(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017 년 1 월 12 일 (12.01.2017)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2017/007162 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 31/20 (2006.01) *A61K 31/23* (2006.01)
A61K 31/225 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/006859

(22) 국제출원일: 2016 년 6 월 27 일 (27.06.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2015-0095529 2015 년 7 월 3 일 (03.07.2015) KR

(71) 출원인: **고려대학교산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)** [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145 고려대학교, Seoul (KR).

(72) 발명자: **이성준 (LEE, Sung-Joon)**; 06070 서울시 강남구 도산대로 96 길 39, 104-402, Seoul (KR).

(74) 대리인: **이처영 (LEE, Cheo Young)** 등; 06133 서울시 강남구 테헤란로 123 11 층, Seoul (KR).

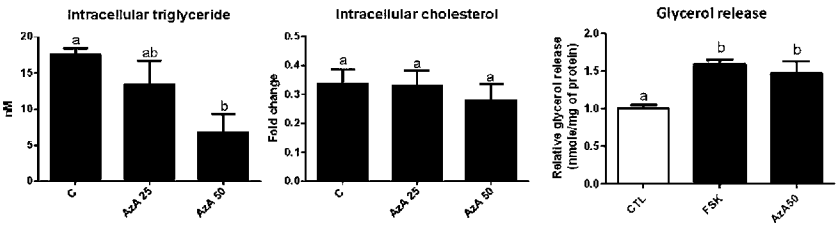
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) **Title**: AZELAIC ACID COMPOSITION HAVING ADIPOSE TISSUE TRIGLYCERIDE DEGRADATION EFFECT

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



(57) **Abstract**: The present invention relates to a pharmaceutical composition or a functional food containing azelaic acid as an active ingredient and, more specifically, to a pharmaceutical composition and a health functional food, which contain, as an active ingredient, azelaic acid having an effect of lowering the accumulation of triglycerides, by allowing Olfr544, which is a GPCR expressed in cell membranes of adipose tissue, to be activated through coupling with azelaic acid such that the hydrolysis of triglycerides in adipose tissue is promoted through a cAMP-PKA-HSL signaling pathway. The composition containing azelaic acid, according to the present invention, has an excellent effect in the alleviation of the accumulation of lipids in adipose tissue and of the lipid metabolism of adipose tissue, thereby being usable as a food material, a pharmaceutical composition, and a health functional food for alleviating the lipid metabolism of adipose tissue (obesity alleviation) such as in body weight reduction and body fat reduction.

(57) **요약서**: 본 발명은 아젤라산(Azelaic Acid)을 유효성분으로 함유하는 의약 조성물 또는 기능성 식품에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 지방조직 세포막에 발현되는 GPCR 인 Olfr544 가 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.

WO 2017/007162 A1

명세서

발명의 명칭: 지방조직 중성지질 분해 효능을 가지는 아젤라산 조성물

기술분야

[1] 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.

[2]

배경기술

[3] 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.

[4] 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 olistat의 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.

[5] 아젤라산의 화학명은 노난디산(Nonanedioic Acid)으로 탄소수가 9개인 디카르복시산으로서 체내에서 오메가-산화과정이나 리놀레산의 과산화물로 생성되기도 하고, 천연물질로 밀, 보리, 오트밀, 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.

[6] 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.

[7] 최근 연구결과에 의하면 일반 조직에서 후각 수용체의 다양한 기능이 보고되고 있는데 정자에서 후각 수용체가 페로몬 물질을 탐색하는 기능, 피부의 각질형성세포(keratinocyte에서 OR2AT4가 피부재생에 관여하고, Olfr78가 신장조직에서 발현되어 레닌 호르몬 분비를 조절하는 연구 등이 보고되고 있다. 최근 본 발명자들도 OR1A1이 간조직에서 발현되어 간조직 중성지질 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.

[8] 이러한 기술적 배경 하에서, 본 발명자들은 아젤라산이 지방조직 내 중성지질 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.

[9]

[10] **발명의 요약**

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

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

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

[14] 본 발명은 또한, 아젤라산(Azelaic Acid)을 투여하여 비만을 예방, 치료 또는 개선하는 방법을 제공한다.

[15] 본 발명은 또한, 아젤라산(Azelaic Acid)을 비만의 예방제, 치료제 또는 개선제로 사용하는 용도를 제공한다.

[16]

도면의 간단한 설명

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

[18] 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.

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

[20] 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 assy)를 수행한 결과를 나타낸 것이다. EC_{50} 값은 최대 효율의 50%에 해당되는 효능제(agonist)의 농도를 의미한다.

[21] 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; IP_3의 대사물(metabolite) 및 (C) 세포 내 칼슘(intracellular calcium)의 농도를 측정한 것이다.

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

[23] 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-sensitve lipase)의 인산화 여부(정도)를 웨스턴 블랏(Western blot)을 통해 나타낸 것이다. C(control), 음성대조군; 1μM FSK(forskolin), 양성대조군; 50μM AzA(Azelaic Acid).

[24] 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; 1μM FSK(forskolin), 양성대조군; 50μM AzA(Azelaic Acid). 각기 다른 알파벳은 ANOVA를 통한 Tukey test에서 $P<0.05$ 수준에서 통계적으로 유의성이 있음을 의미한다.

[25] 도 9는 3T3-L1 지방세포에 Olfr544 shRNA를 형질주입하여 Olfr544 유전자의 발현 저해 효과를 (A) RT-PCR 및 (B) 웨스턴 블랏(Western blot)으로 확인한 것이다.

[26] 도 10은 Olfr544 유전자가 넉다운된 3T3-L1 지방세포에 아젤라산(Azelaic Acid, AzA)을 2시간 동안 처리했을 때 세포 내 (A) cAMP 농도 (B) PKA 활성 (C) HSL의 인산화 여부(정도)를 확인한 것이다.

[27] 도 11은 Olfr544 유전자가 넉다운된 3T3-L1 지방세포에 아젤라산(Azelaic Acid, AzA)을 2시간 동안 처리했을 때 지방분해 효과가 글리세롤이 방출되는 양을 측정한 것이다.

[28] 도 12는 유전적으로 비만이 유도된 *ob/ob* 마우스에 아젤라산(Azelaic Acid, AzA)을 50mg/kg의 농도로 6주간 경구 투여한 후 (A) 몸무게 변화 및 (B) 사료 섭취량을 확인한 것이다.

[29] 도 13는 유전적으로 비만이 유도된 *ob/ob* 마우스에 아젤라산(Azelaic Acid, AzA)을 50mg/kg의 농도로 6주간 경구 투여한 후 총지방(Total), 복부지방(Abd) 및 피하지방(SubQ)을 micro-CT법으로 측정한 것이다.

[30] 도 14은 유전적으로 비만이 유도된 *ob/ob* 마우스에 아젤라산(Azelaic Acid, AzA)을 50mg/kg의 농도로 6주간 경구 투여한 후 (A) 혈중 중성지방(Triglyceride), (B) 아디포넥틴(Adiponectin), (C) 콜레스테롤(Cholesterol)의 농도를 측정한 것이다.

[31] 도 15은 유전적으로 비만이 유도된 *ob/ob* 마우스에 아젤라산(Azelaic Acid, AzA)을 50mg/kg의 농도로 6주간 경구 투여한 후 (A) 간 조직 무게 및 간 독성 지표인 (B) ALT, (C) AST를 측정한 것이다.

[32] 도 16은 정상 마우스에 아젤라산(Azelaic Acid, AzA)을 50mg/kg의 농도로 6주간 경구 투여한 후 간접열량 측정법(Indirect calorimetry)에 따라 총 에너지 소모량(EE), 호흡률(RQ), 지방산화(Fatty Acid Oxidation), O_2 소모량 및 CO_2 생성량을 측정한 것이다.

[33]

[34] **발명의 상세한 설명 및 바람직한** 구현예

[35] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[36]

[37] 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.

[38] 본 발명은 또한 유전적 비만 마우스인 *ob/ob* 마우스에 Olfr544 활성제인 아젤라산을 6주간 경구투여한 결과, 체지방이 감소하였고 이는 생체 대사율 실험에서 지방산화가 증가한 결과라는 사실을 확인하였다

[39] 아젤라산은 인체 내에서 자연스럽게 생성되거나 사람이 주식으로 섭취하는 보리, 귀리, 호밀 등 곡류에 존재하는 식품 성분이다. 보고된 연구 결과에 따르면, 인체 내 아젤라산의 농도는 10~50μM 정도이고, 일반적으로 안전하게 섭취할 수 있는 특징이 있는 것으로 널리 알려져 있다. 아울러, 본 발명의 MTT 독성실험에서도 3T3-L1 지방세포에 아젤라산을 500μM 농도까지 처리해도 독성이 전혀 나타나지 않는 것으로 확인되었다.

[40] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 아젤라산(Azelaic Acid)을 유효성분으로 함유하는 비만 치료용 의약조성물에 관한 것이다.

[41] 본 발명은 다른 관점에서 아젤라산(Azelaic Acid)을 투여하여 비만을 예방, 치료 또는개선하는 방법에 관한 것이다.

[42] 본 발명은 또 다른 관점에서 아젤라산(Azelaic Acid)을 비만의 예방제, 치료제 또는 개선제로 사용하는 용도에 관한 것이다.

[43] 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.

[44] 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.

[45] 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.

[46] 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 제조방법에 사용되는 다양한 방법에 따라 추출된 것일 수 있다.

[47] 본 명세서에서 사용되는 용어 "아젤라산(Azelaic Acid)"은 동의어인 노난디산(Nonanedioic Acid)과 혼용해서 사용할 수 있다.

[48] 본 발명의 아젤라산은 천연물질이므로 독성이 전혀 없어서 의약품으로 지속적으로 다량 사용할 수 있다.

[49] 본 발명의 아젤라산을 포함하는 조성물은 이미 사용되고 있는 항히스타민제, 소염진통제, 항암제 및 항생제 등의 약제와 함께 제제화하거나 병용하여 사용될 수 있다.

[50] 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.

[51] 용어 "약제학적 조성물(pharmaceutical composition)" 또는 "의약조성물"은 본 발명의 아젤라산을 함유하는 화합물과 희석제 또는 담체와 같은 다른 화학 성분들의 혼합물을 의미한다.

[52] 용어 "약리학적으로 허용되는(physiologically acceptable)"은 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는 담체 또는 희석제로 정의된다.

[53] 용어 "담체(carrier)" 또는 "비이클(vehicle)"은 세포 또는 조직 내로의 화합물의 부가를 용이하게 하는 화합물로 정의된다. 예를 들어, 디메틸술폭사이드(DMSO)는 생물체의 세포 또는 조직 내로의 많은 유기 화합물들의 투입을 용이하게 하는 통상 사용되는 담체이다.

[54] 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.

[55] 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.

[56] 본 발명에서 사용에 적합한 의약조성물 또는 약제학적 조성물에는, 활성 성분들이 그것의 의도된 목적을 달성하기에 유효한 량으로 함유되어 있는 조성물이 포함된다. 더욱 구체적으로, 치료적 유효량은 치료될 객체의 생존을 연장하거나, 질환의 증상을 방지, 경감 또는 완화시키는데 유효한 화합물의 량을 의미한다. 치료적 유효량의 결정은, 특히, 여기에 제공된 상세한 개시 내용 측면에서, 당업자의 능력 범위 내에 있다.

[57] 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.

[58] 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).

[59] 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.

[60] 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.

[61] 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.

[62] 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.

[63] 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.

[64] 본 발명에 따른 아젤라산을 포함하는 약학 조성물 또는 의약조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 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, 덱스트로즈,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.

[65] 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 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 60, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[66]

[67] 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, 웨스턴블랏(Western blot) 및 면역조직염색법(Immunohistochemistry)을 통해 최종 확인하고자 하였다.

[68] 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.

[69] 한편, 도 2C에 나타난 바와 같이, 웨스턴 블랏 실험에서 Olfr544 단백질은 3T3-L1 지방세포의 세포기질(cytosol)에서 검출되지 않았고, 세포막(membrance 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.

[70] 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 500μM의 고농도에 처리해도 세포독성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다.

[71] 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 1~1000μM 농도 구간에서 농도 의존적으로 Olfr544 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. 또한, EC50값은 29.71μM로 나타나 상기 농도에서 약 50%의 Olfr544가 활성화되었다.

[72] 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, 아젤레산으로 처리된 3T3-L1 지방세포에서 cAMP 농도만이 특이적으로 아젤레산의 농도에 비례하여 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다.

[73] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 아젤라산이 지방조직에서 cAMP 농도를 특이적으로 증가시키며 inositol phosphate 및 칼슘 농도에는 영향을 주지 않는다는 사실을 확인하였다 (도 5).

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

[75] 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 50μM 농도를 2시간 처리하였을 때 대조군과 비교하여 PKA 활성이 113.8% 증가하는 결과를 확인하였다. 따라서, 아젤라산 처리에 따른 지방세포의 cAMP 증가로 PKA 활성이 증가하였다.

[76] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 아젤라산에 의한 CREB(cAMP-response element binding protein) 및 HSL(hormone-sensitve lipase) 단백질 인산화 변화를

확인하였다. 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 아젤라산을 50μM 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.

[77] 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.

[78] 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 50μM 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.

[79] 발명의 또 다른 실시예에서는 Olfr544 shRNA를 이용하여 아젤리산의 지방분해 조절 효과에서 Oflr544의 역할을 재확인 해 볼 수 있었는데, 마우스 지방세포인 3T3-L1 세포에 Olfr544 shRNA를 형질주입하여 Olfr544 유전자 발현을 억제하였고 (도 9), Olrf544 발현을 억제한 세포에 아젤라산을 처리한 결과 cAMP-PKA-HSL 신호전달 경로가 모두 불활성화 되었고(도 10), 아젤라산 처리에 따른 혈중 중성지방 분해에 따른 글리세롤 배출농도의 변화가 관찰되지 않아(도 11) 아젤라산에 의한 지방분해 효과가 Olfr544 의존적임을 확인할 수 있었다.

