



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A61K 31/045 (2006.01)

A61K 36/03 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0070302

(43) 공개일자 2007년07월04일

(21) 출원번호 10-2005-0074269

(22) 출원일자 2005년08월12일

심사청구일자 2005년08월12일

(71) 출원인 한밭대학교 산학협력단
대전 유성구 덕명동 산16-1

(72) 발명자 이봉호
대전 유성구 지족동 열매마을아파트 410호 1404호
최병욱
대전 유성구 전민동 청구나래아파트 109동 1505호
신중헌
대전 서구 둔산1동 1509 크로바아파트 103동 1005호

(74) 대리인 특허법인 씨엔에스·로고스

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 디아실 글리세롤 아실트랜스퍼라제 활성 억제제 및 이를포함하는 고지혈증과 비만의 예방 및 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 디티올 E를 포함하는 DGAT(디아실 글리세롤 아실트랜스퍼라제, Diacyl glycerol acyl transferase) 활성 억제제 및 이를 포함하는 고지혈증과 비만의 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 디티올 E를 유효성분으로 포함하며, DGAT 억제 활성을 나타내는 DGAT 활성 억제제 및 이를 유효성분으로 하는 고지혈증과 비만의 예방 및 치료용 약학 조성물이 제공된다.

본 발명에 따른 디티올 E를 포함하는 DGAT 활성 억제제는 종래의 DGAT 억제제에 비하여 활성이 우수하여 고지혈증과 비만의 치료 및 예방용으로 유용하게 사용될 수 있다.

특허청구의 범위

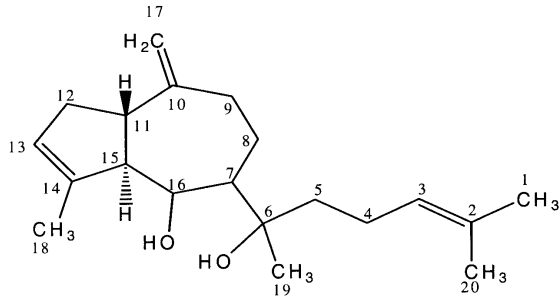
청구항 1.

디티올 E 화합물을 유효성분으로 포함하는 DGAT(디아실 글리세롤 아실트랜스퍼라제, Diacyl glycerol acyl transferase) 활성 억제제.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 디티올 E 화합물은 하기 화학식 1로 나타내어지는 것을 특징으로 하는 DGAT 활성 억제제.

[화학식 1]

**청구항 3.**

제 1항에 있어서, 상기 디티올 E 화합물은 갈조류를 유기용매로 추출하여 조추출물을 얻는 단계; 상기 조추출물을 감압하에서 용매를 증기화하여 잔류물을 얻는 단계; 상기 잔류물을 극성에 따라 분획을 얻는 단계; 상기 분획을 감압하에서 용매를 증기화하여 극성 유기농축물을 얻는 단계; 상기 농축물을 크로마토그래피로 정제 및 분리하는 단계를 통해 분리되는 것을 특징으로 하는 DGAT 활성 억제제.

청구항 4.

제 3항에 있어서, 상기 유기용매는 메탄올, 에탄올, 클로로포름, 아세톤 및 디클로로메탄으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 1가지 이상의 용매인 것을 특징으로 하는 DGAT 활성 억제제.

청구항 5.

제 1항에 있어서, 상기 갈조류는 가죽그물바탕말(파치디티온 코리아세움(*Pachydictyon coriaceum*))인 것을 특징으로 하는 DGAT 활성 억제제.

청구항 6.

