



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0100516
(43) 공개일자 2008년11월19일

(51) Int. Cl.

A61K 36/884 (2006.01) A61K 36/076 (2006.01)

A61K 36/07 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0046303

(22) 출원일자 2007년05월14일

심사청구일자 2007년05월14일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

정성현

서울 동대문구 이문2동 264-465번지 삼익단독 21동

신은정

서울 강남구 신사동 519-8 한영주택 102호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김정대

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) PPAR- γ 효능제의 부작용 경감 및 치료 효과 상승용 약학적 조성물

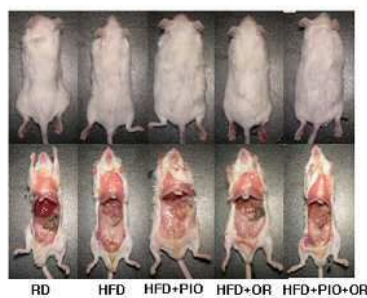
(57) 요약

본 발명은 PPAR- γ 효능제의 부작용 경감용 약학적 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 택사, 적복령, 저령, 백출 및 육계를 포함하며, PPAR- γ 효능제의 부작용을 경감시키고 치료 효과를 상승시키는 약학적 조성물에 관한 것이다.

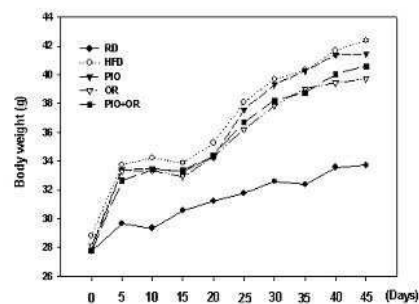
본 발명에 따른 약학적 조성물은 체중 증가, 체중 대비 지방의 무게 증가 및 지질대사 이상증과 같은 PPAR- γ 효능제의 부작용을 경감시키고 인슐린 저항성을 개선하여 PPAR- γ 효능제의 치료 효과를 상승시킬 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1

(A)



(B)



(72) 발명자

한은정

서울 노원구 하계2동 시영6단지장미아파트 604-611

최한별

서울 영등포구 영등포동 순영아파트 102동 1601호

특허청구의 범위

청구항 1

택사, 적복령, 저령, 백출 및 육계를 포함하며, PPAR- γ 효능제의 부작용을 경감시키고 치료 효과를 상승시키는 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물이 5:3:3:3:1의 중량비로 배합되어 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 PPAR- γ 효능제가 TZD(thiazolidinedione)계 약물임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 TZD계 약물이 피오글리타존(pioglitazone)임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 부작용이 체중 증가, 체중 대비 지방의 무게 증가 및 지질대사이상증 중 적어도 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 치료 효과의 상승이 인슐린 저항성을 개선시킴으로써 수득되는 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 슬러리제 및 현탁액으로 이루어진 군 중에서 선택되는 제형으로 이루어진 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<5> 본 발명은 PPAR- γ 효능제의 부작용 경감용 약학적 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 택사, 적복령, 저령, 백출 및 육계를 포함하며, PPAR- γ 효능제의 부작용을 경감시키고 치료 효과를 상승시키는 약학적 조성물에 관한 것이다.

<6> 현대인의 생활습관 즉 운동 부족과 식습관 즉 고지방과 고 탄수화물 식이의 섭취로 인해 신체에 지방이 축적하는 현상인 '비만' 인구가 전 세계적으로 급격하게 증가하는 추세이다. 특히 비만은 에너지 조화에 장애가 생겨 복강의 지방 축적을 통해 인슐린 저항성, 고혈압, 고지혈증, 지방간 그리고 동맥경화 등의 질병과 관련 있는 대사 증후군을 유발하여 특히 인슐린 저항성과 관련 있는 제 2형 당뇨병을 유발한다. 현재 2형 당뇨병의 치료를 위해 시판중인 약물들은 탄수화물의 소화를 제한하여 식후 혈당 조절제로서 α -글루코시다아제(α -glucosidase) 억제제인 아카르보스(acarbose), 인슐린 분비를 촉진하는 설폰닐우레아(sulfonylurea), 간에서 포도당 생성을 감소시키는 메트포민(metformin), PPAR- γ 효능제로서 인슐린 작용을 증가시키는 티아졸리딘디온(thiazolidinedione, TZD) 계 약물이 있다.

<7> PPARs(Peroxisome proliferator-activated receptors)는 핵 수용체(nuclear receptor)로서 전사인자로 작용한다. 세 가지의 이성질체(α , δ/β , γ)가 존재하는데 특히 PPAR- γ 는 지방 세포에 주로 존재하고 당뇨병 치료제인 TZD계 약물이 이의 효능제로서 사용되어 혈당과 지질 항상성을 조절하고 인슐린 작용을 증가시킨다.