[80] 한편, 발명의 또 다른 실시예에서는 비만이 유도된 마우스 동물모델에 아젤라산을 경구 투여하고 다양한 비만 관련 지표를 확인해 보았는데, 아젤리산을 투여한 비만 마우스군은 식이섭취량 변화가 없으나, 몸무게 증가가 대조군에 비해 유의적으로 감소하고 (도 12), 총지방, 피하지방, 복부지방도 대조군에 비해 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다 (도 13). 또한, 혈중 지표 분석 결과, 아젤라산 투여에 의해 혈중 콜레스테롤 농도를 유의적으로 낮추는 효과를 나타내었으나 (도 14), 고지방 식이를 투여한 ob/ob 마우스는 지방간 발생에 따라 간조직 무게가 증가하나 아젤라산 투여에 의해 간조직 무게가 감소하며 간 독성의 부작용 동은 나타나지 않는 것으로 확인되었다 (도15).

[81] 마지막으로, 정상 마우스에서 아젤라산 투여에 따른 에너지 대사를 분석해 본

결과, 아젤라산 투여군에는 대조군에 비해 총 에너지 소모량(EE)은 변화가 없었으나 호흡률(RQ)은 감소하고, 지방산화는 증가하는 것으로 나타났으며, O_2 소모량은 대조군과 큰 차이가 없었으나 CO_2 생성량이 대조군에 비해 크게 증가한 것으로 나타났다(도16).

[82] 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.

[83] 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.

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

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

[86] 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.

[87] 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.

[88] 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 ㎖를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[89] 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 덱스트린, 시클로덱스트린 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 ㎖당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

[90]

[91] 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 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 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.

[92] 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.

[93]

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

[95] 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(Immunohistochemisty)을 통해 세포 내 Olfr544 단백질의 발현을 확인하였다.

[96]

[97] 1-1: 세포 배양

[98] 실시예 1~7에서 사용된 지방세포(adipose cell)는 생쥐의 3T3-L1 지방전구세포(preadipocyte)(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% CO_2, 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).

[99]

[100] 1-2: 세포 분화

[101] 3T3-L1 지방전구세포의 분화과정은 다음과 같다. 먼저, 6-웰 플레이트(well plate)에 웰(well) 당 1×10^6 세포를 분주하여 세포가 100% 밀집되게 배양하였다. 2일 후 상기 배양된 3T3-L1 지방전구세포를 10% FBS(fetal bovine serum)와 MDI 용액(0.5mM IBMX, 0.5μM 덱사메사손(dexamethasone), 10μg/mL 인슐린(insulin))이 포함된 DMEM 배지에서 3일 동안 처리하였다. 그 다음, 상기 처리된 세포를 10% FBS 및 10μg/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).

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

[103]

[104] 1-3: Olfr544 유전자 발현

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

[106] (1) cDNA 합성

[107] 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 2μl의 4x DNA Master Mix와 0.5μg의 RNA, 증류수(nuclease-free water)로 총 8μl의 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.

[108]

[109] (2) PCR

[110] 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.

[111]

[112] 하기 표 1은 Olfr544 프라이머 서열을 나타낸 것이다.

[113]

[114] [표1]

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

[115]

[116] (3) qPCR(quantitative real-time PCR)

[117] 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.

[118] 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. 특히, 두 실험 모두에서 3T3-L1 지방세포보다 지방조직에서 더 높은 수준의 Olfr544의 유전자 발현이 관찰되었다.

[119]

[120] 1-4: Olfr544 단백질 발현

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

[122]

[123] (1) 단백질 추출(protein extraction)

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

[125] 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 $MgSO_4$, 25mM $NaHCO_3$, 7.5mM D-glucose, pH 7.4)로 세척한 다음, 용액 D(용액 C + 10mM $CaCl_2$)를 넣고, 20분간 교반시켜 원심분리하였다. 원심분리 후 수득한 상층액을 다시 원심분리하여 수득된 침전물을 TEM 완충용액(10mM Tris, 3mM $MgCl_2$, 2mM EDTA, pH 8.0)와 글리세롤(glycerol)에 용해시켜 세포막 단백질(membrane protein) 분획으로 최종 수득하였다. 상기와 같은 단백질 추출방식은 기존 세포막 분획법인 기계적 교반 방법보다 단백질 수율이 높은 칼슘이온 충격법으로 알려져 있다.

[126] 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, 25μg/ml 디지토닌(digitonin), pH 7.4)을 첨가하고 10분간 얼음 위에 방치한 뒤, 원심분리하여 상층액을 세포기질 단백질(cytosol protein) 분획으로 최종 수득하였다.

[127] 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.

[128]

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

[130] 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 40μg의 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.

[131] 웨스턴 블랏은 SDS-PAGE 젤로부터 블랏팅된 단백질을 함유하는 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane, NC membrane)에 비특이적 결합을 방지하기 위해 블랑킹(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. 그 다음, 웨스턴 블랏에서의 단백질 밴드의 함량 비교는 소프트웨어(Gel-Pro Analyzer 4.0)를 통해 정량 및 수치화하였다.

[132]

[133] (3) 면역조직염색법(Immunohistochemistry)

[134] 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(Intivtrogen, 캘리포니아, 미국)을 사용하여 3T3-L1 지방세포에 lucy-flag-Olfr544 발현 벡터를 24시간 동안 형질감염(transfection)시켰다. 그 다음, 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.

[135] 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.

[136] ii) 세포막 염색을 위해, 형광이 표지된 CellMask™ Orange Plasma Membrane Stains(Invitrogen, 캘리포니아, 미국)를 사용하여 37℃에서 10분간 처리하여 세포막을 염색하였다.

[137] iii) 핵 염색을 위해, DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)(Sigma, 미국) 용액을 처리하여 핵을 염색한 다음, 커버 슬라이드를 덮어 밀봉하였다.

[138] 상기와 같이, 최종 염색된 3T3-L1 지방세포는 공초점형광현미경(confocal fluorescent microscope, LSM700, Carl Zeiss)을 사용하여 촬영되었다.

[139]

[140] 그 결과, 도 2C에 나타난 바와 같이, 웨스턴 블랏 실험에서 Olfr544 단백질은 3T3-L1 지방세포의 세포기질(cytosol)에서 검출되지 않았고, 세포막(membrance 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.

[141]

[142] 실시예 2: 아젤라산의 세포독성 평가

[143] 아젤라산의 세포독성을 평가하기 위해 MTT 어세이(MTT assay)를 수행하였다.

[144] 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.

[145] 먼저 96-웰 플레이트(well plate)에 3T3-L1 지방세포를(4×10^5 세포/ml) 분주하고, 37℃, 5% CO_2 하에서 24시간 배양한 다음, 아젤라산을 0~500μM 농도 구간에서 처리하여 24시간 배양하였다. 각 시료에 MTT 시약을 4mg/mL 농도로 100μL

첨가한 다음, 37℃, 5% CO_2 하에서 4시간 배양한 후, DMSO(Dimethyl sulfoxide)을 100μL 첨가하고, 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 수치는 생존 세포 수와 비례하는 원리를 이용하여 독성에 의한 세포 사멸 효과를 정량한 것이다.

[146] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 3T3-L1 지방세포에 아젤라산을 500μM의 고농도에 처리해도 세포독성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 따라서, 보리, 귀리 등 곡류를 포함한 각종 섭취 가능한 식물에 포함되어 있고, 인체 내 대사과정에서 생성되어 약 10~50μM 농도로 존재하는 아젤라산은, 인체 내에서 안전하게 섭취될 수 있는 물질임을 알 수 있었다.

[147]

[148] 실시예 3: 아젤라산의 Olfr544 리간드 효능 평가

[149] 생체 외 어세이(in vitro assay)로 아젤라산의 Olfr544 리간드 활성을 평가하기 위하여 리포토 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.

[150] 리포터 유전자 어세이(reporter gene assay)는 다음과 같이 수행하였다. 먼저, Hana3A 세포주에 Olfr544 발현 벡터와 CRE(cAMP response element)-Luciferase 리포터 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 판단하는 지표인 50% 유효 농도(EC_{50})를 계산하였다.

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

[152] 결국, 도 4에서 확인된 아젤라산의 표적 단백질인 olfr544에 대한 EC_{50}값인 29.71μM을 근거로 대사성 질환 약물인 Actos(피오글리타존(pioglitazone),

PPAR-γ 효능제(agonist), EC_{50}=0.5μM, 인체투여량: 15~30mg/day) 및 비만 치료제인 Xenical(Olistat, 췌장 리파제 억제제(pancreatic lipase inhibitor), EC_{50} =0.24μM, 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.

[153]

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

[155] 아젤라산이 GPCR인 Olfr544를 활성화시키고, 중성지질분해 관련 신호전달 과정에 관여하는지 확인하고자 하였다.

[156] 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.

[157] 따라서, 3T3-L1 지방세포에서 Olfr544의 리간드인 아젤라산에 의한 이차 전령물질인 cAMP, IP-one(IP_3 대사물) 및 칼슘의 농도 변화를 측정하였다. IP_3의 경우 안정성이 낮아 쉽게 IP-one으로 분해가 되므로 세포 내 IP-one(IP_3 대사물) 양을 대신 정량하였다.

[158] 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, 50μM 아젤라산 및 양성대조군인 1μM Foskolin을 18시간 동안 처리하여 상기 명시된 방법대로 cAMP 농도를 측정하였다.

[159] IP-one 어세이는 GPCR의 신호전달 과정 중 포스포리파아제(phospholipase)에 의해 인지질 분해로 생성된 이차 전령물질인 IP_3의 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, 50μM 아젤라산을 18시간 동안 처리하여 IP_3를 측정하기 위해 오차가 적은 세포 내 IP-one(IP3 대사물)을 대리 표지자로 IP-one ELISA Assay kit(Cisbio, 프랑스)를 사용하여 측정하였다.

[160] 세포 내 칼슘의 측정은 칼슘 이온을 표지하는 형광 염료인 Fluo-4 Direct™ Calcium Assay Kit(Invitrogen, 캘리포니아, 미국)를 사용하여 측정하였다. 배양된

3T3-L1 지방세포를 수득하여, 원심분리 후 펠렛만을 키트 내 함유된 Fluo-4 Direct™ calcium assay 완충용액에 2.5×10^6 세포/mL 농도로 희석시켰다. 이를 96-웰 플레이트(96-well plate)에 분주시켜 37℃ 상태의 5% CO_2 조건 하에서 60분간 배양시킨 다음, 96-웰 플레이트에 50μL의 2X Fluo-4 Direct™ calcium reagent loading solution을 분주하였고, 37℃ 상태의 5% CO_2 조건 하에서 30분간 플레이트에 배양한 다음, excitation 494nm 및 emission 516nm 조건에서 형광을 측정하였다.

[161] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 아젤라산의 경우 세포 내 cAMP 농도를 유의적으로 증가시켰으나 IP_3 및 칼슘 농도에는 영향을 주지 않았다. 아젤라산에 의한 cAMP 농도 증가는 아젤라산의 농도에 따라 증가하는 양상을 보였다. 따라서, 아젤라산은 3T3-L1 지방세포에서 Olfr544 활성화를 통해 세포 내 cAMP 농도를 특이적으로 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

[162]

[163] 실시예 5: 아젤라산에 의한 PKA 활성 조절 효능 평가

[164] 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.

[165] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 아젤라산이 3T3-L1 지방세포에서 PKA 활성을 유의적으로 증가시켰다. 아젤라산을 50μM 농도를 2시간 처리하였을 때 대조군과 비교하여 PKA 활성이 113.8% 증가하는 결과를 확인하였다. 따라서, 아젤라산 처리에 따른 지방세포의 cAMP 증가로 PKA 활성이 증가하였다.

[166]

[167] 실시예 6: 아젤라산에 의한 CREB 및 HSL 단백질 인산화 변화 분석

[168] 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-sensitve 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.

[169] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 아젤라산을 50μM 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.

[170]

[171] 실시예 7: 아젤라산에 의한 지방세포 중성지질 농도, 콜레스테롤 농도 및 지질 가수분해 변화 분석

[172] 아젤라산이 cAMP-PKA-HSL 신호전달 과정 활성화를 통해 지방세포의 중성지질 가수분해를 유도하는지 알아보기 위하여 지방세포에 아젤라산을 직접 처리한 다음, 세포 내 지질농도를 측정하였다.

[173] 3T3-L1 지방세포에 아젤라산를 25 또는 50μM 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.

[174] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 아젤라산이 3T3-L1 지방세포에서 중성지질 농도를 유의적으로, 농도 의존적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 50μM 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.

[175] 또한, 아젤라산이 중성지질을 가수분해하는 효능이 있는지 확인하기 위해서 중성지질의 분해산물인 글리세롤 방출량을 측정하였다. 3T3-L1 지방세포에 50μM 아젤라산을 2시간 처리한 결과, 중성지질의 분해산물인 글리세롤이, 대조군과 비교하여, 46.7% 증가하여 글리세롤 방출량이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다.

[176] 종합하면, 본 발명에서 아젤라산이 지방세포의 막에 발현되는 GPCR인 Olfr544에 리간드로 결합하여 Olfr544를 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.