제 1항의 DGAT 활성 억제제를 유효성분으로 하는 고지혈증과 비만의 예방 및 치료용 약학 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 디티올 E를 포함하는 DGAT(디아실 글리세롤 아실트랜스퍼라제, Diacyl glycerol acyl transferase) 활성 억제제 및 이를 포함하는 고지혈증과 비만의 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

선진국의 순환기 질환관련 사망률은 전체 사망률의 30% 이상으로 증가 추세에 있으며 국내의 경우도 식생활의 서구화에 따른 순환기질환의 증가 추세로 예방과 질병상태의 진전 완화 차원의 치료방법이 중요하게 떠오르고 있다. 중성지방 (Triacylglycerol; TG)이 장기나 조직에 과도하게 축적되면 지방간, 비만, 고지방중성혈증 등을 야기시켜 동맥경화, 당뇨, 대사이상 및 장기의 기능저하 등의 심각한 질병을 유발하는데 중성지방의 생합성은 글리세롤 3-포스페이트와 모노글리세라이드 경로에 의해 주로 이루어지며, DGAT(acyl CoA:diacylglycerol *O*-acyltransferase, EC2.3.1.20)는 글리세롤 3-포스페이트 경로의 마지막 단계를 촉매하는 마이크로솜 효소로 sn-1,2-디아실글리세롤과 지방 아실 CoA(fatty acyl CoA)를 기질로 사용하여 트리아실글리세롤(triacylglycerol(TG))을 생성한다.

최근 새로 동정된 DGAT 유전자의 생체내 기능을 밝히기 위해 만들어진 DGAT-결핍 마우스로부터 선택적인 중성지방의 합성저해가 비만과 고지혈증의 치료에 유용하다는 사실을 시사하는 보고가 있었다. 따라서 DGAT가 비만치료제의 새로운 목표로 등장하였다. 아직까지 DGAT를 목표로 하는 신약은 없으며 많은 기관에서 천연물을 대상으로 DGAT 억제제를 개발하는 연구를 진행하고 있다.

한편, 천연자원에서부터 생리활성 물질을 찾으려는 시도는 오랜 세월동안 이루어져 왔으며 실제로 많은 의약품이 천연물로부터 추출되었다. 동맥경화, 고지혈증, 비만, 당뇨는 현대인의 건강을 크게 위협하는 성인병들이며 이의 개선/치료효능을 갖는 의약선도 물질의 개발이 절실히 필요한 실정이다.

또한 천연물 연구는 새로운 유용 천연자원의 발굴, 보존함으로써 생물다양성의 국제보호체제에 대처하고 경제적 가치를 부여함으로써 고부가가치의 생리활성 물질의 창출 가능하다.

이에 따라, 본 발명자들은 해조류로부터 유용한 물질을 추출, 정제하기 위하여 광범위한 연구를 수행한 결과 우리나라 근해에 서식하는 해조류인 가죽그물바탕말로부터 분리된 테르펜 물질이 우수한 DGAT 억제 활성을 나타냄을 발견하였으며, 이러한 물질이 고지혈증이나 비만억제제로 개발가능성이 높음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 천연물로부터 추출되며, 종래 DGAT(디아실 글리세롤 아실트랜스퍼라제, Diacyl glycerol acyl transferase) 활성 저해제에 비해 더욱 우수한 억제 활성을 나타내는 고지혈증과 비만의 예방 및 치료용으로 유용한 DGAT 활성 억제제를 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 DGAT 활성 억제제를 유효성분으로 하는 고지혈증과 비만의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성

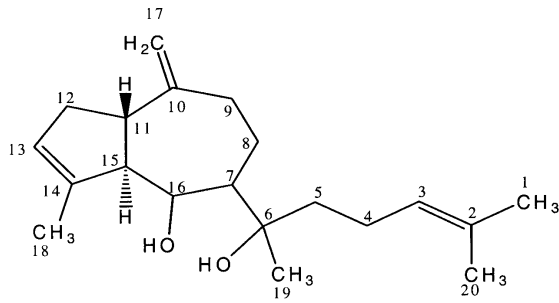
본 발명의 일견지에 의하면, 디티올 E 화합물을 유효성분으로 포함하는 DGAT(디아실 글리세롤 아실트랜스퍼라제, Diacyl glycerol acyl transferase) 활성 억제제가 제공된다.

본 발명의 다른 견지에 의하면, 상기 DGAT 활성 억제제를 유효성분으로 하는 고지혈증과 비만의 예방 및 치료용 약학 조성물이 제공된다.