<8> TZD계 약물로는 로시글리타존(rosiglitazone), 피오글리타존(pioglitazone) 및 트로글리타존(troglitazone) 등이 있다. 그러나 상기 TZD계 약물들은 인슐린 작용을 증가시키는 효과가 있는 반면에 지방세포 분화를 유도하여 지방세포 증식을 일으켜 체중을 증가시키는 부작용이 보고 되고 있다. 더욱이 동물이나 사람에게 PPAR- γ 효능제(agonist)를 투여하면 심장비대, 부종, 혈액독성과 간독성의 부작용을 나타냈다는 보고가 있다.

<9> 상기와 같은 기존 PPAR- γ 효능제의 단점을 극복하는 방안으로, 첫째는 GW007213, N-(9-플루레닐)메톡시 카르보닐(N-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl) (Fmoc)-L-루신, PAT5A 및 nTZDpa 등과 같은 부분적인 효능제(partial agonist), 둘째는 베르베린(berberine)과 같은 PPAR- γ 억제제(antagonist), 셋째는 지질 분해 작용이 있는 PPAR- α , γ 듀얼 효능제(dual agonist)의 개발이 시도되어 왔으나, 이러한 약제들은 PPAR- γ 효능제의 약효를 감소시키는 단점이 있었다.

<10> 이에 본 발명자들은 PPAR- γ 효능제의 활성은 그대로 유지하도록 하면서, 이의 부작용을 개선시킬 수 있는 약제를 개발하고자 연구하던 중, 텍사, 적복령, 저령, 백출 및 육계를 포함하는 약학적 조성물이 PPAR- γ 효능제의 부작용을 효과적으로 경감시키면서도 그 치료 활성은 상승시킬 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

<11>

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<12> 따라서 본 발명의 목적은 PPAR- γ 효능제의 부작용을 경감시키고 치료효과를 상승시키는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<13> 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 PPAR- γ 효능제의 부작용을 경감시키고 치료효과를 상승시키는 약학적 조성물을 제공한다.

<14> 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 텍사, 적복령, 저령, 백출 및 육계를 포함하며, PPAR- γ 효능제의 부작용을 경감시키고 치료 효과를 상승시킨다.

<15> 상기 조성물은 5:3:3:3:1의 중량비로 배합되어 있는 것이 바람직하다.

<16> 상기 치료 효과의 상승은 인슐린 저항성을 개선시킴으로써 수득되는 것임을 특징으로 할 수 있다.

<17> 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 슬러리제 및 현탁액으로 이루어진 군 중에서 선택되는 제형으로 이루어질 수 있다.

<18> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<19> 본 발명의 약학적 조성물은 텍사, 적복령, 저령, 백출 및 육계를 포함하는 것을 특징으로 한다. 바람직하게는, 본 발명의 약학적 조성물은 상기 텍사, 적복령, 저령, 백출 및 육계가 5:3:3:3:1의 중량비로 배합되어 있는 것을 특징으로 한다.

<20> 상기 텍사는 텍사과(Alismataceae)에 속하는 다년생의 소택(沼澤)식물인 텍사(Alisma orientale) 또는 기타 동속근연식물의 덩이줄기로서 잔뿌리 및 주피를 제거한 것을 말한다. 단백질, 전분, 휘발성 정유, 수교회분, 알칼로이드성 물질 및 L-아스파라긴(L-asparagin), 피토스테롤(β -sitosterol), 지방산, 콜린(choline), 레시틴(lecithine), 알리솔 A, B(Alisol A, B) 및 그 초산 에스테르, 에피-알리솔 A(Epi-alsiol A)를 함유하고 있다. 상기 텍사의 약리활성으로는 급·만성 신염 및 간장질환으로 인한 부종 억제, 이뇨작용, 혈중콜레스테롤 및 혈당감소 작용 및 황색포도상구균, 폐렴쌍구균 및 결핵균에 대한 억제작용이 있는 것으로 알려져 있다.

<21> 상기 복령은 잔나비겉상과(Polyporaceae)에 속하는 진균으로 땅속에서 소나무 등의 나무뿌리에 기생하는 일종의 버섯이다. 상기 복령의 벗겨낸 외피를 복령피라 하고, 표층 아래의 담홍색 부분을 적복령(赤茯苓, Hoelen rubra)이라 한다. 상기 적복령의 약리효과로는 심, 비, 방광경에 들어가 습열을 제거하고 소변의 혼탁(淋濁), 사리(瀉痢) 등을 치료하는 것으로 알려져 있다.

<22> 상기 저령(豬苓, Grifola umbellata)은 단풍나무 작목, 떡갈나무, 기타 수목 등의 뿌리에 기생하는 용

류로서, 진균부담자낭균문, 진담자낭균아문, 모균아다공과에 속한다. 그리고 상기 저령은 단백질, 가용성당분, 무결정 다당류 에르고스테린, 조섬유, 무기물을 함유한다. 상기 저령은 해열, 소염, 지갈의 효과가 있는 이노제로 주로 종창(腫脹), 복만(腹滿), 열갈(熱渴), 오뇌(懊惱), 열병(熱病), 소변불리(小便不利), 적색열통(赤色熱痛)을 치료한다. 특히 복부내의 열로 인하여 수분이 정체하고, 흡수 배설이 원활하지 못할 때 사용한다. 저령의 분석학적 약리작용에서는 항종양 효과가 규명된 바 있다.