[177]

[178] 실시예 8: Olfr544 shRNA를 이용한 아젤리산 지방분해 조절 효과에서의 Oflr544 의존성 확인

[179] 8-1: Olfr544 shRNA를 이용한 지방세포의 Oflr544 유전자 넉다운

[180] 마우스 지방세포에서 Olfr544 유전자의 넉다운 효과를 확인하기 위하여 3T3-L1 세포를 6-well plate에서 지방세포로 분화하였다. Olfr544를 표적으로 하는 shRNA 염기서열(top strand:

5′-CACCGCTCACTGTTCGCATCTTCATTCGAAAATGAAGATGCGA-ACAGTG AG-3′) or encoding non-targeting scrambled shRNA hairpins (top strand: 5′-CACCGTAAGGCT-ATGAAGAGATACCGAAGTATCTCTTCATAGCCTTA-3′) 을 Block-iT U6 RNAi entry ventor kit(Invitrogen)을 이용하여 pENTR/U6 벡터에 삽입하여 Olfr544 shRNA를 제작한 후, 2.5 μg Olfr544 shRNA or scrambled shRNA를 10 μL Lipofectamin2000 (Invitrogen)을 사용하여 트랜스펙션 한 후, 48시간 후에 Olfr544 발현을 측정하였다. 상기 실시예 1-3 및 1-4에 기재된 방법에 따라 Olfr544의 RNA 및 단백질의 발현 양상을 확인하였다. Scr shRNA는 음성대조군으로 사용하였다.

[181] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, Olfr544 shRNA에 의해 Olfr544의 RNA와 단백질의 발현이 각각 80%, 50% 감소함을 확인할 수 있었다.

[182]

[183] 8-2: Olfr544 유전자가 넉다운 된 지방세포에서의 아젤라산의 신호전달 불활성화 효과

[184] 마우스 지방세포에서 Olfr544 유전자를 넉다운 시킨 후, 실시예 4에 기재된 방법에 따라 cAMP 어세이, 실시예 5에 기재된 방법에 따라 PKA 활성, 실시예 6에 기재된 방법에 따라 HSL 단백질의 인산화를 확인하였다.

[185] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, Olfr544 shRNA가 형질주입되어 Olfr544 유전자의 발현이 저해된 지방세포에서는 아젤라산을 처리하여도 cAMP-PKA-HSL 신호전달 경로가 모두 불활성화됨을 확인할 수 있었다.

[186]

[187] 8-3: Olfr544 유전자가 넉다운 된 지방세포에서의 아젤라산의 지방분해 효과 측정

[188] 마우스 지방세포에서 Olfr544 유전자를 넉다운 시킨 후, 아젤라산을 처리하여 아젤라산이 중성지질을 가수분해하는 효능이 유지되는지 확인해 보았다.

[189] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, Olfr544 shRNA가 형질주입되어 Olfr544 유전자의 발현이 저해된 지방세포에서는 아젤라산을 처리하여도 글리세롤의 농도에 변화가 없는 것으로 나타나, 지방세포에서 아젤라산에 의한 지방분해가 Olfr544 의존적임을 확인할 수 있었다.

[190]

[191] 실시예 9: 비만이 유도된 마우스 동물모델을 이용한 아젤라산의 항비만 효과 확인

[192] 유전적 비만 마우스인 *ob/ob* 마우스 (샘타고, 서울 대한민국)에 6주 동안 아젤라산을 50 mg/kg의 농도로 경구 투여한 후 아젤라산을 투여하지 않은 대조군과 비만도를 비교하였다. 구체적으로는 몸무게 증가 및 사료 섭취량, 체지방 분석, 혈중 지표 분석, 혈중 지질 지표 분석, 간 조직 무게 및 간 독성 지표인 ALT, AST 분석, 에너지 대사를 분석하였다.

[193] 9-1: 아젤라산 투여에 따른 몸무게 증가 및 사료 섭취량 분석

[194] 실험이 진행된 6주 동안 주 1회씩 아젤라산 투여군과 대조군의 몸무게 변화를 관찰하였다.

[195] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, 실험 1주차부터 아젤라산 투여군의 몸무게가 대조군에 비해 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다. 한편, 사료 섭취량을 실험 마지막 주에 측정해 본 결과, 아젤라산 투여군과 대조군 간의 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다.

[196]

[197] 9-2: 아젤라산 투여에 따른 체지방 분석

[198] 아젤라산을 6주간 경구 투여한 아젤라산 투여군과 대조군 마우스의 체지방(총지방, 피하지방, 복부지방)을 micro CT 이미지 분석을 통해 측정하였다. 피하지방은 마우스 전체에서 복부지방은 마우스의 15번부터 20번 척추 부위의 복부 지방량을 정량하여 계산하였다.

[199] 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이, 아젤라산을 6주간 경구 투여한 마우스의 총지방, 피하지방, 복부지방이 대조군에 비하여 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다.

[200]

[201] 9-3: 아젤라산 투여에 따른 혈중 지질 지표 분석

[202] 아젤라산을 6주간 경구 투여한 아젤라산 투여군과 대조군 마우스의 지질대사 효능을 평가하기 위하여 혈중 중성지방, 아디포넥틴 및 콜레스테롤의 농도를 측정하였다.

[203] 그 결과, 도 14에 나타난 바와 같이, 아젤라산 투여군에서 혈중 중성지방과 콜레스테롤 농도가 유의적으로 감소한 것을 확인하였다.

[204]

[205] 9-4: 아젤라산 투여에 따른 간 조직 무게, ALT, AST 분석

[206] 아젤라산을 6주간 경구 투여한 아젤라산 투여군과 대조군 마우스의 간 조직 무게, ALT, AST를 측정해 보았다.

[207] 그 결과, 도 15에 나타난 바와 같이, 아젤라산 투여군에서 간 무게가 감소하였고, 간 독성을 나타내는 지표인 ALT 및 AST는 대조군과 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

[208]

[209] 실시예 10: 정상 마우스에서 아젤라산 투여에 따른 에너지 대사 분석

[210] 간접열량 측정법(Indirect calorimetry)을 이용하여 아젤라산 투여군과 대조군의 O_2 소모량 및 CO_2 생성량을 측정하여 에너지 대사율을 확인하였다.

[211] 그 결과, 도 16에 나타난 바와 같이, 아젤라산 투여군에서 총 에너지 소모량(energy expenditure, EE)는 변화가 없었으나 호흡률(Respiratory Quotient, RQ)이 감소하였고 지방산화(Fatty Acid Oxidation)가 증가함을 확인할 수 있었다. 호흡률의 감소는 탄수화물에 비해 지방산을 주요 에너지원으로 사용함을 의미하는 것으로, 이와 같은 결과를 통해 아젤라산이 지방조직의 지방을

분해하여 에너지원으로 소모하는 비율이 증가하고 이에 따라 저장 지방량이 감소하여 체지방이 감소함을 알 수 있었다.

[212]

산업상 이용가능성

[213] 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.

[214]

서열목록 Free Text

[215] 전자파일 첨부하였음.

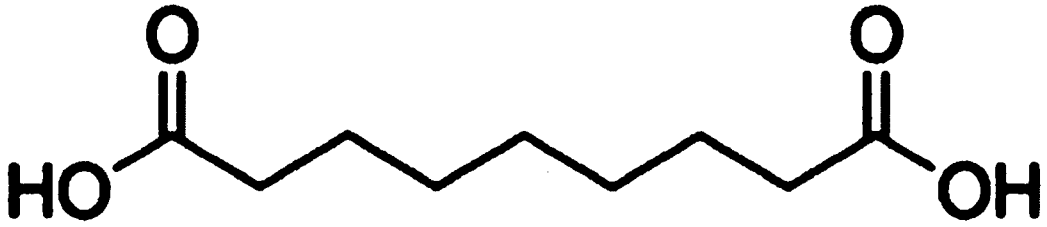
청구범위

[청구항 1] 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 또는 치료용 의약조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 아젤라산이 지방조직의 중성지질 가수분해를 촉진하는 것을 특징으로 하는 의약조성물.

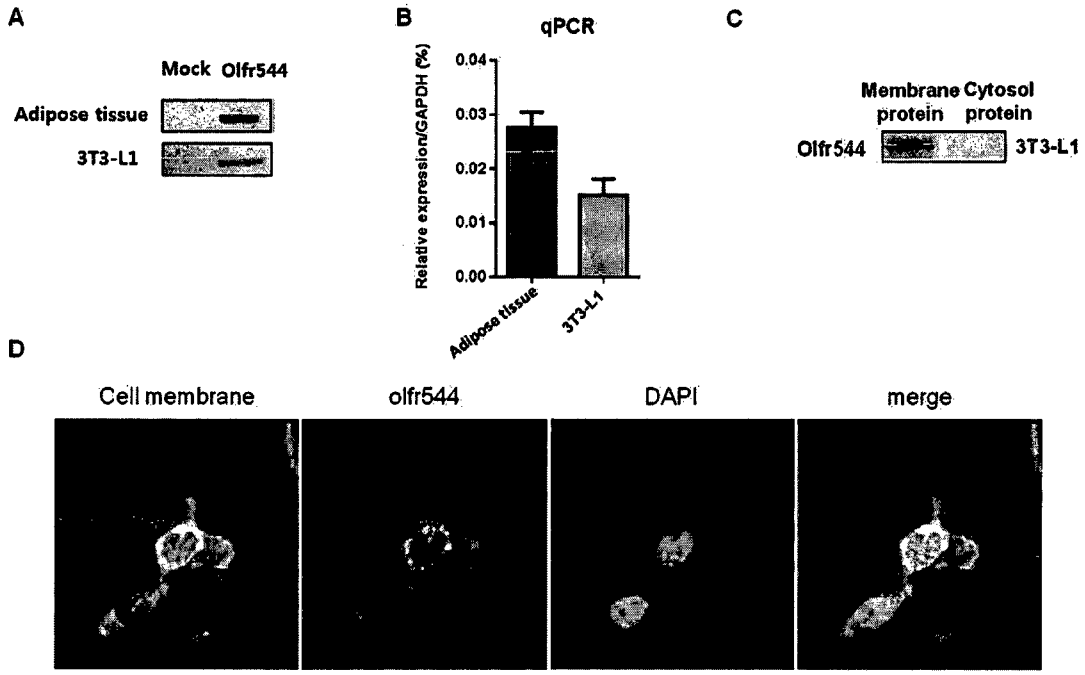
[청구항 3] 아젤라산을 유효성분으로 함유하는 비만 개선용 건강기능성 식품.

[도1]

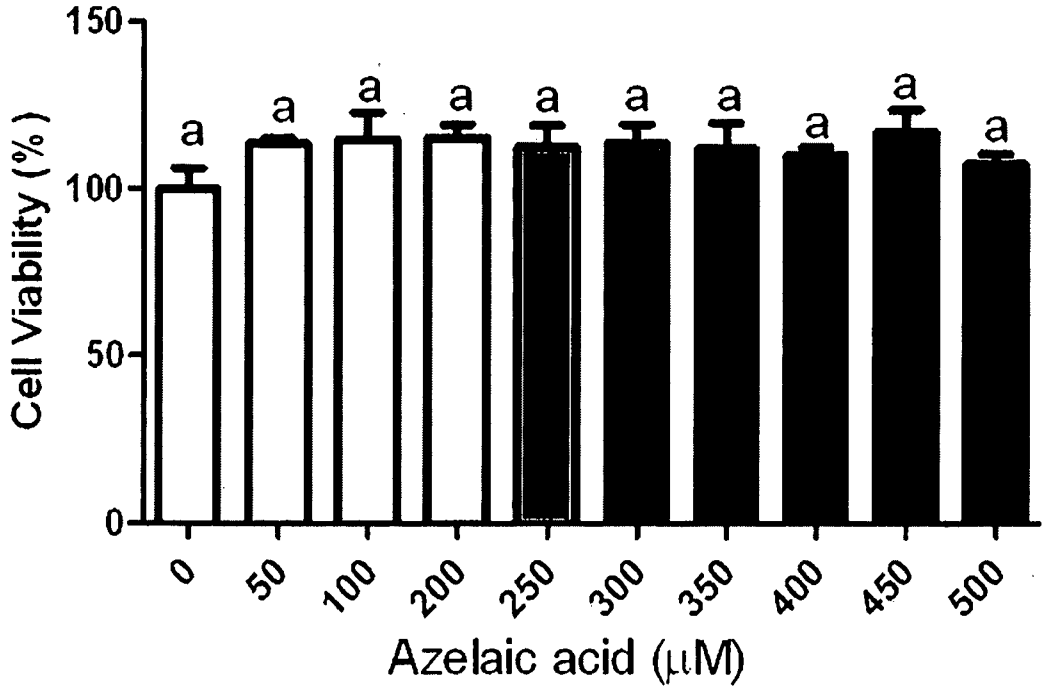


분자량: 188.22 g/mol, 분자식: $C_9H_{16}O_4$

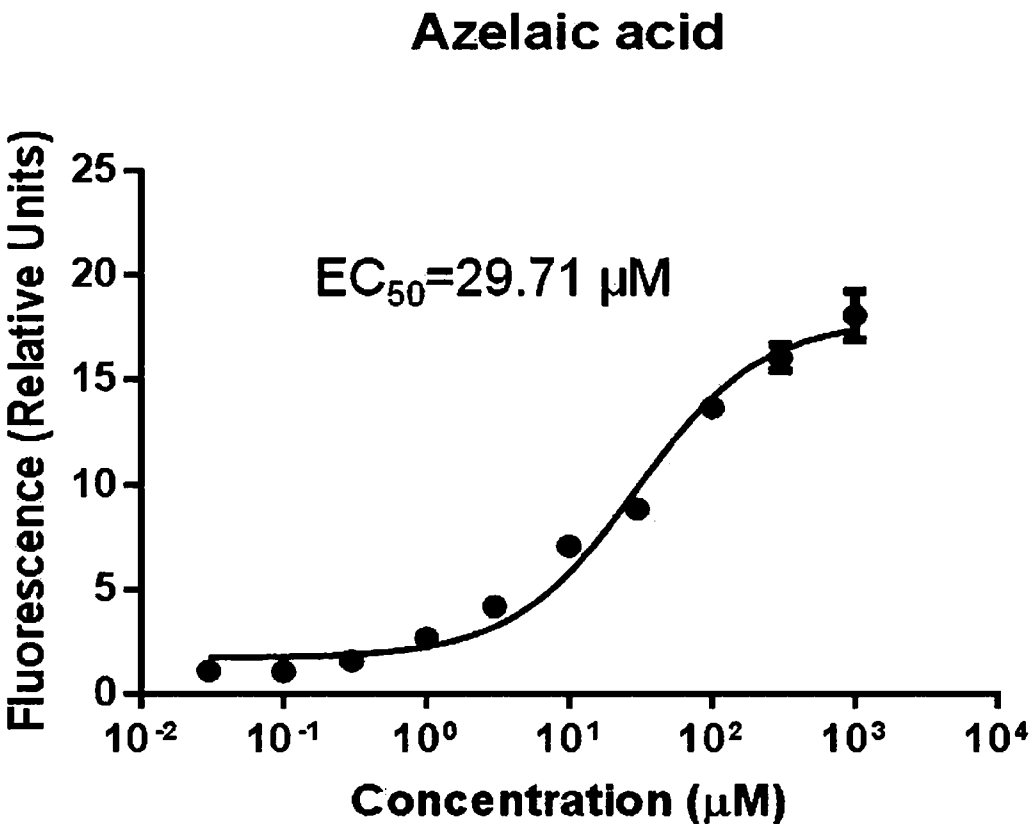
[도2]