이하 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

본 발명의 DGAT 활성 억제제에 유효성분으로 포함되는 화합물은 디티올 E이며, 이는 갈조류로부터 분리되며, 바람직하게 하기 화학식 1로 나타내어진다.

[화학식 1]



상기 디티올 E의 분리방법은 통상적인 유기 용매를 이용한 어떠한 분리방법이 사용될 수 있다. 예를들어, 상기 디티올 E의 분리는 갈조류를 유기용매로 추출하여 조추출물을 얻는 단계; 상기 조추출물을 감압하에서 용매를 증기화하여 잔류물을 얻는 단계; 상기 잔류물을 극성에 따라 분획을 얻는 단계; 상기 분획을 감압하에서 용매를 증기화하여 극성 유기농축물을 얻는 단계; 상기 농축물을 크로마토그래피로 정제 및 분리하는 단계를 포함한다. 이때 상기 유기용매는 메탄올, 에탄올, 클로로포름, 아세톤 및 디클로로메탄으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 1가지 이상의 용매가 사용될 수 있다.

또한, 상기 크로마토그래피로 분리하는 공정은 상세하게는, 역상 오픈 크로마토그래피(C₁₈ reversed-phase open chromatography){고정상: YMC ODS-A 반분취 실리카, 입자의 지름: 75 μ m, 유리필터컬럼: 3.5 X 50cm(내경 X 길이), 용리액: 85%/15%=메탄올/물}로 얻은 반고형 성분을 다시 실리카 오픈 컬럼{고정상: Merck EM9385 실리카, 유리필터컬럼: 2 X 50cm(내경 X 길이), 용리액: 9.8/0.2 =클로로포름/메탄올}으로 용출한 분획을 합하여 진공건조하여 얻은 잔류물을 역상 반분취 HPLC 컬럼{고정상: YMC ODS-A 반분취 실리카, 입자의 지름: 5 μ m, 10 X 250mm(내경 X 길이) 용리액: 70% 메탄올/물 → 100% 메탄올과 같이 10% 씩 메탄올을 증가시킨 혼합액}으로 추출 및 분리하는 것으로 이루어질 수 있다.

또한 상기 갈조류는 이에 한정하는 것은 아니나, 가죽그물바탕말(파치딕티온 코리아세움(*Pachydictyon coriaceum*))이 바람직하다.

본 발명의 DGAT 활성 억제제는 DGAT에 대해 비교군(크산토후몰(Xanthohumol))보다 강력한 억제 활성을 나타냄을 발견하여 종래 DGAT 활성 억제제보다 우수함을 확인하였다.

따라서, 본 발명은 상기 DGAT 활성 억제제를 유효성분으로 하는 고지혈증과 비만의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

본 발명의 화합물을 유효성분으로 하는 고지혈증과 비만의 예방 및 치료제의 구체적인 투여량은 연령, 체중, 증상, 치료대상이 되는 질병, 투여경로, 치료기간 등에 따라 결정된다. 즉 의사가 각 환자에 대하여 가장 적합한 실질 투여량을 결정할 것이며, 그 환자의 연령, 체중, 증상 및 치료대상이 되는 질병등에 따라 실질 투여량은 달라질 수 있다.

본 발명의 화합물을 유효성분으로 하는 고지혈증과 비만의 예방 및 치료제는 단독으로 투여될 수 있지만, 일반적으로 목적된 투여경로 및 표준 약학적 관행에 있어서 선택된 약학적 허용가능한 담체 또는 희석제와 혼합되어 투여된다. 이러한 본 발명의 고지혈증과 비만의 예방 및 치료제의 투여는 고형 제형, 액체 제형 또는 다른 제형과 같은 경구 투여용 형태, 주사액, 도포제 또는 좌약 등과 같은 비경구 투여용 형태로 이루어질 수 있다.