<23> 상기 백출(白朮, *Atractylodis Rhizoma alba*)은 국화과에 속하는 다년생 초본인 삼주의 뿌리 껍질을 벗긴 것을 말한다. 그 성분은 주로 뿌리에서 정유의 주성분인 아트락티론(atractylon), 아트락티롤(atractylol) 및 비타민 A, D 등을 함유하고 있다. 상기 백출의 약리 작용으로는 지방을 보하고, 조습(燥濕)을 조절하고 중화작용을 하는 것으로 알려져 있다.

<24> 상기 육계(肉桂, *Cinnamomi Cortex Spissus*)는 녹나무과에 속하는 상록수인 육계나무 및 계수나무의 껍질을 건조시킨 것으로 계피의 한약명이다. 상기 육계는 기본적으로 손발과 아랫배가 차서 나타나는 제증상에 널리 사용된다. 약리실험결과 상기 육계는 건위작용, 항균작용 및 혈액순환작용이 있는 것으로 밝혀졌으며, 성분으로는 신남산 알데히드(Cinnamic aldehyder)가 75-90%, 이외에 신나밀 아세테이트(Cinnamyl acetate), 페닐프로필 아세테이트(Phenylpropyl acetate)등이 함유되어 있다.

<25> 본 발명에서 상기 생약재들은 자연에서 채취하거나 또는 상업적으로 구입하여 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 국내의 경동시장(서울 동대문구 소재)에서 각 약재를 구입하여 사용하였다.

<26> 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 상술한 생약재를 혼합한 후 함께 추출하거나 또는 상기 생약재를 각각 그 약효성분의 물리·화학적 성질에 따라 추출한 후 각각의 추출물을 혼합한 혼합물을 포함할 수 있다.

<27> 추출 방법으로는 바람직하게는, 당업계에서 공지된 용매 추출법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 물, 에탄올 및 메탄올과 같은 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, n-헥산, 메탄올, 디에틸에테르, 아세톤, 벤젠과 같은 유기용매 중에서 선택된 어느 하나 또는 이들의 혼합용매를 이용하여 추출할 수 있다. 상기 용매 추출법에 의해 추출물을 제조하는 경우에는 열수 추출, 초음파 추출 및 환류 추출 방법을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 생약재를 일정한 비율로 혼합한 후 정제수를 투여하여 일정시간 동안 가열 추출한 후 여과함으로써 열수 추출물을 제조하고 이를 동결 건조하여 실험에 사용하였다(실시예 1 참조).

<28> 한편, 본 발명의 약학적 조성물은 상술한 생약재를 단독으로 포함하거나 또는 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함함으로써 통상적인 방법으로 제형화될 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다.

<29> 또한, 상기과 같이 제형화된 본 발명의 약학적 조성물은 적합한 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 적합한 투여 경로로는 경구, 점안, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로가 포함될 수 있다.

<30> 본 발명의 약학적 조성물은 선택된 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화할 수 있다.

<31> 바람직하게는 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 슬러리제, 현탁액 등과 같은 경구 투여용 제제의 형태로 당업계에서 공지된 방법을 이용하여 제형화할 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스 등을 포함하는 셀룰로오스류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 봉해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 상기 약학적 조성물은 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

<32> 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있으며 바람직하게는, 약 5mg/체중kg/day~50mg/체중kg/day이다.

<33> 한편, 본 발명의 약학적 조성물은 PPAR- γ 효능제와 병용 투여됨으로써 PPAR- γ 효능제의 부작용을 경감시킬 수 있다.

<34> 상기 PPAR- γ 효능제의 예로는 TZD계 약물이 있으며, 보다 상세하게는 피오글리타존(pioglitazone)을

말한다.

<35> 또한, 상기 부작용의 예로는 체중 증가, 체중 대비 지방의 무게 증가 및 부종 중 적어도 어느 하나를 들 수 있다.

<36> 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명의 약학적 조성물이 PPAR- γ 효능제의 일종인 피오글리타존의 부작용을 경감시키는 효과가 있는지 확인하기 위하여, ICR 마우스를 정상 식이 섭취군 (RD), 고지방식이 섭취군 (HFD), 고지방식이와 30 mg/kg의 피오글리타존(pioglitazone) 투여군 (HFD+PIO), 고지방식이와 300 mg/kg 실시예 1의 생약제 투여군 (HFD+OR), 고지방식이, 30 mg/kg의 피오글리타존 및 실시예 1의 생약제 300 mg/kg 투여군 (HFD+PIO+OR)으로 나누고 10주 동안 체중 및 장기무게의 변화를 측정하였다(실시예 3 참조). 그 결과, 본 발명에 따른 약학적 조성물이 피오글리타존의 투여에 의해 증가된 내장지방 및 체중을 감소시키는 효과가 있음을 알 수 있었다(도 1 및 표 2 참조).