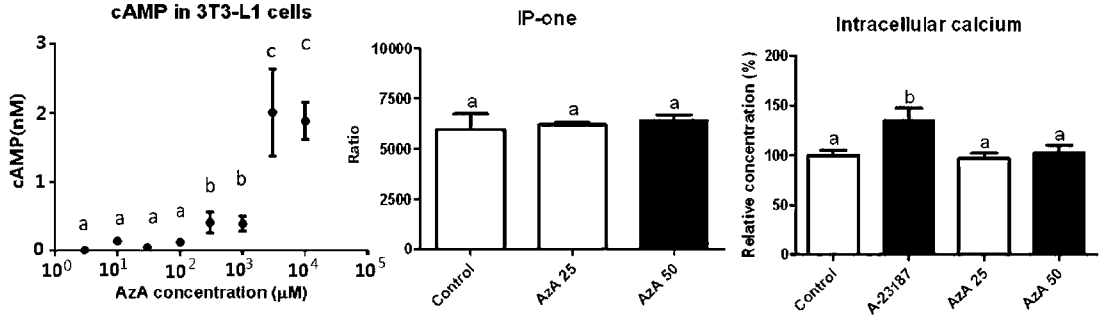
[도3]



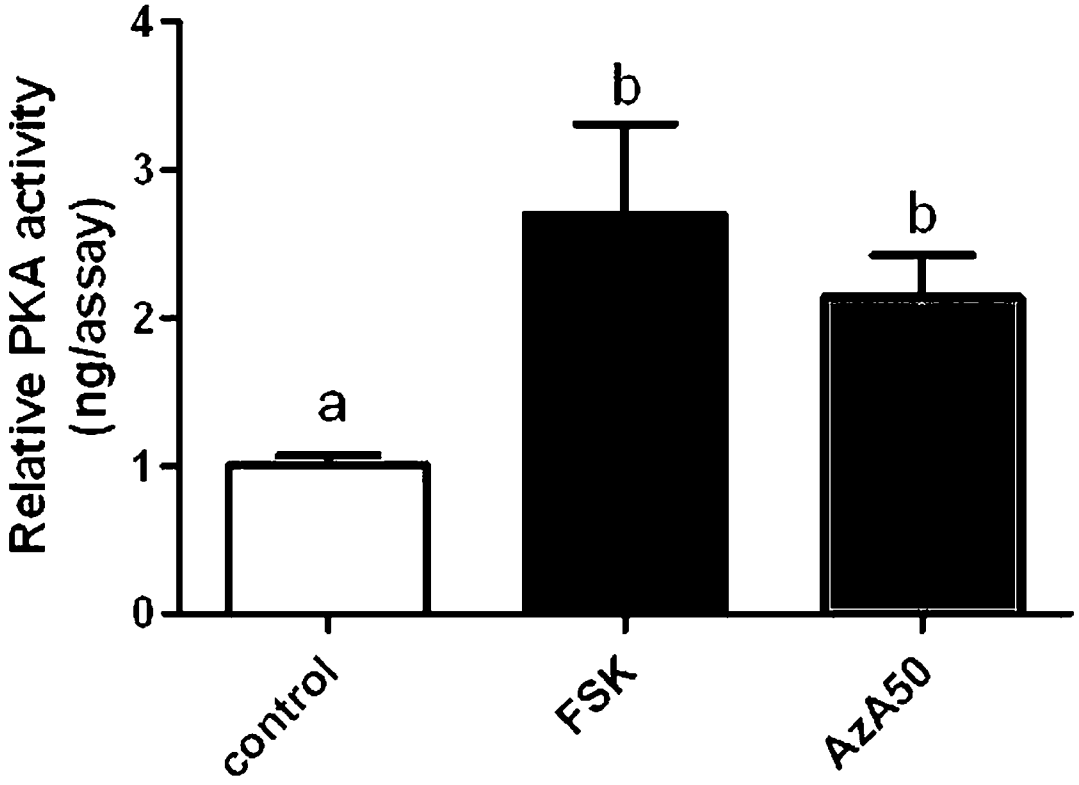
[도4]


Azelaic acid
Fluorescence (Relative Units)
EC50=29.71 μM
Concentration (μM)

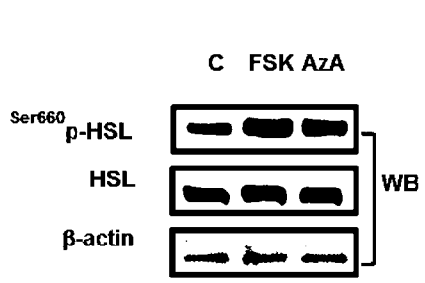
[도5]

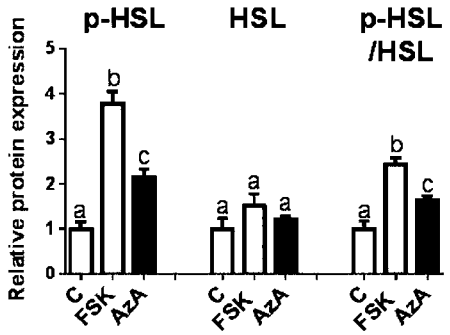

cAMP in 3T3-L1 cells
cAMP(nM)
AzA concentration (μM)
IP-one
Ratio
Control
AzA 25
AzA 50
Intracellular calcium
Relative concentration (%)
Control
A-23187
AzA 25
AzA 50

[도6]

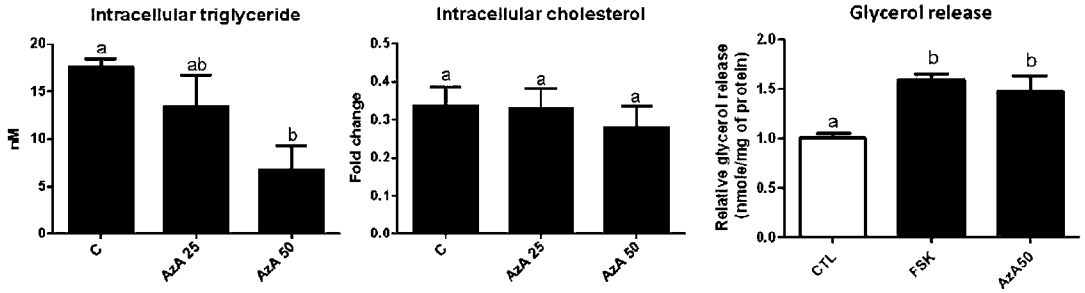

Relative PKA activity (ng/assay)
4
3
2
1
0
a
b
b
control
FSK
AzA50

[도7]

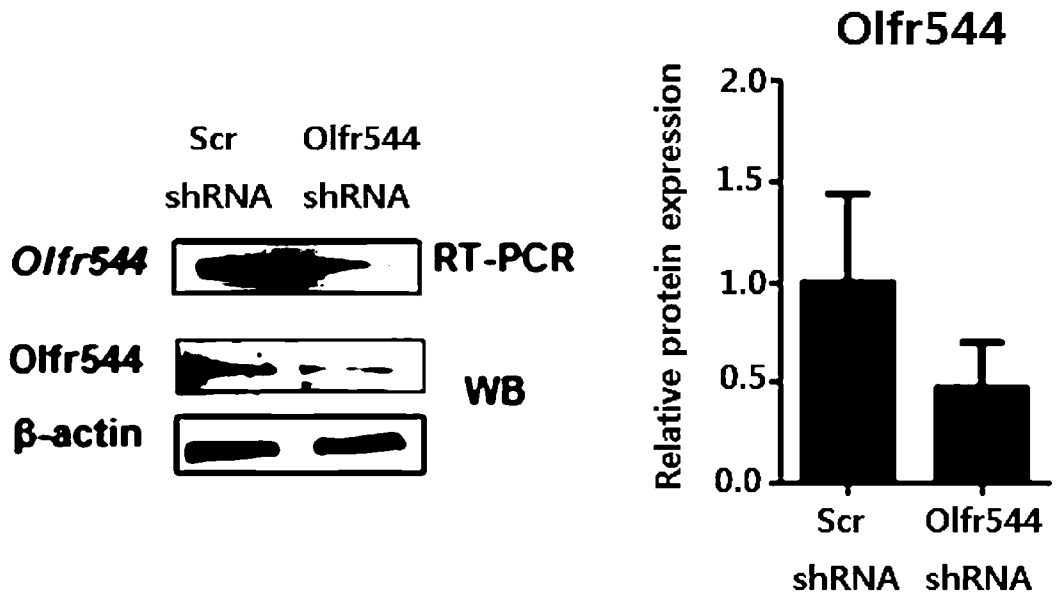

C FSK AzA
Ser660 p-HSL
HSL
β-actin
WB


p-HSL
HSL
p-HSL /HSL
Relative protein expression
C
FSK
AzA

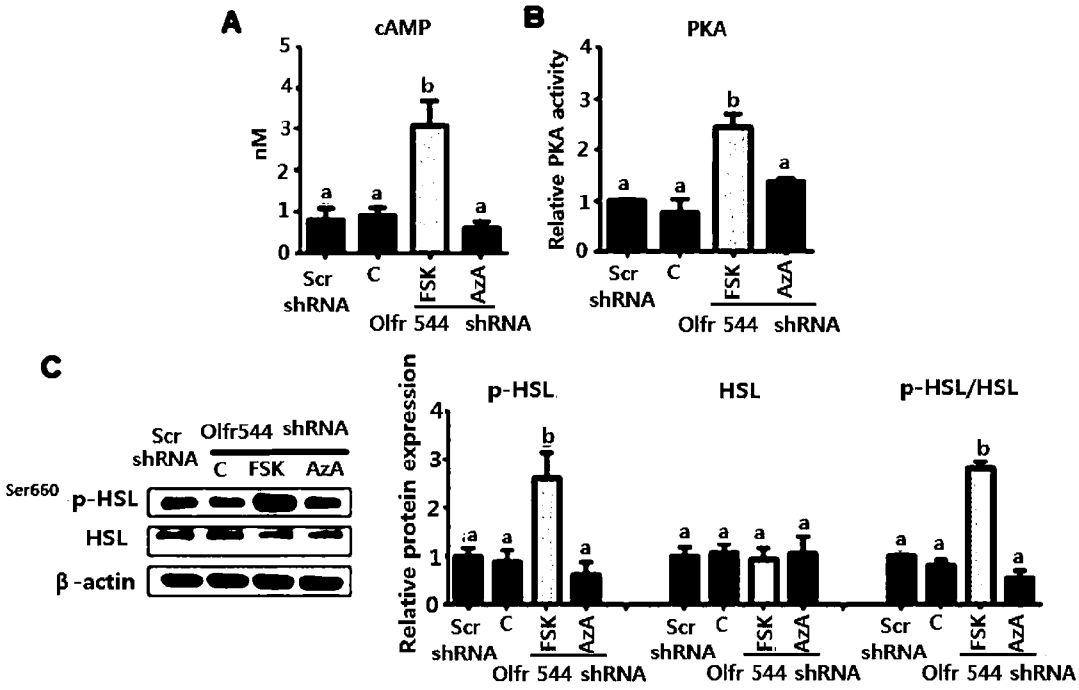
[도8]


Intracellular triglyceride
nM
C
AzA 25
AzA 50
Intracellular cholesterol
Fold change
Glycerol release
Relative glycerol release (nmole/mg of protein)
CTL
FSK
AzA50