또한 본 발명의 고지혈증과 비만의 예방 및 치료제는 1일 1회 내지 수회 투여될 수 있으며, 경구 또는 비경구 투여를 통해 전신적으로 또는 국소적으로 투여될 수 있다. 예를 들면, 정제, 환제, 과립제, 캡슐제, 액제, 에멀전, 현탁액, 시럽제 등의 형태로 경구투여된다. 비경구적 방법으로 투여되는 경우에는, 예를 들면 주사제의 경우에는 정맥내, 근육내 또는 피하내로 주사될 수 있다.

예를 들면, 팻치, 연고 또는 외용제의 형태로 피부에 적용되어 경피투여될 수 있고, 좌약 형태로 직장 내에 투여될 수 있다. 전형적인 경구투여용 고체 제형으로서는 산제, 정제, 환제, 과립제, 캡슐제 등이 있으며, 여기서 활성성분들은 당해 기술분야에서 통상적으로 사용되는 하나 이상이 불활성 희석제(예, 전분, 셀룰로오스, 락토오스, 카올린 등)와 혼합되며, 임의의 윤활제, 결합제, 붕해제, 안정화제 등과 혼합될 수 있다. 전형적인 경구투여용 액체 제형으로서는 약학적 허용액, 에멀전, 현탁액, 시럽제, 엘릭서 등이 있으며, 여기서 활성성분들은 당해 기술분야에서 통상적으로 사용되는 하나 이상의 불활성

희석액(예, 정제수, 에탄올, 습윤제 등)중에 포함되며, 임의의 감미제, 방향제, 보존제 등과 혼합될 수 있다. 전형적인 비경구투여용 주사제로는 무균 용액, 에멀전, 현탁액 등이 있으며, 여기서 활성성분들은 당해 기술분야에서 통상적으로 사용되는 하나 이상의 불활성 수성 희석액(예, 주사용 증류수, 생리적 식염수 등) 또는 불활성 비수성 희석액(예, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 에탄올 등)과 혼합되며, 임의의 등장제, 완충제, 방부제, 안정화제 등과 혼합될 수 있다. 상기 예시된 제형의 형태들은 공지의 방법으로 제조될 수 있다.

또한, 본 발명의 고지혈증과 비만의 예방 및 치료제는 피하주사로 투여될 경우 유효량은 0.05~200mg/kg/day이고, 경구투여시 유효량은 0.5~500mg/kg/day이다.

본 발명의 화합물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 화합물은 0.0001 ~ 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 ~ 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 조성물에서 본 발명의 화합물은 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 ~ 10 중량%, 바람직하게는 0.001 ~ 1 중량%의 양으로 존재한다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

<실시예>

1. 실험 준비 및 기기

1-1. 분석기기

본 실험에서 얻은 생성물의 구조 확인을 위해 사용된 기기는 하기와 같다. 핵자기 공명 스펙트럼 (^1H NMR, ^{13}C NMR) 은 300 MHz 또는 500MHz 를, 용매는 CDCl_3 , $\text{DMSO}-d_6$ 를 사용하였다. 짝지음(Coupling) 상수 (J)는 Hz로 표시하였다. 질량(Mass) 스펙트럼은 JEOL사의 JMS-SX 102A와 JMS-700 고해상 질량분석기를 사용하였으며 m/z 형태로 표시하였다.

1-2. TLC 및 관크로마토그래피

TLC(Thin layer chromatography)는 E. Merck 사 제품인 실리카겔(Merck F254)을 사용하였으며 관크로마토그래피(Column chromatography)를 위해서는 실리카(Merck EM9385, 230-400 mesh)를 사용하였다. 또한, TLC 상에서 분리된 물질을 확인하기 위해서 UV 램프($\lambda=254\text{nm}$)를 이용하거나 아니스알데히드(Anisaldehyde), 과망간산칼륨(KMnO_4) 발색 시약에 담근 후, 플레이트를 가열하여 확인하였다.