<37> 또한, 본 발명의 다른 실시예에서는 상기 ICR 마우스의 지방조직의 변화를 관찰한 결과(실시예 4 참조), 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여로 인해 피오글리타존에 의해 커진 지방조직이 줄어든 것을 확인할 수 있었으며(도 2 참조), 지방세포의 직경 분포 또한 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여로 인해 감소됨을 확인할 수 있었다(도 3 참조).

<38> 또한, 본 발명의 다른 실시예에서는 상기 ICR 마우스의 혈중 지질 농도의 변화를 측정하였다(실시예 6 참조). 그 결과, 피오글리타존에 의해 증가된 혈중 중성지방, 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤이 본 발명의 약학적 조성물의 투여에 의해 억제됨을 알 수 있었다(표 4 참조).

<39> 나아가, 본 발명의 다른 실시예에서는 상기 ICR 마우스의 지방 조직에서 포도당 업테이크(glucose uptake)에 관여하는 PPAR- γ 유전자 및 지방합성에 관여하는 SREBP1a 유전자의 발현 변화를 RT-PCR로 측정하였다(실시예 7 참조). 그 결과, 피오글리타존에 의해 증가된 SREBP1a의 발현 및 PPAR- γ 의 발현이 본 발명에 따른 생약제의 투여에 의해 감소되는 것으로 나타났다(도 4 참조). 이로 부터 본 발명의 약학적 조성물이 피오글리타존에 의한 지방 세포로의 분화를 억제하는 것으로 판단할 수 있었다.

<40> 상술한 바와 같이 본 발명의 약학적 조성물은 체중증가, 체중 대비 지방의 무게 증가 및 지질대사이상 증가 같은 피오글리타존의 부작용을 경감시키는 활성이 있음을 알 수 있었다.

<41> 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 PPAR- γ 효능제의 치료 효과를 상승시킬 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 약학적 조성물은 PPAR- γ 효능제의 인슐린 저항성 개선시킴으로써 PPAR- γ 효능제의 치료 효과를 상승시킬 수 있다.

<42> 본 발명의 일 실시예에서는 상기 ICR 마우스의 혈당, 인슐린 및 인슐린 저항성 지표에 대한 개선 효과를 조사하였다(실시예 5 참조). 그 결과, 피오글리타존과 본 발명에 따른 약학적 조성물을 병용 투여할 경우 인슐린 저항성 개선에 있어서 상승효과가 있음을 확인할 수 있었다(표 3 참조).

<43> 이하, 본 발명의 구체적인 방법을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에 만 한정되는 것은 아니다.

<44> <실시예 1>

<45> 본 발명에 따른 약학적 조성물의 제조

<46> 본 발명에 따른 약학적 조성물의 처방 구성으로, 각 생약제를 경동 시장에서 구입하여 표 1에 나타난 비율대로 혼합하였으며, 보다 상세하게는 택사 10 g, 적복령 6 g, 저령 6 g, 백출 6 g, 육계 2 g 으로 구성된 혼합 생약제 7침(210 g)과 정제수 약 1300 ml를 약탕기에 넣고 2시간동안 가열한 다음 여과지로 여과한 후 감압 농축하고 동결 건조하였다.

표 1

<47> 본 발명의 약학적 조성물에 포함된 생약제의 명칭 및 함량

한약명	생약명	함량
택사(澤瀉)	Alismatis rhizoma	10 g
적복령(赤茯苓)	Hoelen rubra	6 g

저령(豬苓)	Grifola umbellata	6 g
백출(白朮)	Atractylodis Rhizoma alba	6 g
육계(肉桂)	Cinnamomi Cortex Spissus	2 g
1첩 당 총 함량		30 g

<48> <실시예 2>

<49> 실험동물의 사육 및 실험 설계

<50> 4주령의 웅성 ICR 마우스를 (주) 오리엔트에서 구입하여 사용하였다. 흰쥐는 플라스틱 마우스 케이지 (plastic mouse cage)에 보관하여 동물실에서 23±2℃, 상대습도 50±10%, 명/암 주기(12/12 hr)의 조건하에서 사육하며, 물과 사료 (LabDiet)는 자유로이 섭취하도록 한다. 실험동물은 실험시작 전 일주일 동안 환경에 적응시킨 후 다음과 같이 5 그룹으로 나누었으며 약물은 경구 투여하였다: 정상 식이 섭취군 (RD), 고지방식이 섭취군(HFD), 고지방식이와 30 mg/kg의 피오글리타존(pioglitazone) 투여군 (HFD+PIO), 고지방식이와 300 mg/kg 실시예 1의 약학적 조성물 투여군 (HFD+OR), 고지방식이, 30 mg/kg의 피오글리타존 및 실시예 1의 약학적 조성물 300 mg/kg 투여군 (HFD+PIO+OR)으로 나누고 10주 동안 실험을 진행하였다. 체중은 매주 측정하며 식이량과 음수량은 2일 마다 측정하였다. 10주 후 간, 지방조직의 무게를 각 군마다 측정하였다.