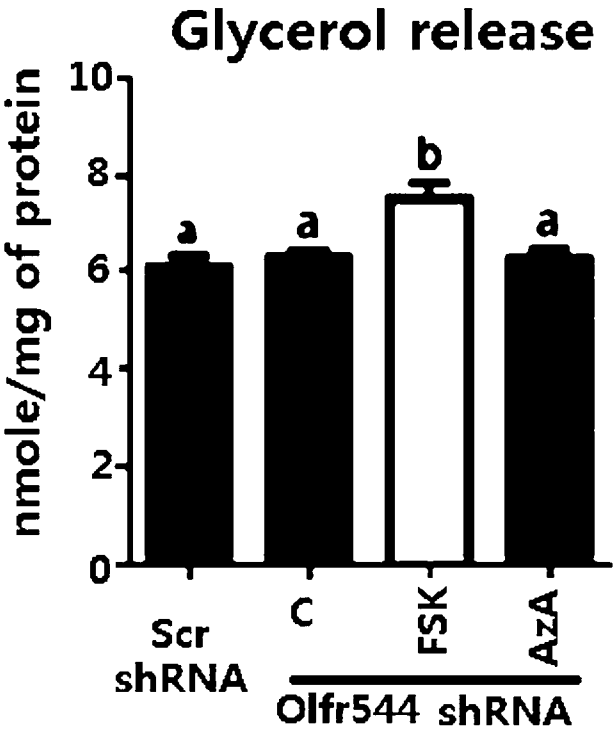
[도9]


Scr shRNA
Olfr544 shRNA
Olfr544
RT-PCR
Olfr544
β-actin
WB
Olfr544
Relative protein expression
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Scr shRNA
Olfr544 shRNA

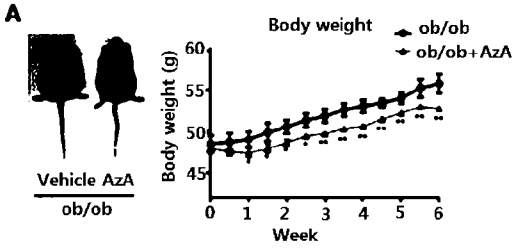
[도10]


A
cAMP
nM
B
PKA
Relative PKA activity
Scr shRNA
C
FSK
AzA
Olfr 544 shRNA
C
Scr shRNA
Olfr544 shRNA
C
FSK
AzA
Ser660
p-HSL
HSL
β-actin
p-HSL
HSL
p-HSL/HSL
Relative protein expression

[도11]



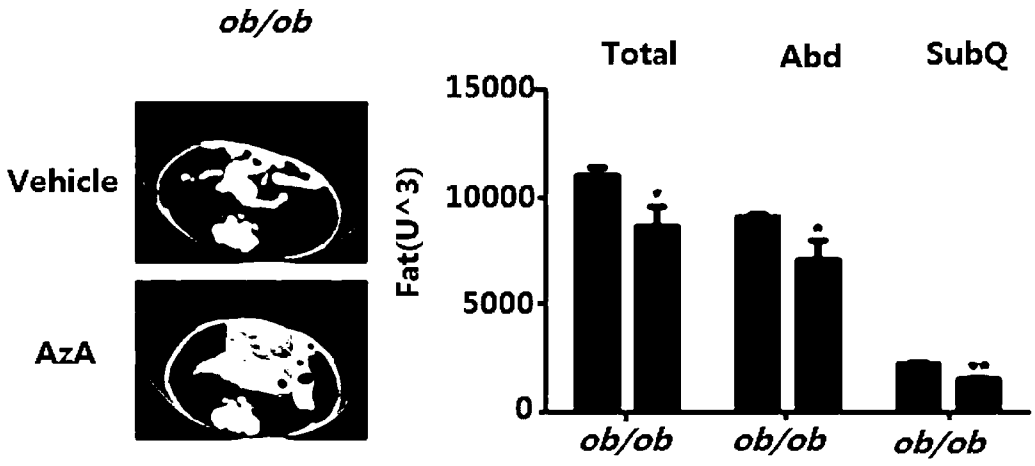
[도12]



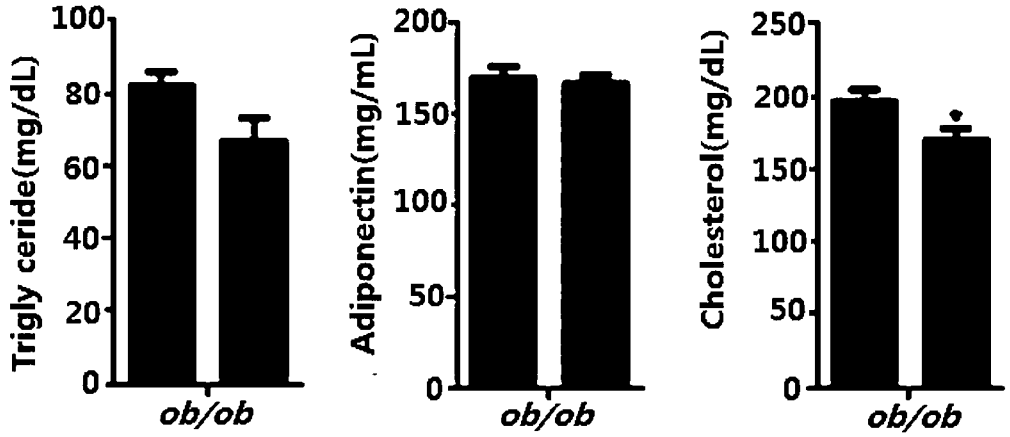
B

Week	*ob/ob* mice	
	Vehicle(g)	AzA(g)
5.0	4.94 ±0.32	4.07 ± 0.27
5.5	4.83 ± 0.27	4.24 ± 0.56
6.0	4.93 ± 0.31	3.98 ± 0.18

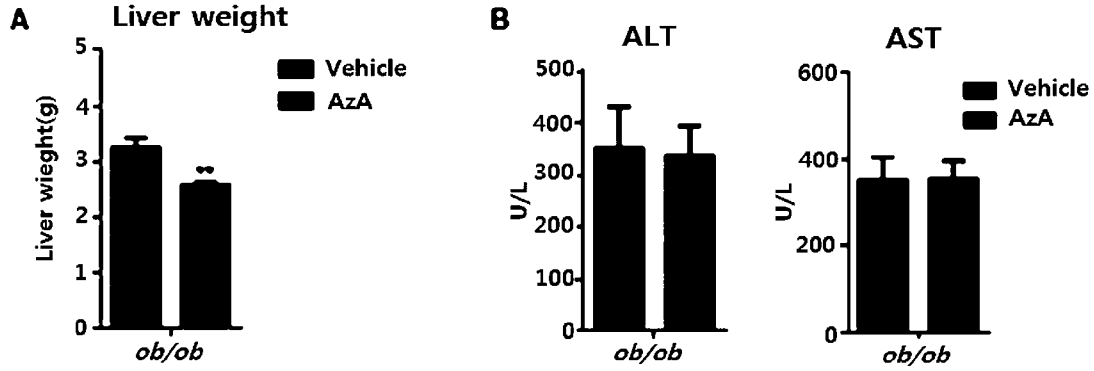
[도13]



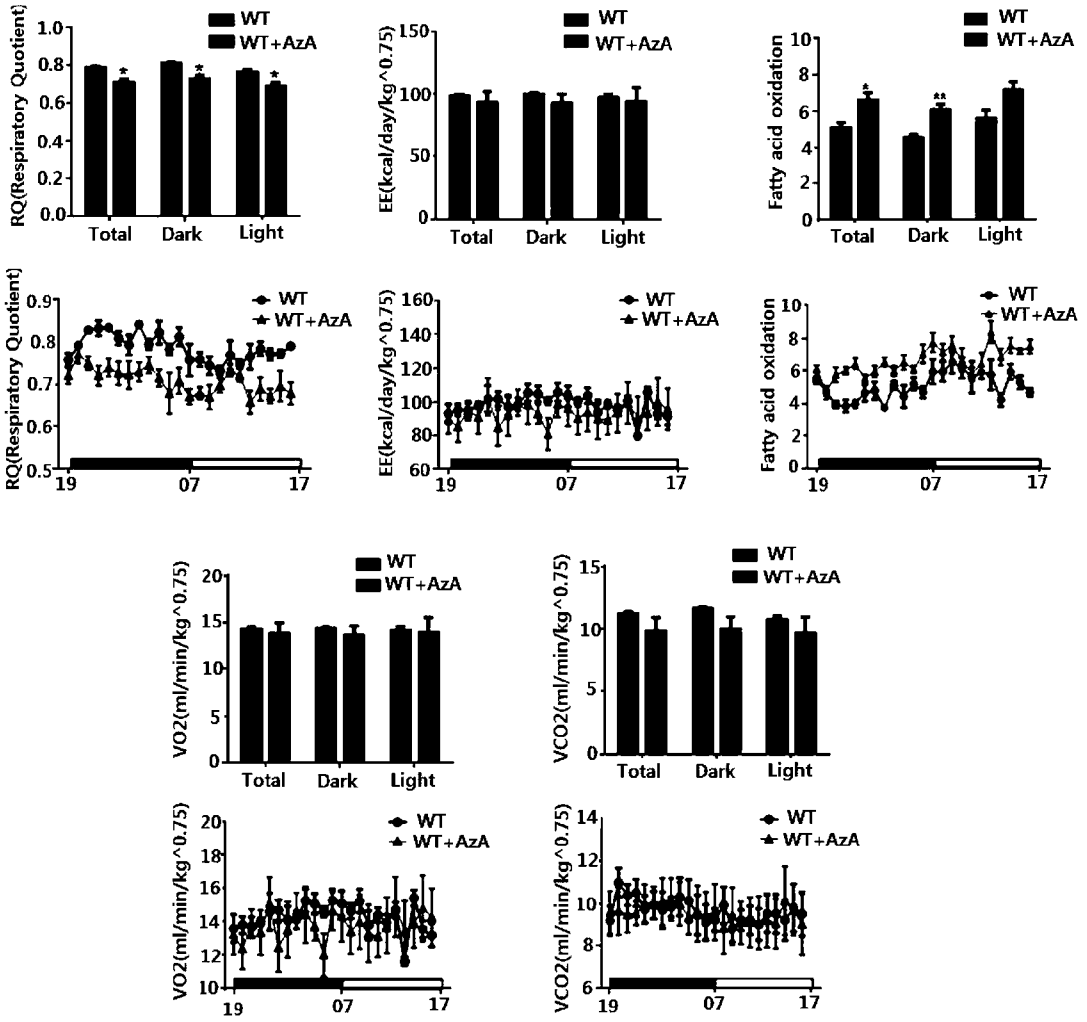
[도14]


Trigly ceride(mg/dL)
100
80
60
40
20
0
ob/ob
Adiponectin(mg/mL)
200
150
100
50
0
ob/ob
Cholesterol(mg/dL)
250
200
150
100
50
0
ob/ob

[도15]


A
Liver weight
Liver wieght(g)
5
4
3
2
1
0
Vehicle
AzA
ob/ob
B
ALT
U/L
500
400
300
200
100
0
ob/ob
AST
U/L
600
400
200
0
Vehicle
AzA
ob/ob

[도16]


RQ(Respiratory Quotient)
EE(kcal/day/kg^0.75)
Fatty acid oxidation
VO2(ml/min/kg^0.75)
VCO2(ml/min/kg^0.75)
WT
WT+AzA
Total
Dark
Light
19
07
17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2016/006859

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/20(2006.01)i, A61K 31/225(2006.01)i, A61K 31/23(2006.01)i, A23L 1/30(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/20; A61K 9/20; C12N 15/11; C12Q 1/68; A61K 38/26; A61K 47/12; A61K 9/08; A61K 31/225; A61K 31/23; A23L 1/30

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: azelaic acid, obesity

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2004-0010681 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.) 31 January 2004 See abstract; claims 1-3, 7, 16 and 33.	1-3
A	KR 10-2012-0064604 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 19 June 2012 See abstract; claim 1.	1-3
A	KANG, N. et al., "Olfactory Receptor Olfr544 Responding to Azelaic Acid Regulates Glucagon Secretion in α-cells of Mouse Pancreatic Islets", Biochemical and Biophysical Research Communications, (Electronic Publishing) 21 March 2015, vol. 460, no. 3, pages 616-621 See the entire document.	1-3
A	MUTHULAKSHMI, S. et al., "Efficacy of Azelaic Acid on Hepatic Key Enzymes of Carbohydrate Metabolism in High Fat Diet Induced Type 2 Diabetic Mice", Biochimie, (Electronic Publishing) 28 February 2013, vol. 95, no. 6, pages 1239-1244 See the entire document.	1-3
A	KR 10-2013-0101515 A (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM, LTD.) 13 September 2013 See abstract; claims 1, 22, 26 and 35.	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 SEPTEMBER 2016 (21.09.2016)	**22 SEPTEMBER 2016 (22.09.2016)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2016/006859

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2004-0010681 A	31/01/2004	AR 037490 A1	17/11/2004
		AT 375155 T	15/10/2007
		AU 2002-319189 B2	18/08/2005
		BR 0210267 A	20/07/2004
		CA 2448035 A1	12/12/2002
		CA 2448035 C	03/11/2009
		CN 1514726 A	21/07/2004
		CN 1514726 B	06/10/2010
		DE 60222898 T2	24/07/2008
		DK 1399153 T3	07/01/2008
		EP 1399153 A2	24/03/2004
		EP 1399153 B1	10/10/2007
		ES 2292782 T3	16/03/2008
		GT 200200105 A	26/02/2003
		JP 2004-532272 A	21/10/2004
		JP 4558313 B2	06/10/2010
		MX PA03011041 A	19/03/2004
		PA 8546501 A1	24/01/2003
		PE 02622003 A1	19/03/2003
		PT 1399153 E	31/12/2007
		US 2003-0039686 A1	27/02/2003
		US 6730319 B2	04/05/2004
		UY 27320 A1	28/02/2003
		UY 3901 U	31/07/2002
		WO 02-098413 A2	12/12/2002
		WO 02-098413 A3	27/02/2003
		ZA 200309099 B	08/03/2005
KR 10-2012-0064604 A	19/06/2012	CN 103415626 A	27/11/2013
		CN 103415626 B	24/02/2016
		JP 2013-544531 A	19/12/2013
		JP 5933583 B2	15/06/2016
		KR 10-1050436 B1	19/07/2011
		KR 10-2015-0005870 A	15/01/2015
		US 2013-0338034 A1	19/12/2013
		WO 2012-077898 A2	14/06/2012
		WO 2012-077898 A3	26/07/2012
KR 10-2013-0101515 A	13/09/2013	BR 112013004455 A2	07/06/2016
		CA 2808978 A1	01/03/2012
		CN 103221033 A	24/07/2013
		EP 2608771 A1	03/07/2013
		JP 2013-538207 A	10/10/2013
		MX 2013002045 A	17/10/2013
		RU 2013-112807 A	27/09/2014
		US 2013-0157939 A1	20/06/2013
		WO 2012-025921 A1	01/03/2012