1-3. 사용 시약

본 실험에서 사용된 시약은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 란캐스터(Lancaster), 플루카(Fluka) 제품을 구입하여 사용하였으며, 반응에 사용된 용매는 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 머크(Merck), 준세이 화학(Junsei Chemical Co.) 제품의 1급 시약을 정제 없이 사용하였다. 용매에 사용한 THF 는 아르곤 기류에서 Na 금속과 벤조페논(Benzophenone)을 넣고 가열 환류하여 청색으로 되었을 때 사용하였다. 또한, 디클로로메탄(CH_2Cl_2)은 아르곤 기류에서 CaH_2 를 넣고 가열 환류하여 사용하였다. 에틸아세테이트와 헥산은 아르곤 기류에서 가열 환류하여 정제하여 사용하였다.

실시예 1. 디티올 E의 분리

동결건조된 갈조류의 해조류 가죽그물바탕말(파치딕티온 코리아세움(*Pachydictyon coriaceum*); 제주도 북제주군 신촌리 부근 조간대에서 채집) 150g (건조 중량)을 칼로 2-3cm 길이로 자른 뒤 메탄올 4 L를 가하여 24시간 방치하고 그 용액을 여과하였다. 이 과정을 2회 반복하여 메탄올 여과액을 합한 후 감압하에서 용매를 증기화시켜 제거하여 조추출물 10.8g을 얻었다. 이 조추출물을 20% 물/메탄올과 헥산을 사용하여 분획한 후 각각의 분획을 감압, 용매를 제거하여 각각 9.6g과 1.2g의 반고형 성분을 얻었다. 그중 헥산 분획 1.0g을 분취하여 아세톤 2ml에 녹인 후 역상 플래시 크로마토그래피(C_{18} reversed-phase flash chromatography; 유리관 500 mm x 35 mm에 충전)를 이용하여 7개의 분획으로 나누었다. 이때 용리액은 85% 물/메탄올을 이용하였으며, 각 분획은 250mL씩 취하여 얻었다.

7개의 분획 중 분획 3 과 4를 합한 후에 감압 건조하여 황색 액체의 유기물질 220mg을 얻었다.

황색 액체 유기물질 220mg을 다시 클로로포름(5ml)에 녹인 후 실리카 오픈 칼럼 크로마토그래피(silica open column chromatography; 유리관 500mm x 20mm에 충전)를 이용하여 8개의 분획으로 나누었다. 이때 용리액은 9.8/0.2 =클로로포름/메탄올을 이용하였으며, 각 분획은 50mL씩 취하였다.

8개의 분획 중 분획 3을 감압 건조하여 얻은 황색 액체의 유기물질 138mg을 얻었다.

얻은 황색 액체 유기물질 138mg의 반고형 성분을 역상 반-분취 HPLC 컬럼 (C_{18} reverse-phase semi-preparative HPLC column) (YMC ODS-A, 입자 직경 $5\mu\text{m}$, $250 \times 10\text{mm}$ (길이 x 내경), 용출속도 2ml/min , UV 검출기)상에서 크로마토그래피를 실시하여 머무름 시간 19분에 용출되는 무색의 액체 형태의 물질 35mg을 얻었다. 이때 용매의 용리는 30분 간에 걸쳐서 70% 메탄올/물로 부터 서서히 메탄올의 농도를 증가시켜 30분후 100% 메탄올의 농도에 도달하는 농도구배 조건으로 실시하였다.

이 화합물의 물리적 특성은 무색의 반고형 액체상태로서 실온에서 대체적으로 안정하며 클로로포름, 아세톤, 메탄올 등 중 정도 극성 및 극성 유기용매에 잘 녹는다. 이 물질들의 구조는 핵자기 공명(nuclear magnetic resonance) 스펙트럼, 적외선 및 자외선 분광자료와 고해상 질량분석 데이터에 의하여 결정되었으며, 핵자기 공명 스펙트럼에서 ^1H -nmr 시그널과 ^{13}C -nmr 시그널에 대한 위치지정(assignment)은 COSY, TOCSY, gradient HSQC, gradient HMBC 등의 다차원 핵자기 공명 실험을 통하여 이루어졌다. 이 화합물의 구조에 대한 지정은 표 1과 같다.