<51> <실시예 3>

<52> 실험동물의 체중 및 장기 무게의 변화

<53> 10주간의 시료 투여 기간 동안 체중을 측정하고, 실험 종료시 마우스를 치사시켜 개복하고 육안으로 내장지방의 크기를 비교하였다. 또한, 마우스의 간 조직 및 부고환의 지방 조직을 적출한 다음 각 무게를 측정하였다. 측정된 결과는 Student's t-test를 실시하여 각 군 간의 평균차이에 대한 유의성을 p<0.05 이상의 수준에서 검정하였으며 그 결과를 표준오차(standard error)와 함께 나타내었다

<54> 실험 결과, 최종일의 체중은 고지방식이 섭취군(HFD)>HFD+피오글리타존 투여군(PIO)>HFD+PIO+실시예 1의 약학적 조성물 투여군(OR)>HFD+OR 순으로 나타났다(도 1의 B). 각 마우스를 치사시켜 개복한 사진을 비교해 볼 때, HFD+PIO는 HFD군과 비교시 내장 지방의 크기가 커진 반면, HFD+PIO+OR은 HFD+PIO와 비교시 내장지방의 크기가 작아진 것으로 관찰되었다(도 1의 A).

<55> 10주간 시료를 투여한 후 체중 및 장기무게를 그룹 간 비교한 결과, HFD군에 비해 HFD+OR 투여군의 체중이 감소(14.7%) 한 것으로 나타났다. 또한 HFD+PIO 투여군에 비해 HFD+PIO+OR 투여군의 체중 증가가 감소(6.6%) 한 것을 알 수 있다. HFD+PIO 투여군에서는 체중 대비 지방의 무게가 HFD 대조군에 비해 증가(34%)한 반면 HFD+PIO 투여군에 비해 HFD+PIO+OR 투여군에서는 체중 대비 지방 무게의 증가가 억제(29%) 된 것을 알 수 있다. 이로부터 본 발명에 따른 약학적 조성물이 고지방식이 섭취 및 피오글리타존의 투여에 따른 체중 증가를 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다(표 2).

표 2

<56> 본 발명의 약학적 조성물의 투여에 따른 체중 및 장기무게의 변화

그룹	체중 (g)				
	실험 시작 시점	실험 종료 시점	획득한 체중	간/체중 (%)	지방/체중 (%)
RD	27.8 ± 1.3	33.7 ± 1.4	6.0	4.4	2.7
HFD	28.8 ± 1.0	42.4 ± 1.8	13.6	3.9	4.4
HFD+PIO	27.8 ± 0.6	41.5 ± 1.1	13.7	3.5	5.9
HFD+OR	28.1 ± 1.0	39.7 ± 2.3	11.6	3.7	4.1
HFD+PIO+OR	27.8 ± 0.5	40.6 ± 2.0	12.8	3.8	4.2

<57> <실시예 4>

<58> 지방 조직에 대한 영향

<59> 10주간의 시료 투여 후 각 마우스에서 적출한 지방 조직을 10% 중성으로 완충된 포르말린(neutral

buffered formalin)을 사용하여 고정하였다. 이후 탈수 및 포매 과정을 거쳐 파라핀 블록을 제작하고 두께 5 μm 의 관상 절편으로 제작한 후 자일렌(xylene)으로 파라핀을 제거하고, 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 알코올로 친수화 시켰다. 염색 방법으로는 헤마톡실린-에오신(Hematoxylin-Eosin) 염색으로 탈수 과정을 거쳐 캐나다 발삼(Canada balsam)으로 봉입하고 광학현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

실험 결과, HFD+OR 투여군에서는 지방 조직의 크기가 HFD 대조군에 비해 현저하게 줄어들었으며, HFD+PIO+OR의 지방조직 또한 HFD+PIO 투여군에 비해 크게 줄어든 것을 확인 할 수 있었다(도 2). 이는 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여로 인해 피오글리타존에 의해 커진 지방조직이 줄어든 것으로 판단된다.

또한, 지방세포 크기를 각 직경에 대한 세포수로 나타낸 결과, 지방 세포의 직경 분포는 HFD+OR과 HFD+PIO+OR 투여군 모두 HFD 대조군에 비해 직경이 큰 세포수가 줄어들음을 알 수 있었다(도 3).

<실시예 5>

혈당, 인슐린 및 인슐린 저항성 지표에 대한 개선 효과

10주 동안 시료 투여 후 각 마우스를 12시간 절식시킨 후 혈액을 채취하였다. 안와 정맥을 통해 얻어진 전혈을 5,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 혈장을 분석에 사용하였다. 혈중 포도당 농도는 포도당 옥시다제 방법(glucose oxidase method, Trinder method)을 사용하여 측정하였으며 흡광도 측정은 UV 스펙트로미터(UV Spectrophotometer, U-3210, HITACHI; Japan)를 사용하였다. 혈중 인슐린 농도는 마우스 인슐린 ELISA 키트(insulin ELISA kit, Shibayagi, Japan)를 구입하여 ELISA 리더(Labsystems, Finland)로 측정하였다. 인슐린 저항성 지수는 하기의 식에 따라 계산하였으며, 측정된 결과는 실시예 3과 동일한 방법으로 통계처리하였다.