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2016/006859

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/20(2006.01)I, A61K 31/225(2006.01)I, A61K 31/23(2006.01)I, A23L 1/30(2006.01)I

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 31/20; A61K 9/20; C12N 15/11; C12Q 1/68; A61K 38/26; A61K 47/12; A61K 9/08; A61K 31/225; A61K 31/23; A23L 1/30

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:아젤라산, 비만

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2004-0010681 A (에프. 호프만-라 로슈 아게) 2004.01.31 요약; 청구항 1-3, 7, 16 및 33 참조.	1-3
A	KR 10-2012-0064604 A (연세대학교 산학협력단) 2012.06.19 요약; 청구항 1 참조.	1-3
A	KANG, N. 등, 'Olfactory receptor Olfr544 responding to azelaic acid regulates glucagon secretion in α-cells of mouse pancreatic islets', Biochemical and Biophysical Research Communications, (전자공개) 2015.03.21, 제460권, 제3호, 616-621 페이지 전체 문헌 참조.	1-3
A	MUTHULAKSHMI, S. 등, 'Efficacy of azelaic acid on hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in high fat diet induced type 2 diabetic mice', Biochimie, (전자공개) 2013.02.08, 제95권, 제6호, 1239-1244 페이지 전체 문헌 참조.	1-3
A	KR 10-2013-0101515 A (이숍 리서치 디벨롭먼트 컴퍼니 오브 더 히브루 유니버시티 오브 예루살렘, 엘티디.) 2013.09.13 요약; 청구항 1, 22, 26 및 35 참조.	1-3

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2016년 09월 21일 (21.09.2016)	2016년 09월 22일 (22.09.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
이기철
전화번호 +82-42-481-3353

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2016/006859

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2004-0010681 A	2004/01/31	AR 037490 A1	2004/11/17
		AT 375155 T	2007/10/15
		AU 2002-319189 B2	2005/08/18
		BR 0210267 A	2004/07/20
		CA 2448035 A1	2002/12/12
		CA 2448035 C	2009/11/03
		CN 1514726 A	2004/07/21
		CN 1514726 B	2010/10/06
		DE 60222898 T2	2008/07/24
		DK 1399153 T3	2008/01/07
		EP 1399153 A2	2004/03/24
		EP 1399153 B1	2007/10/10
		ES 2292782 T3	2008/03/16
		GT 200200105 A	2003/02/26
		JP 2004-532272 A	2004/10/21
		JP 4558313 B2	2010/10/06
		MX PA03011041 A	2004/03/19
		PA 8546501 A1	2003/01/24
		PE 02622003 A1	2003/03/19
		PT 1399153 E	2007/12/31
		US 2003-0039686 A1	2003/02/27
		US 6730319 B2	2004/05/04
		UY 27320 A1	2003/02/28
		UY 3901 U	2002/07/31
		WO 02-098413 A2	2002/12/12
		WO 02-098413 A3	2003/02/27
		ZA 200309099 B	2005/03/08
KR 10-2012-0064604 A	2012/06/19	CN 103415626 A	2013/11/27
		CN 103415626 B	2016/02/24
		JP 2013-544531 A	2013/12/19
		JP 5933583 B2	2016/06/15
		KR 10-1050436 B1	2011/07/19
		KR 10-2015-0005870 A	2015/01/15
		US 2013-0338034 A1	2013/12/19
		WO 2012-077898 A2	2012/06/14
		WO 2012-077898 A3	2012/07/26
KR 10-2013-0101515 A	2013/09/13	BR 112013004455 A2	2016/06/07
		CA 2808978 A1	2012/03/01
		CN 103221033 A	2013/07/24
		EP 2608771 A1	2013/07/03
		JP 2013-538207 A	2013/10/10
		MX 2013002045 A	2013/10/17
		RU 2013-112807 A	2014/09/27
		US 2013-0157939 A1	2013/06/20
		WO 2012-025921 A1	2012/03/01

(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107921015 A
(43)申请公布日 2018.04.17

(21)申请号 201680045618.7

(22)申请日 2016.06.27

(30)优先权数据
10-2015-0095529 2015.07.03 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.02.02

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2016/006859 2016.06.27

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/007162 KO 2017.01.12

(71)申请人 高丽大学校产学协力团
地址 韩国首尔特别市

(72)发明人 李星浚

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 陈桉

(51)Int.Cl.
A61K 31/20(2006.01)
A61K 31/225(2006.01)
A61K 31/23(2006.01)

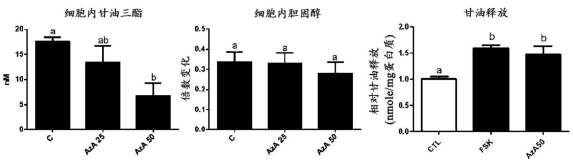
权利要求书1页 说明书16页
序列表1页 附图7页

(54)发明名称

具有脂肪组织甘油三酯降解作用的壬二酸组合物

(57)摘要

本发明涉及含有壬二酸作为活性成分的药物组合物或功能食物，并且更具体地，涉及含有壬二酸作为活性成分的药物组合物和保健功能食物，其具有以下作用：通过来激活Olfr544(其为在脂肪组织的细胞膜中表达的GPCR)，从而通过与嗅觉受体544(Olfr544)(其为在脂肪组织的膜中表达的G蛋白偶联受体(GPCR))结合经cAMP-PKA-HSL信号传导通路促进脂肪组织中甘油三酯的水解和降低甘油三酯的积累。根据本发明的含有壬二酸的组合物，在降低脂肪组织中脂质的积累和改善脂肪组织的脂质代谢方面具有优异的作用，由此可用作食物原料、药物组合物和保健功能食物，其用于改善脂肪组织的脂质代谢(减轻肥胖)诸如体重降低和体脂降低。



CN 107921015 A

1.一种用于预防或治疗肥胖的药物组合物,其含有壬二酸作为活性成分。

2.权利要求1的药物组合物,其中所述壬二酸促进脂肪组织中的甘油三酯水解。

3.一种用于减轻肥胖的保健功能食物,其含有壬二酸作为活性成分。

具有脂肪组织甘油三酯降解作用的壬二酸组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及含有壬二酸作为活性成分的药物组合物或功能食物，并且更具体地，涉及药物组合物或保健功能食物，其含有具有以下作用的壬二酸：通过与嗅觉受体544(Olfr544)(其为在脂肪组织的膜中表达的G蛋白偶联受体(GPCR))结合来激活作为活性成分的Olfr544而促进脂肪组织中的甘油三酯水解和减少甘油三酯通过cAMP-PKA-HSL信号传导通路的积累。

背景技术

[0002] 能量在体内的过多积累会引起多种代谢疾病。肥胖，即由破坏人体能量代谢平衡引起的代表性疾病，导致胰岛素抗性，并导致其他疾病，诸如高血脂、高血压等。已知，为了适当地保持人体能量代谢，调整生活方式是必要的，并且在通过适当的饮食来增加运动量和减少食物摄取的情况下，可能在一定程度上治疗肥胖。

[0003] 引起饮食和生活方式的变化(包括运动)是最重要的，但是在大多数慢性疾病患者中，难以仅通过修改生活方式来治疗肥胖，需要包括使用降脂剂的药物治疗的管理。作为用于治疗肥胖的研究的结果，已经开发并使用了几种药物，但在通过作用于中枢神经系统而抑制食欲的物质例如芬氟拉明(fenfluramine)/芬特明(phentermine)或西布曲明(sibutramine)的情况下，问题在于，由于诸如发展心血管疾病等严重的副作用，商品化药物从市场退出。此外，在奥利司他(orlistat)相当于口服脂肪酶抑制剂的情况下，奥利司他对于不吃高脂肪饮食的韩国人等无效。因此，由于现有药物的功效不高，有必要开发一种新的物质。与此同时，由于有许多人不愿服用药物而且由于服用药物而感到有负担，因此研究能够通过使用安全食物成分或在体内产生的物质而治疗或预防肥胖或慢性疾病的活性成分的需求增加。

[0004] 壬二酸的化学名称是对应于具有9个碳原子的二羧酸的壬二酸，并且壬二酸在ω-氧化过程中形成或在体内作为亚油酸的过氧化物形成。或者，壬二酸也作为天然物质在诸如小麦、大麦、燕麦片、高粱等多种谷物中形成，由此以食物形式摄入(图1)。根据迄今为止进行的研究的结果，已知壬二酸对于炎性皮肤病诸如潮红、痤疮等是有效的，并且已经部分地报道了研究壬二酸对动脉硬化、血糖控制、其抗癌症作用等的作用的内容，但尚未对其详细的机制进行研究，诸如靶蛋白的鉴定等。尚未报道与减少体脂的作用相关的壬二酸的研究，并且没有研究相关的作用机制。

[0005] Olfr544是嗅觉受体(以下称为“Olfr544”)，并且一般地，已知嗅觉受体在嗅觉上皮细胞中表达，用来向大脑传送气味信息。然而，根据最近的报道，已知Olfr544在多种组织以及嗅觉组织中表达。400或更多个嗅觉受体基因存在于人类中，其相当于人类基因组的1-2％，并且并不令人惊奇的是，占据大部分基因组的嗅觉受体执行一般组织细胞所需的功能以及嗅觉信息传输。

[0006] 根据最近的研究的结果，报道了一般组织中嗅觉受体的各种功能。即，报道了研究具有检测精子中的信息素物质的功能的嗅觉受体，参与皮肤角化细胞中的皮肤再生的

OR2AT4,以及在肾脏组织中表达以调节肾素激素分泌的Olfr78等。近来,本发明的发明人报道了在肝脏组织中表达OR1A1以调节肝组织中的甘油三酯代谢(Wu C et al.,Int.J.Biochem.Cell Biol.,64:75-80,2015),并且许多研究人员已经报道了嗅觉受体的新功能。

[0007] 基于此技术背景,本发明的发明人尝试通过有效降低脂肪组织中甘油三酯的含量来开发含有能够改善脂质代谢(减轻肥胖)的壬二酸的植物衍生的物质以降低体脂。结果是,本发明的发明人发现,壬二酸通过作为Olfr544的配体(即在3T3-L1脂肪细胞中异位表达的嗅觉受体)起作用以激活cAMP-PKA-HSL信号传导通路来抑制脂肪组织的脂质积累,从而完成本发明。

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供用于改善脂肪组织中的脂质代谢的组合物(用于减轻肥胖的组合物),其含有具有以下作用的壬二酸:促进脂肪组织中的甘油三酯水解以有效降低体脂的积累。

[0009] 根据本发明的一方面,提供了用于预防或治疗肥胖的药物组合物,其含有壬二酸作为活性成分。

[0010] 根据本发明的另一方面,提供了用于减轻肥胖的保健功能食物,其含有壬二酸作为活性成分。

[0011] 根据本发明的另一方面,提供了通过施用壬二酸来预防肥胖、治疗肥胖或减轻肥胖的方法。

[0012] 根据本发明的另一方面,提供了用于壬二酸在制备用于预防肥胖、治疗肥胖或减轻肥胖的药物中的的用途。

附图说明

[0013] 图1示例说明壬二酸(反式壬二酸)的化学结构、分子式和分子量。

[0014] 图2A至2D示例说明对应于壬二酸的靶分子的Olfr544在3T3-L1脂肪细胞和小鼠脂肪组织中显著表达,其中图2A示例说明通过逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)实验来确认Olfr544的表达的结果,图2B示例说明通过定量实时聚合酶链式反应(qPCR)实验来确认Olfr544的表达的结果,图2C示例说明通过蛋白质印迹(western blot)实验来确认Olfr544的表达的结果,和图2D示例说明通过免疫组织化学实验来确认Olfr544的表达的结果。

[0015] 图3示例说明通过MTT测定来测量3T3-L1脂肪细胞中壬二酸的细胞毒性而获得的结果。

[0016] 图4示例说明在将Olfr544表达载体和CRE-萤光素酶报告基因载体引入到对应于嗅觉受体的表达效率增加的细胞系的Hana3A培养细胞系之后,通过进行报告基因测定而获得的结果,以检测壬二酸作为Olfr544配体的作用(活性)。EC_{50}值意指对应于50%最大功效的激动剂的浓度。

[0017] 图5A至5C示例说明在使用壬二酸(AzA)处理3T3-L1脂肪细胞之后,通过测量cAMP(图5A)、IP-1(IP_3的代谢,图5B)和细胞内钙(图5C)(这些是参与细胞内信号转导的主要第二信使)的浓度而获得的结果。

[0018] 图6示例说明在使用壬二酸(AzA)处理3T3-L1脂肪细胞30分钟时，通过测量蛋白激酶A(PKA)而获得的结果。对照，阴性对照；1μM FSK(福司柯林(forskolin))、阳性对照；50μM AzA(壬二酸)。不同字母通过分析图基检验(Tukey's test)中的方差(ANOVA)来表明统计上的显著差异($p<0.05$)。

