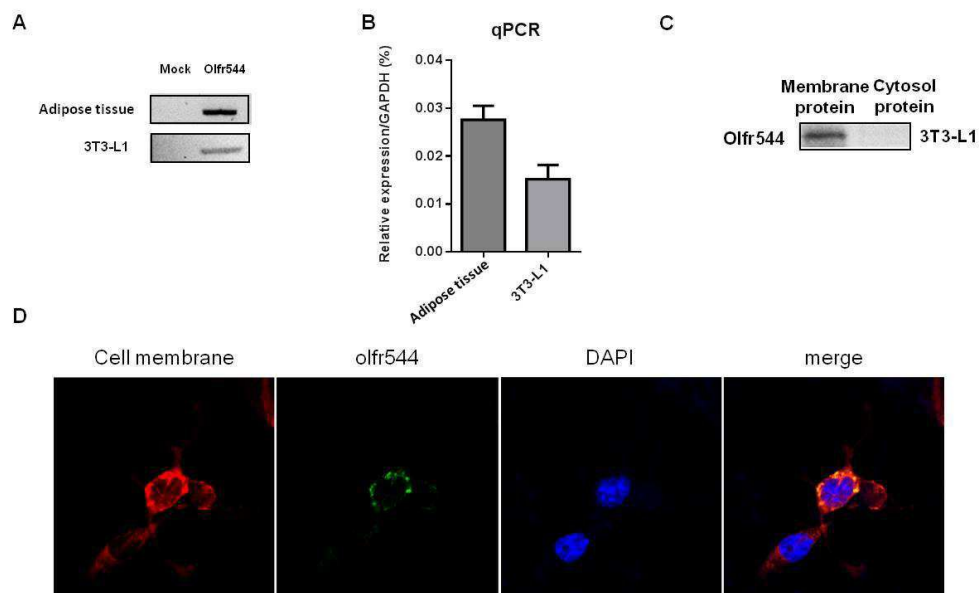
도면

도면1

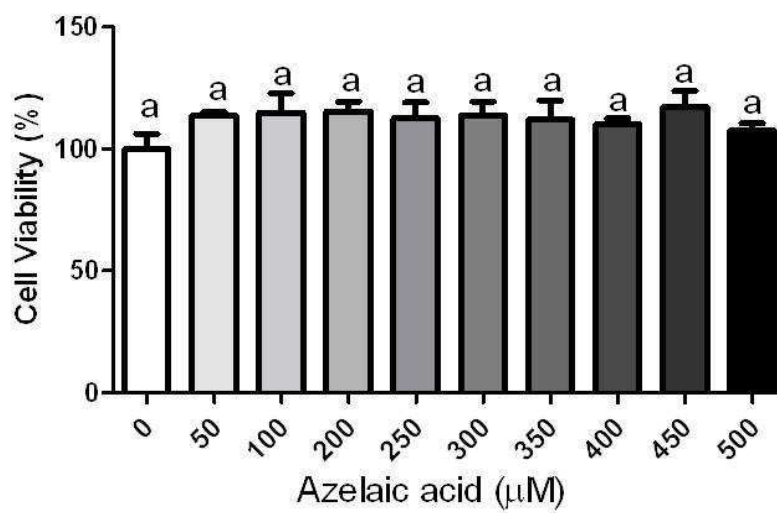


분자량: 188.22 g/mol, 분자식: $C_9H_{16}O_4$

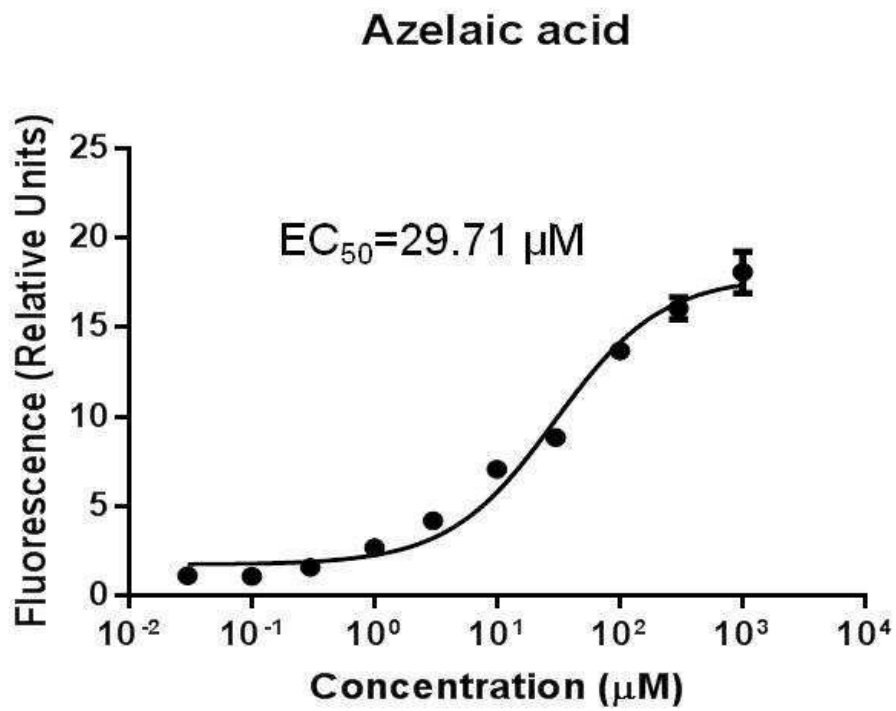
도면2



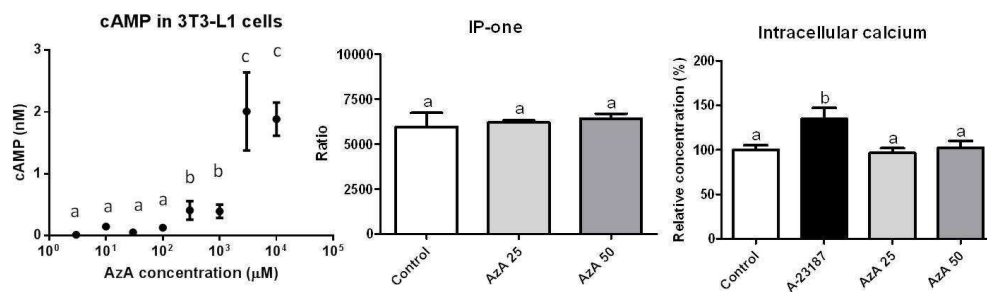
도면3



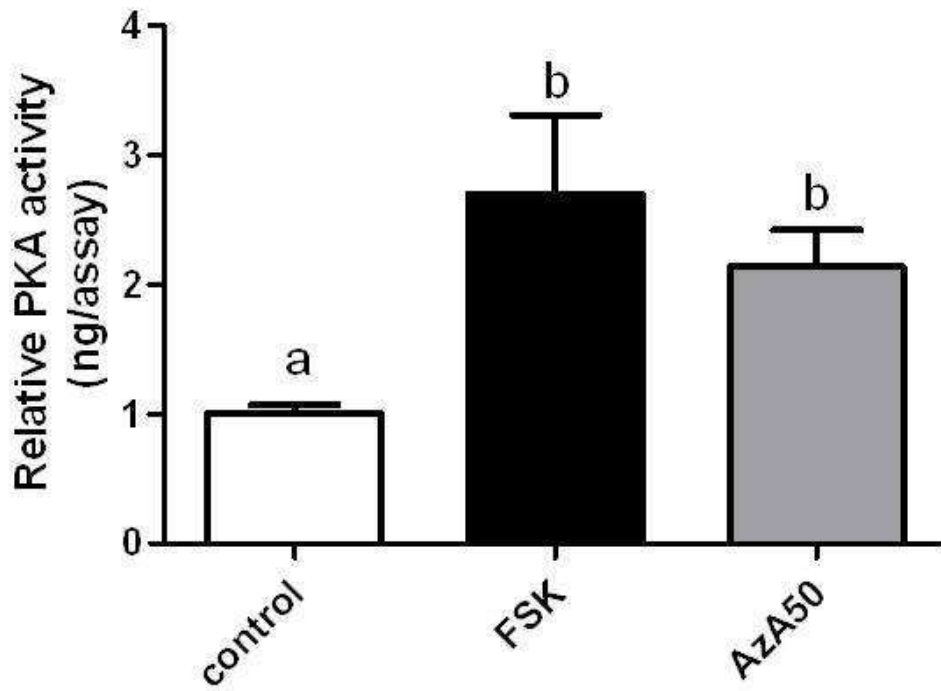
도면4



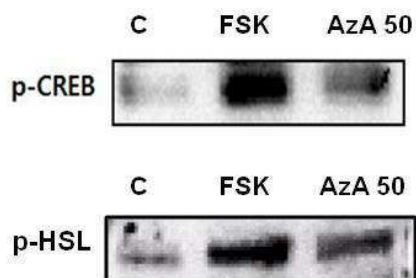
도면5



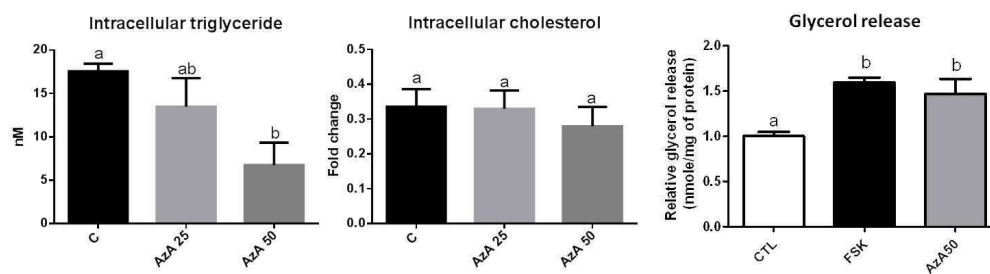
도면6



도면7



도면8



서열목록

<110> Korea University Research And Business Foundation

<120> Composition of Azelaic Acid Having Adipose Triglyceride
Hydrolysis effect

<130> P15-B180

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> m olfr544_F

<400> 1

ggggacatct cgctgaataa 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> m olfr544_R

<400>

> 2

atgaggacat ggtggaggag 20