인슐린 저항성 지수 (HOMA-IR) = 공복시 혈중 인슐린 ($\mu\text{U/ml}$) x 공복시 혈중 포도당 농도 (mM)/22.5

실험 결과, HFD 대조군에 비해 HFD+PIO 투여군은 혈당이 현저히 낮았다 (36%). 흥미로운 사실은 본 발명에 따른 약학적 조성물 투여군에서 혈중 인슐린 수치가 HFD 대조군에 비해 58% 감소하였고 피오글리타존과 본 발명에 따른 약학적 조성물을 병용투여한 군에서는 HFD 대조군에 비해서는 85%, HFD+PIO군에 비해서는 41% 감소하는 효과를 보여주었다. 본 발명의 약학적 조성물은 혈당을 감소시켜주는 효과는 거의 없었지만 혈중 인슐린 수치를 큰 폭으로 감소시킨 결과 인슐린저항성 지수에서는 HFD+PIO+OR 그룹은 HFD+PIO 그룹에 비해 43% 감소되는 현상을 보여 주었다(표 3). 따라서 피오글리타존과 본 발명에 따른 약학적 조성물을 병용 투여할 경우 인슐린 저항성 개선에 있어서 상승효과가 있을 것으로 기대된다.

표 3

혈당, 인슐린 및 인슐린 저항성 지표 변화

그룹	포도당 농도(mM)		Insulin (mU/ml)	HOMA-IR
	실험 시작 시점	실험 종료 시점		
RD	4.9 $\pm$ 0.4	5.0 $\pm$ 0.4	29.56 $\pm$ 11.86	6.57
HFD	4.9 $\pm$ 0.2	7.8 $\pm$ 0.5	207.27 ^{**} $\pm$ 61.22	71.85
HFD+PIO	4.8 $\pm$ 0.3	5.8 $\pm$ 0.4	53.29 ^{**} $\pm$ 22.7	13.7
HFD+OR	4.9 $\pm$ 0.4	7.7 $\pm$ 0.8	86.91 [*] $\pm$ 24.76	29.74
HFD+PIO+OR	4.9 $\pm$ 0.2	5.6 $\pm$ 0.4	31.57 ^{**} $\pm$ 4.80	7.86

* : p<0.05에서 유의적인 차이가 있음.

** : p<0.01에서 유의적인 차이가 있음.

<실시예 6>

혈중 지질 농도 변화

10주 동안 시료 투여 후 각 마우스를 12시간 절식시킨 후 혈액을 채취하였다. 안와 정맥을 통해 얻어진 전혈을 5,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 혈장을 분석에 사용하였다. 혈중 중성 지방, 총 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤은 영동제약에서 각 키트를 구입하여 측정하였다. 측정된 결과는 실시예 3과

동일한 방법으로 통계처리하였다.

<73> 실험 결과, HFD+PIO 투여군은 중성지방 (TG)과 총 콜레스테롤 (TC), LDL-C 수치에서 HFD 대조군에 비해 각각 25%, 18%, 88% 증가한 것으로 나타났다. 그러나 HFD+OR 투여군은 HFD 대조군에 비해 TG와 TC, HDL-C 수치에서 각각 8%, 23%, 35% 증가시켰고 LDL-C의 경우 37%를 감소시켰다. HFD+PIO+OR 투여군은 HFD+PIO 투여 군에 비해 TG와 TC, LDL-C수치에서 각각 1.7%, 8.9%, 42.4% 감소하였다(표 4). 이러한 결과로부터 피오글리타존에 의해 증가된 혈중 중성지방, 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤이 본 발명의 약학적 조성물에 의해 억제됨을 알 수 있었다.

표 4

<74> 혈중 지질 농도

그룹	중성지방 (mg/dl)	총 콜레스테롤 (mg/dl)	HDL-콜레스테롤 (mg/dl)	LDL-콜레스테롤 (mg/dl)
RD	73.8± 11.2	125.8± 5.4	93.8± 9.1	17.2± 1.5
HFD	90.6± 5.6	140.9± 8.5	101.1± 10.7	34.6± 11.7
HFD+PIO	113.4± 6.8	166.5± 15.7	127.3± 5.6*	65.5± 12.0
HFD+OR	98.3± 6.9	165.1± 12.9	136.3± 7.9**	21.9± 3.0
HFD+PIO+OR	111.5± 11.7*	151.6± 14.9	105.0± 2.4	37.7± 13.4

<75> * : p<0.05에서 유의적인 차이가 있음.

<76> ** : p<0.01에서 유의적인 차이가 있음.