[0019] 图7示例说明在使用壬二酸(AzA)处理3T3-L1脂肪细胞2小时时，确证是否存在对应于PKA的靶蛋白的cAMP反应元件结合蛋白(CREB)和激素敏感性脂肪酶(HSL)的磷酸化(磷酸化的程度)的结果。C(对照)，阴性对照；1μMFSK(福司柯林)，阳性对照；50μM AzA(壬二酸)。

[0020] 图8A至图8C示例说明在使用壬二酸(AzA)处理3T3-L1脂肪细胞2小时时，通过测量通过甘油三酯水解释放的细胞内脂质的浓度和甘油的量而获得的结果。图8A示例说明细胞内甘油三酯的浓度，图8B示例说明细胞内胆固醇的浓度，和图8C示例说明从细胞释放的甘油的浓度。C(对照)，阴性对照；1μM FSK(福司柯林)，阳性对照；50μM AzA(壬二酸)。不同字母通过图基检验中的方差(ANOVA)来表明统计上的显著差异($p<0.05$)。

[0021] 图9A和9B示例说明在通过RT-PCR实验(图9A)和蛋白质印迹实验(图9B)使用Olf544shRNA转染3T3-L1脂肪细胞时，通过确认Olfr544基因的抑制表达的作用而获得的结果。

[0022] 图10A至10C示例说明使用壬二酸(AzA)处理敲低Olfr544基因的3T3-L1脂肪细胞2小时时，通过确认细胞内cAMP的浓度(图10A)，PKA活性(图10B)，和是否存在HSL的磷酸化(磷酸化的程度)(图10C)而获得的结果。

[0023] 图11示例说明在使用壬二酸处理敲低Olfr544基因的3T3-L1脂肪细胞2小时时，通过测量由于脂解作用而释放的甘油的量而获得的结果。

[0024] 图12A和12B示例说明在将壬二酸(AzA)以50mg/kg的浓度口服施用给遗传肥胖诱导的ob/ob小鼠6周后，通过确认体重的改变(图12A)和饲料摄取量(图12B)而获得的结果。

[0025] 图13示例说明在将壬二酸(AzA)以50mg/kg的浓度口服施用给遗传肥胖诱导的ob/ob小鼠6周后，通过使用微CT方法测量总脂肪(合计(Total))、腹部脂肪(Adb)和皮下脂肪(SubQ)而获得的结果。

[0026] 图14A至14C示例说明在将壬二酸(AzA)以50mg/kg的浓度口服施用给遗传肥胖诱导的ob/ob小鼠6周后，通过测量血液中甘油三酯的浓度(图14A)、脂联素的浓度(图14B)和胆固醇的浓度(图14C)而获得的结果。

[0027] 图15A至15C示例说明在将壬二酸(AzA)以50mg/kg的浓度口服施用给遗传肥胖诱导的ob/ob小鼠6周后，通过测量肝组织的重量(图15A)和丙氨酸转氨酶(ALT)与天冬氨酸氨基转移酶(AST)的水平(图15B和15C)而获得的结果。

[0028] 图16示例说明在将壬二酸(AzA)以50mg/kg的浓度口服施用给正常小鼠6周后，使用间接热量测定通过测量总能量消耗(EE)、呼吸商(RQ)、脂肪酸氧化作用、O_2的消耗量和CO_2的产生量而获得的结果。

具体实施方式

[0029] 除非本文另有定义，否则本说明书使用的所有科学和技术术语与本发明所属领域的技术专家所理解的那些具有相同的含义。一般地，本说明使用的术语是本领域公知和通

用的。

[0030] 在本发明中，确认了在使用壬二酸处理3T3-L1脂肪细胞时，壬二酸通过激活嗅觉受体Olfr544而具有甘油三酯水解促进作用和甘油三酯积累减少作用。更具体地，为了评价壬二酸的脂肪甘油三酯积累抑制作用，分析使用壬二酸处理的3T3-L1脂肪细胞中甘油三酯的含量和对应于甘油三酯水解的产物的甘油的释放量，由此评价3T3-L1脂肪细胞中的甘油三酯水解作用。此外，在本发明中，通过确认在表达Olfr544的3T3-L1脂肪细胞和Hana3A细胞系中壬二酸作为Olfr544激动剂的特征，鉴定了壬二酸在c-AMP-PKA-HSL信号传导通路中通过Olfr544的甘油三酯水解作用的机制。

[0031] 在本发明中，作为向对应于遗传肥胖诱导的小鼠的ob/ob小鼠口服施用对应于Olfr544激动剂的壬二酸6周的结果，确认了体脂降低，这是从在生物代谢率实验中脂质氧化的增加得到的结果。

[0032] 壬二酸是在人体中天然形成的或是存在于谷物诸如人类主要作为食物食用的大麦、燕麦、黑麦等中的食物成分。根据研究的报道的结果，在人体中壬二酸的浓度是约10至50μM，并且广泛已知，一般地，壬二酸可安全摄入。此外，在MTT毒性测试中，甚至在以高达500μM的浓度使用壬二酸处理3T3-L1脂肪细胞的情况下，确认了没有表现出毒性。

[0033] 因此，本发明涉及用于治疗肥胖的药物组合物，其含有壬二酸作为活性成分。

[0034] 在另一方面，本发明涉及通过向受试者施用壬二酸来预防肥胖、治疗肥胖或减轻肥胖的方法。

[0035] 在另一方面，本发明涉及壬二酸在制备用于预防肥胖、治疗肥胖或减轻肥胖的药物中的用途。

[0036] 在本发明中，肥胖的治疗可意指在脂肪组织中甘油三酯的降低、在脂肪组织中脂质积累的抑制、体重的降低或体脂的降低。壬二酸可增加嗅觉受体(OR)的活性，其中嗅觉受体可以是嗅觉受体544(Olfr544)。此外，壬二酸可促进脂肪组织中的甘油三酯水解。

[0037] 已知在脂肪细胞中脂肪(或脂质)和过多能量的积累可导致肥胖，而且是糖尿病、高血脂、脂肪肝、动脉硬化、高血压和心血管疾病(它们是多种脂质相关的代谢疾病)或代谢综合征(其中上述疾病同时且多次发生)等的主要原因。代谢综合征表示其中同时出现危险因素(诸如高血脂、高血压、葡萄糖代谢障碍和肥胖)的综合征。近来，此综合征通过由世界卫生组织和国家卫生研究院(NIH)的国家心肺和血液研究所(NHLBI)制定的成人治疗计划III(ATP III)正式命名为代谢综合征或胰岛素抗性综合征。

[0038] 本文所使用的术语“脂肪肝”意指脂肪在肝细胞中过度积累的状态，由于肝脏中的脂肪代谢障碍，这导致多种疾病，诸如心绞痛、心肌梗塞、中风、动脉硬化、脂肪肝、胰腺炎等。

[0039] 在本发明中，可使用通过液汁提取、热水提取、超声提取、溶剂提取、回流提取而获得的壬二酸，其中可使用乙醇、甲醇、丙酮、己烷、乙酸乙酯、二氯甲烷、水或它们的混合物进行溶剂提取，可通过多种通常用来制备天然壬二酸的方法来提取壬二酸。

[0040] 本文所使用的术语“壬二酸(azelaic acid)”可与对应于同义词的壬二酸(nonanedioic acid)互换使用。

[0041] 因为根据本发明的壬二酸是天然物质，壬二酸不具有毒性，从而大量壬二酸可持续用作药物。

[0042] 根据本发明的含有壬二酸的组合物可连同药物(诸如抗组胺剂、镇痛剂、抗癌剂、抗生素等)一起配制或与其组合配制。

[0043] 除非另有说明,否则本文所使用的术语“治疗”意指该术语适用的疾病,逆转或减轻疾病的一个或多个症状,或抑制或阻止疾病的进展。当如上所述定义术语“治疗”时,本文所使用的术语“治疗”意指治疗行为。

[0044] 术语“药物组合物”或“医药组合物”意指根据本发明的含有壬二酸的化合物和其他化学成分诸如稀释剂或载体的混合物。

[0045] 将术语“生理学上可接受的”定义为不损害化合物的生物活性或物理性能的载体或稀释剂。

[0046] 将术语“载体(carrier)”或“媒介物(vehicle)”定义为允许将目标化合物容易地引入到细胞或组织中的化合物。例如,二甲亚砜(DMSO)是通常用来允许将多种有机化合物容易地引入到活的有机体的细胞或组织中的载体。

[0047] 将术语“稀释剂”定义为稳定目标化合物的生物学活性形式并在溶解该化合物的水中稀释的化合物。将溶解在缓冲溶液中的盐用作本领域中的稀释剂。通常使用的缓冲溶液是磷酸盐缓冲盐水。原因是磷酸盐缓冲盐水是体液的人造盐形式。因为缓冲溶液可将溶液的pH控制在低浓度,很少见缓冲稀释剂改变化合物的生物活性。

[0048] 用于本说明书的每个含有壬二酸的化合物可照原样向人类患者施用,或者作为药物组合物施用,其中化合物如在联合治疗中与其他活性成分或者合适的载体或赋形剂混合。

[0049] 适合用于本发明的医药组合物或药物组合物包括以足够实现所需目的的量包含活性成分的组合物。更具体地,治疗有效量意指对延长被治疗对象的存活,预防、减少或减轻疾病的症状有效的化合物的量。具体地,鉴于本文提供的公开的详细内容,可通过本领域技术人员确定治疗有效量。

[0050] 根据本发明的含有壬二酸的化合物的治疗有效量最初可从细胞培养分析测量。例如,可在动物模型中计算剂量以获得循环浓度范围,其包括在细胞培养中确定的半数最大抑制浓度(IC_{50})或半数最大有效浓度(EC_{50})。此信息可用来更精确地确定在人类中使用的剂量。

[0051] 壬二酸的施用剂量可根据采用的施用制剂和使用的施用途径在上述范围内变化。考虑到患者的状态,可通过个人医生选择精确计算、施用途径和施用剂量(例如,见Fingl et al.,1975,"The Pharmacological Basis of Therapeutics",Ch.1,p.1)。

[0052] 根据本发明的壬二酸的优选施用剂量可根据患者的状态和体重、疾病的程度、药物制剂以及施用途径和施用持续的时间改变,但是由本领域技术人员适当选择。一般地,基于患者的体重,向患者施用的组合物的剂量范围可为约0.5至1000mg/kg。然而,为了获得更好的效果,根据本发明的壬二酸可以0.0001至200mg/kg,优选0.001至100mg/kg的日剂量施用。一剂可以一天施用一次,或分为几剂然后施用。因此,本发明的范围不局限于施用剂量。

[0053] 根据本发明的壬二酸可通过多种途径向哺乳动物诸如大鼠、小鼠、家畜、人等施用。所有施用方法是可预期的。例如,可口服施用或通过直肠注射、静脉内注射、肌内注射、皮下注射、子宫内膜注射或脑室内注射施用壬二酸。

[0054] 在根据本发明的组合物作为混合物(其含有除壬二酸之外向其中添加的另外的成

分)提供的情况下,基于组合物的总重量,组合物可以0.001wt%至99.9wt%,优选0.1wt%至99wt%,并且更优选1wt%至50wt%的含量含有壬二酸。

[0055] 根据本发明的组合物的药物施用形式可以是其药学上可接受的盐的形式。此外,可单独使用组合物,或者还可使用化合物与另外的药物活性化合物的合适的集合以及组合。

[0056] 术语"药学上可接受的盐"意指化合物的形式,所述化合物在施用该化合物的生物体中不导致严重刺激并且不破坏该化合物的生物学活性和物理性质。术语"水合物"、"溶剂化物"和"异构体"与上述具有相同的含义。可通过使根据本发明的含有壬二酸的化合物与无机酸,诸如盐酸、溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等;磺酸,诸如甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸等;和有机碳酸,诸如酒石酸、甲酸、柠檬酸、乙酸、三氯乙酸、三氟乙酸、癸酸、异丁酸、丙二酸、琥珀酸、邻苯二甲酸、葡糖酸、苯甲酸、乳酸、富马酸、马来酸、水杨酸等反应而获得药学上可接受的盐。此外,可通过使根据本发明的含有壬二酸的化合物与碱反应形成碱金属盐诸如铵盐、钠盐、钾盐等,碱土金属盐诸如钙盐、镁盐等,有机碱的盐诸如二环己胺、N-甲基-D-葡糖胺、三(羟甲基)甲胺等,以及氨基酸诸如精氨酸、赖氨酸等的盐而获得药学上可接受的盐。

[0057] 可通过一般方法分别以口服施用的形式诸如粉末、颗粒、片剂、胶囊、悬浮液、乳剂、糖浆、气雾剂等,外部施用、栓剂和无菌溶液的形式配制根据本发明的含有壬二酸的药物组合物或医药组合物。能够包含在含有壬二酸的组合物中的载体、赋形剂和稀释剂的实例可包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶、藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油。

[0058] 在配制药物组合物的情况下,可使用通常使用的稀释剂或赋形剂,诸如填充剂、增量剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂、表面活性剂等。用于口服施用的固体制剂包括片剂、丸剂、粉末、颗粒、胶囊等,且可通过将壬二酸与至少一种赋形剂混合来制备,例如淀粉、碳酸钙、蔗糖或乳糖、明胶等。此外,除了简单的赋形剂之外,可使用润滑剂诸如硬脂酸镁或滑石。用于口服施用的液体制剂包括悬浮液、溶液、乳剂、糖浆等,而且这些液体制剂可含有多种赋形剂,诸如润湿剂、甜味剂、调味剂、防腐剂等,以及水和液体石蜡,即通常使用的简单的稀释剂。用于肠胃外施用的制剂包括无菌水溶液、非水溶剂、悬浮液、乳剂、冻干制剂和栓剂。在非水溶剂或悬浮液中,可使用丙二醇、聚乙二醇、植物油诸如橄榄油、可注射的酯诸如油酸乙酯等。作为栓剂的基质,可使用witepsol、macrogol(聚乙二醇)、吐温60(tween 60)、可可脂、月桂酸、甘油-明胶等。