분리된 화합물의 물리적 특성:

- (1) 분자식 : $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$
- (2) 분자량 : 304
- (3) 색 : 무색
- (4) 녹는점 : 해당사항 없음
- (5) 적외선 흡수대 (KBr) : 3395 (OH), 1630 ($\text{C}=\text{C}$)
- (6) ^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz); 표 1 참조
- (7) ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz); 표 1 참조

[표 1] 가죽그물바탕말 ^1H and ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터(400 MHz, CDCl_3)

번호	^{13}C NMR 화학이동값 (ppm)	^1H NMR 화학이동값(ppm)
1	26	1.7
2	131.9	-
3	124.4	5.16
4	23.6	2.03, 2.09
5	41.2	1.75
6	76.5	-
7	49	1.67
8	21.9	1.77
9	40.9	2.09, 2.70
10	152	-
11	46.4	2.6
12	34.1	2.21, 2.50
13	124.4	5.35

14	140.9	-
15	60.4	2.39
16	74.6	4.22
17	107.7	4.77
18	16.2	1.82
19	25.7	1.21
20	18	1.63

실시예 2. DGAT 억제 활성 측정

상기 실시예 1에서 얻은 화합물들의 DGAT 억제 활성 측정은 종래문헌에 기재된 방법대로 하였으며 간단히 서술하면 다음과 같다. 디아실글리세롤의 TG로의 에스테르화 반응은 기본적으로는 Grigor와 Bell이 기술한 방법에 따라 [팔미토일 1-14C]팔미토일 CoA (40-60 mCi/mmol, Perkin-Elmer)를 사용하여 측정하였다. 생성된 TG는 반응용기에서 추출하여 클로로포름-아세트산(96:4,v/v)을 전개액으로 TLC를 실시하였다.

하기 표 2는 디티올 E의 농도에 따른 DGAT 억제 활성을 보여주고 있으며, 이때 대조군으로는 기존의 DGAT 억제제인 크산토후몰(Xanthohumol)을 사용하였으며 그 결과, 디티올 E는 대조군보다 우수한 DGAT 억제 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[표 2] 디티올 E의 농도에 따른 DGAT 억제 활성

DGAT 농도 ($\mu\text{g/mL}$)	%저해율
4.6	6.61
13.8	48.97
41.6	85.52
125	94.57

디티올 E의 IC_{50} 은 $46\mu\text{M}$ 이었으며, 대조군으로 사용된 크산토후몰의 IC_{50} 은 $50.3\mu\text{M}$ 이었다.

실시예 3. 디티올 E의 투여에 따른 체중감소 효과 측정

또한 랫트를 사용하여 표 3에 나타난 바와 같은 투여량으로 사료에 디티올 E를 첨가하여 20일까지 경구투여하여 체중변화를 관찰하였다. 표 3에 나타난 바와 같이 디티올 E를 투여한 랫트에서 유의적인 체중감소를 나타내었다.

[표 3] 디티올 E의 반복경구 투여에 의한 랫트의 체중 변화

그룹	투여량 (mg/kg)	투여 후 일수					
		0	1	3	7	14	20
매개물	0	147.5 ± 11.3	149.2 ± 11.7	157.3 ± 10.2	168.8 ± 18.1	203.1 ± 20.2	222.9 ± 12.6
디티올 E	10	142.3 ± 5.7	142.5 ± 7.0	150.7 ± 7.3	166.0 ± 8.6	190.7 ± 7.5	208.1 ± 9.1
	40	139.3 ± 4.8	141.1 ± 6.8	143.3 ± 17.6	163.2 ± 11.8	188.5 ± 12.4	207.2 ± 17.6

SD 랫트(6주령, 암컷), p.o.; 매개물: 5% Tween 80

발명의 효과

본 발명에 따른 DGAT 활성 억제제는 종래의 DGAT 활성 억제제에 비하여 활성이 우수하여 고지혈증과 비만의 치료 및 예방용으로 유용하게 사용될 수 있다.