<77> <실시예 7>

<78> SREBP1a , PPAR-γ 유전자 발현에 미치는 영향

<79> 각 마우스의 지방 조직에서 포도당 업테이크(glucose uptake)에 관여하는 PPAR-γ 유전자 및 지방합성에 관여하는 SREBP1a 유전자의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR 이용하여 분석하였다.

<80> 이를 위해 먼저, 마우스의 지방 조직에서 총 RNA를 구아니딘 티오시아네이트-물 포화 페놀/클로로포름(guanidine thiocyanate-water saturated phenol/ choroform) 방법을 이용하여 분리하였다(Chomczynski and Sacchi, 1987). 물 층에 있는 총 RNA는 이소프로판올을 이용하여 침전시키고 분리한 RNA는 260 nm 와 280 nm 의 파장에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

<81> RT-PCR은 총 RNA 1μg을 MMLV 역전사 효소(Moloney murine leukemia virus transcriptase)와 표 5의 프라이머를 이용하여 역전사하여 cDNA를 제조한 다음 이를 주형으로 하여 PCR 증폭함으로써 수행하였다. 프라이머는 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTP, 5 μl cDNA 및 2.5 unit의 Taq DNA 중합효소가 포함되어 있는 25 μl의 반응 용액에 최종 농도가 0.5 mM이 되도록 첨가하였으며, PCR 반응 조건은 95 °C에서 1분 동안 변성, 55°C에서 1분 동안 불임 그리고 72 °C에서 2분 동안 연장을 하여 총 30회 반복하였다. PCR 증폭산물을 0.5 μg/ml 에티듐 브로마이드(ethidium bromide)가 포함된 1% 아가로스 겔(agarose gel)을 이용하여 100V에서 전기영동 하였으며, 증폭된 유전자들의 대조군으로 β-액틴을 사용하였다.

표 5

<82> RT-PCR에 사용한 프라이머 서열

프라이머	서열	서열번호
PPAR-γ 센스	AGG CCG AGA AGC TGT TG	1
PPAR-γ 안티센스	TGG CCA CCT CTT TGC TCT GCT C	2
SREBP1a 센스	GCG CYA CCG GTC TTC TAT CA	3
SREBP1a 안티센스	TGC TGC CAA AAG ACA AGG G	4
β-액틴 센스	GTC GTA CCA CTG GCA TTG TG	5
β-액틴 안티센스	GCC ATC TCC TGC TCA AAG TC	6

<83> 실험 결과, SREBP1a의 발현은 HFD+PIO 투여군의 경우 HFD 대조군에 비해 뚜렷하게 증가되었고, PPAR- γ 유전자 발현 또한 HFD+PIO 투여군에서 HFD 대조군에 비해 그 발현이 증가된 것으로 나타났다. 반면, HFD+PIO+OR 투여군은 HFD+PIO 투여군에 비해 PPAR- γ 및 SREBP1a의 유전자 발현이 감소한 것으로 나타났다(도 4).

<84> 이로 부터 본 발명의 약학적 조성물이 피오글리타존에 의한 지방 세포로의 분화를 억제하는 것으로 판단된다. 따라서 본 발명의 약학적 조성물은 피오글리타존의 부작용을 경감시키는 활성이 있음을 알 수 있었다.

발명의 효과

<85> 상술한 바와 같이, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 체중 증가, 체중 대비 지방의 무게 증가 및 지질대사 이상증과 같은 PPAR- γ 효능제의 부작용을 경감시키고 인슐린 저항성을 개선하여 PPAR- γ 효능제의 치료 효과를 상승시킬 수 있는 효과가 있다. 따라서 본 발명의 약학적 조성물과 PPAR- γ 효능제의 병용 투여는 당뇨병의 예방 및 치료에 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 10주간 시료 투여 기간 동안 ICR 마우스의 내장 지방의 크기(A) 및 체중 변화(B)를 나타낸 것이다.

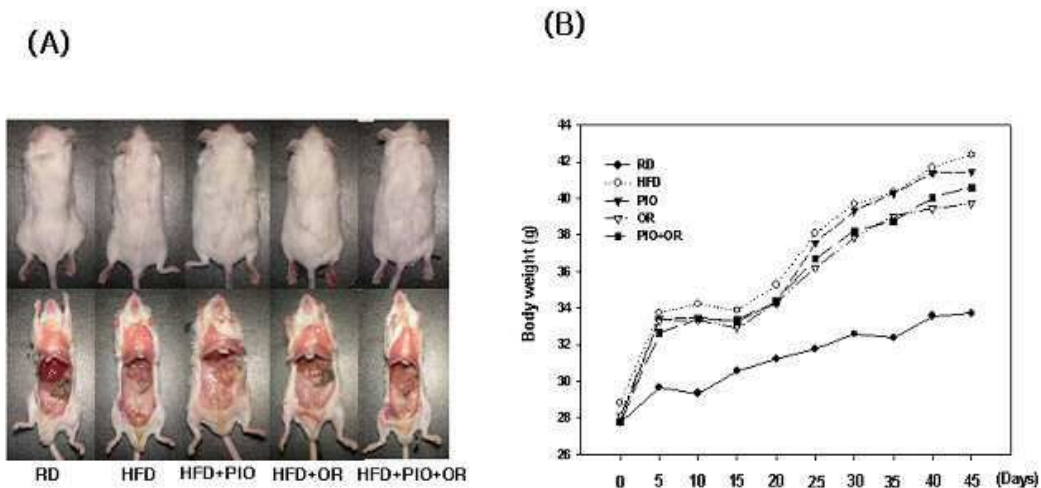
<2> 도 2는 10주간 시료 투여 후 ICR 마우스의 지방 조직의 형태를 광학 현미경으로 관찰한 사진이다.

<3> 도 3은 10주간 시료 투여 후 ICR 마우스의 지방 세포의 크기를 각 직경에 대한 세포수로 나타낸 그래프이다.

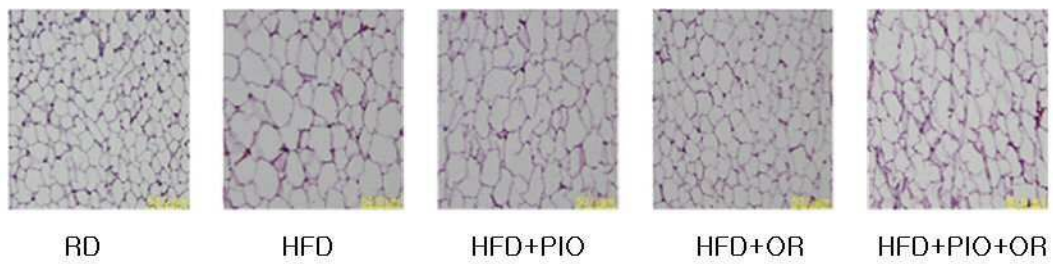
<4> 도 4는 10주간 시료 투여 후 ICR 마우스의 지방 조직에서 PPAR- γ 유전자 및 SREBP1a 유전자 발현을 RT-PCR로 측정된 결과이다.

도면

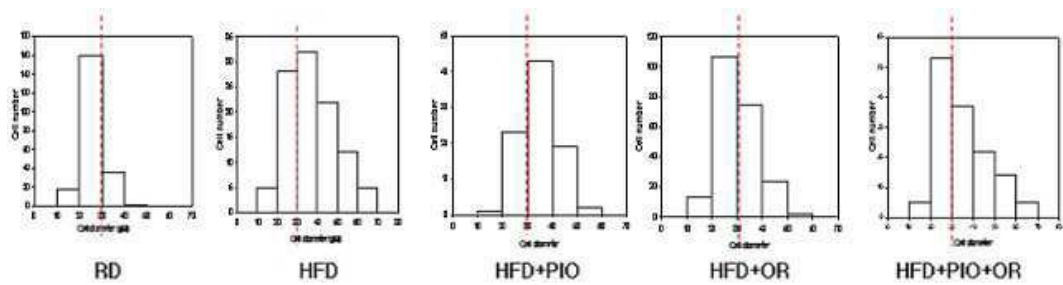
도면1



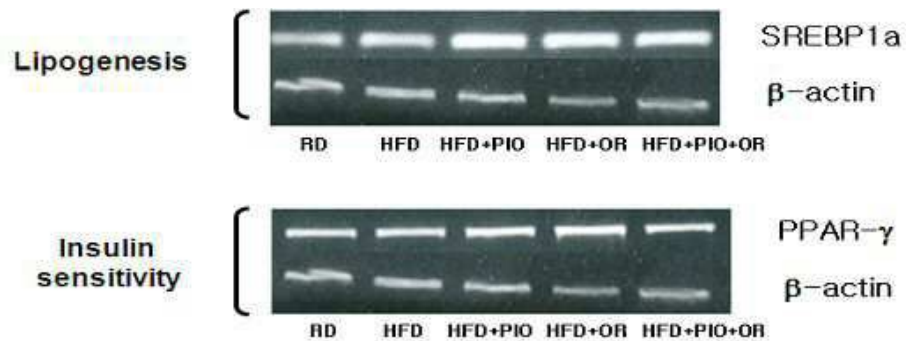
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation of KyungHee University
- <120> Pharmaceutical composition for reduction of side effect of PPAR-gamma agonist
- <160> 6
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 17
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PPAR-gamma sense primer

<400> 1

aggccgagaa gctgttg

17

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PPAR-gamma antisense primer

<400> 2

tggccacctc tttgctctgc tc

22

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SREBP1a sense primer

<400> 3

gcgcyaccgg tcttctatca

20

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SREBP1a antisense primer

<400> 4

tgctgcaaaa agacaaggg

19

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> beta-actin sense primer

<400> 5
 gtcgtaccac tggcattgtg

20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> beta-actin antisense primer

<400> 6
 gccatctcct gctcaaagtc

20