[0059] 嗅觉受体是占G蛋白偶联受体(GPCR)蛋白质超家族的最大部分的蛋白质组,而且一般地,其在膜中的表达量不大。因此,本发明的发明人尝试通过RT-PCR、qPCR、蛋白质印迹和免疫组织化学实验最终确认在脂肪组织(或3T3-L1脂肪细胞)中在先前的微阵列研究中是否存在嗅觉受体Olfr544的表达(表达的程度)。

[0060] 在本发明的实施例中,确认了Olfr544基因和蛋白质在小鼠的脂肪组织和3T3-L1脂肪细胞中的表达。结果是,确认了,在RT-PCR和qPCR实验中,Olfr544基因(在RNA水平)在脂肪组织和3T3-L1脂肪细胞中显著表达,如图2A和2B所示。具体地,在这两个实验中,观察到Olfr544的表达水平在脂肪组织中比在3T3-L1脂肪细胞中高。

[0061] 与此同时,如图2C所示,在蛋白质印迹实验中,在3T3-L1脂肪细胞的胞质溶胶中没

有检测到Olfr544蛋白，但在膜蛋白级分中以高水平表达。此外，如图2D所示，作为进行免疫组织化学实验的结果，Olfr544蛋白在膜中显著表达，同时与3T3-L1脂肪细胞的膜中的膜标志物共定位。

[0062] 在本发明的另一个实施例中，进行MTT测定以评价壬二酸的细胞毒性。结果是，据确认，即使在用高浓度壬二酸(500μM)处理3T3-L1脂肪细胞的情况下，也没有观察到细胞毒性，如图3所示。

[0063] 在本发明的另一个实施例中，评价壬二酸作为Olfr544配体的作用。因此，观察到，在使用cAMP反应元件(CRE)-荧光素酶报道基因测定的情况下，壬二酸浓度依赖性地增加了1至1000μM的浓度范围内的Olfr544活性，如图4所示。此外，EC_{50}值为29.71μM，从而在此浓度活化约50％的Olfr544。

[0064] 在本发明的另一个实施例中，为了通过激活Olfr544来鉴定壬二酸是否参与信号转导，确认了使用壬二酸处理的3T3-L1脂肪细胞中第二信使的浓度的变化。结果是，确认了，在用壬二酸处理的3T3-L1脂肪细胞中，只有cAMP的浓度与壬二酸的浓度成比例地特异性且依赖性地增加，如图5A至5C所示。

[0065] 在本发明的另一个实施例中，确认了，壬二酸特异性地增加了脂肪组织中的cAMP的浓度，而且对磷酸肌醇和钙的浓度没有影响。

[0066] 与此同时，已知脂肪细胞中cAMP的增加增加了CREB活性并刺激PKA活性以诱导脂解。

[0067] 在本发明的另一个实施例中，为了确认蛋白激酶A(PKA)信号传导通路，即对应于第二信使的cAMP的亚通路，评价壬二酸的PKA活性调节作用。结果是，壬二酸显著增加3T3-L1脂肪细胞中的PKA活性，如图6所示。确认了，在使用壬二酸(50μM)处理3T3-L1脂肪细胞2小时时，与对照相比，PKA活性增加了113.8％。因此，由于因壬二酸处理引起的脂肪细胞的增加，PKA活性增加。

[0068] 在本发明的另一个实施例中，确认了因壬二酸引起的cAMP应答元件结合蛋白(CREB)和激素敏感性脂肪酶(HSL)蛋白质的磷酸化的变化。结果是，在使用壬二酸(50μM)处理脂肪细胞2小时的情况下，与对照(C)相比，CREB和HSL的磷酸化迅速增加，如图7所示。3T3-L1脂肪细胞中cAMP的浓度的增加刺激PKA活性，以增加HSL的磷酸化，并且因HSL的磷酸化引起的HSL的活化促进储存在脂滴中的甘油三酯的水解。因此，此结果表明壬二酸具有水解脂肪细胞的甘油三酯的作用。

[0069] 结果是，当对应于嗅觉受体的Olfr544在脂肪组织(或脂肪细胞)中被对应于配体的壬二酸激活时，PKA蛋白由对应于第二信使的cAMP的浓度的增加激活，并且对应于PKA蛋白质的主要靶标的CREB和HSL被磷酸化，由此被激活。因此，确认了，因壬二酸处理引起的Olfr544的活化激活细胞内cAMP-CREB信号传导通路。

[0070] 在本发明的另一个实施例中，为了确认壬二酸具有激活cAMP-PKA-HSL信号传导通路以促进3T3-L1脂肪细胞中的甘油三酯水解的作用，测量了脂肪细胞中甘油三酯和胆固醇的浓度，并且测量了对应于甘油三酯水解的产物的甘油的释放量。因此，在用壬二酸(50μM)处理3T3-L1脂肪细胞2小时时，细胞中的甘油三酯减少了61.5％($P<0.05$)，并且对应于甘油三酯水解的产物的甘油增加了46.7％，如图8A至8C所示。这意味着壬二酸具有促进脂肪组织中的甘油三酯水解以抑制甘油三酯积累的作用。

[0071] 在本发明的另一个实施例中，使用Olfr544shRNA再次确认Olfr544在壬二酸的脂解调节作用中的作用。更具体地，通过将Olfr544shRNA转染到对应于小鼠脂肪细胞的3T3-L1细胞中来抑制Olfr544基因的表达(图9A至9C)；在使用壬二酸处理其中Olfr544的表达被抑制的细胞时，cAMP-PKA-HSL信号传导通路失活(图10A至10C)，而且没有观察到由于因壬二酸处理引起的血液中的甘油三酯水解而造成的甘油的释放浓度的变化(图11)，从而确认了壬二酸的脂解取决于Olfr544。

[0072] 与此同时，在本发明的另一个实施例中，向肥胖诱导的小鼠动物模型口服施用壬二酸，并且确认多种肥胖相关的指标。观察到，与对照组相比，在施用了壬二酸的肥胖小鼠组中，食物摄入量没有变化，但体重的增加显著降低(图12)，而且与对照组相比，总脂肪、皮下脂肪和腹部脂肪显著降低(图13)。此外，作为分析血液指标的结果，确认了通过施用壬二酸，显著降低血液胆固醇的浓度(图14)，但在喂食高脂饮食的ob/ob小鼠中，肝脏组织的重量由于脂肪肝的生成而增加，但通过施用壬二酸，肝脏组织的重量减少，并且没有表现出诸如肝毒性等的副作用(图15)。

[0073] 最终，作为根据正常小鼠中的壬二酸的施用分析能量代谢的结果，在壬二酸施用组中，总能量消耗(EE)没有变化，但呼吸商(RQ)降低，并且与对照相比，脂肪酸氧化是增加的。此外，与对照组相比，O_2的消耗量没有很大的差异，但CO_2的产生量显著增加(图16)。

[0074] 总之，实施例的结果显示，因壬二酸处理引起的脂肪组织(或脂肪细胞)中的甘油三酯水解促进作用和脂质积累抑制作用是由起Olfr544配体作用的壬二酸激活细胞内cAMP-PKA-HSL信号传导通路产生的。即，壬二酸起在脂肪细胞的膜中表达的嗅觉受体Olfr544的激动剂的作用，以特异性地增加细胞内cAMP的浓度，由此增加PKA活性和CREB和HSL的磷酸化以促进脂质水解并诱导甘油三酯水解。因此，壬二酸具有降低脂肪组织中甘油三酯的积累以减轻肥胖和代谢综合征的作用。

[0075] 根据本发明的含有壬二酸的化合物或其药学上可接受的盐，在制备多种功能食物和保健功能食物时，可用作食物的主要成分或者添加剂或佐剂。

[0076] 因此，本发明涉及用于减轻肥胖的保健功能食物，其含有壬二酸作为活性成分。

[0077] 在本发明中，肥胖减轻的特征可在于脂肪组织中的甘油三酯的减少，脂肪组织中的脂质积累的抑制，体重的减轻或体脂的减少。

[0078] 在本发明中，术语“功能食物”意指将壬二酸添加到一般食物中以改善一般食物的功能性而获得的食物。功能性可由物理性质和生理功能性来表示，并且在将根据本发明的壬二酸添加到一般食物的情况下，可改善一般食物的物理性质和生理功能性。在本发明中，如上所述具有改善的功能的食物被综合地定义为“功能食物”。

[0079] 根据本发明的功能食物可以多种方式用于药物、食物、饮料等中，以减少体脂的积累。根据本发明的功能食物的实例可包括食品、糖果、巧克力、饮料、口香糖、茶、维生素复合物、保健补充食品等，而且功能食物可以粉末、颗粒、片剂、胶囊或饮料的形式使用。

[0080] 可将根据本发明的组合物添加到食物或饮料中以促进脂肪组织中的脂解。在这种情况下，食物或饮料中的组合物的含量如下。一般地，基于食物的总重量，根据本发明的保健功能食物组合物的含量可为0.01～50wt％，优选为0.1～20wt％，并且基于100ml的饮料，根据本发明的保健饮料组合物的含量可为0.02至10g，优选为0.3至1g，但是该含量不限于此。

[0081] 对根据本发明的保健饮料组合物的液体成分没有特别的限制，只要该保健饮料组合物以所述比例含有根据本发明的组合物作为必要成分，而且该保健饮料组合物可进一步含有多种调味剂，天然碳水化合物等作为附加成分，类似于普通饮料。天然碳水化合物的实例包括一般的糖，例如，单糖诸如葡萄糖、果糖等，二糖诸如麦芽糖、蔗糖等，和多糖诸如一般的糖(诸如糊精、环糊精)等，和糖醇诸如木糖醇、山梨糖醇、赤藓糖醇等。除了上述成分之外，可有利地使用天然调味剂(索马甜、甜叶菊提取物(例如莱鲍迪苷A(rebaudioside A)、甘草甜素等)和合成调味剂(糖精、阿斯巴甜等(aspartame))作为调味剂。基于100ml的组合物，根据本发明的组合物中天然碳水化合物的比例为约1至20g，并且优选为约5至12g。

[0082] 除了如上所述的附加成分之外，根据本发明的组合物可含有多种营养素、维生素、矿物质(电解质)、调味剂诸如合成调味剂和天然调味剂、着色剂和改善剂(奶酪、巧克力等)、果胶酸及其盐、海藻酸及其盐、有机酸、保护性胶体增稠剂、pH调节剂、稳定剂、防腐剂、甘油、醇、用于碳酸饮料中的碳酸化剂等。此外，根据本发明的组合物可含有用于制备天然果汁、果汁饮料和蔬菜饮料的果肉。这些成分可独立使用或组合使用。尽管这些添加剂的含量不特别重要，基于100重量份的根据本发明的组合物，通常在0.01至20重量份的范围选择。

[0083] 以下，会通过实施例详细描述本发明。然而，这些实施例仅用作说明本发明，并且本领域的技术人员会理解这些实施例不应被解释为限制本发明的范围。

[0084] 实施例1:分析Olfr544基因和对应于壬二酸的分子靶标的蛋白

[0085] 为了确认对应于脂肪细胞中的壬二酸的分子靶标的嗅觉受体Olfr544(以下称为Olfr544)蛋白的表达，进行用于测量基因和蛋白质的表达的实验(图2)。使用RT-PCR和定量实时(qPCR)实验分别确认小鼠的脂肪组织以及分化和培养的3T3-L1脂肪细胞中的Olfr544基因的表达，并通过蛋白质印迹和免疫组织化学实验确认Olfr544蛋白在细胞中的表达。

[0086] 1-1:细胞培养

[0087] 从韩国细胞系库(Korean Cell Line Bank)获得通过分化3T3-L1前脂肪细胞(KCLB号10092.1)获得的用于实施例1至7中的脂肪细胞，并且当细胞在37℃在5％CO_2条件下在含有10％胎牛血清(FCS)的达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium)(DMEM)中以50％的汇合度(confluency)(增殖的程度)生长时，传代培养并维持这些细胞(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)。

[0088] 1-2:细胞分化

[0089] 3T3-L1前脂肪细胞的分化过程如下。首先，将$1x10^6$个3T3-L1前脂肪细胞接种于6孔板的各孔中并培养，以具有100％的汇合度。2天后，将培养的3T3-L1前脂肪细胞在含有10％胎牛血清(FBS)和MDI溶液(0.5mM IBMX,0.5μM地塞米松和10μg/mL胰岛素)的DMEM培养基中处理3天。然后，将处理的细胞在含有10％FBS和10μg/mL胰岛素的DMEM中培养，确认细胞中是否存在脂质小滴(程度)，并且基于确认结果，使脂肪细胞分化(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)。

[0090] 结果是，确认了，约至少80％的3T3-L1前脂肪细胞通过总共12天的分化过程分化

成脂肪细胞(数据未示出)。

[0091] 1-3:Olfr544基因的表达

[0092] 为了确认Olfr544基因的RNA表达,进行RT-PCR和qRT-PCR。

[0093] (1)cDNA的合成

[0094] 首先,使用本领域技术人员已知的方法通过实施例1-1和1-2中的方法从分化的3T3-L1脂肪细胞提取RNA,并使用提取的RNA和ReverTra Ace® qPCRRT试剂盒(TOYOBO,Osaka,Japan)合成cDNA。更具体地,为了改善RT-PCR反应的效率,将提取的RNA在65℃处理5分钟,然后直接储存在冰中。此后,使用含gDNA去除剂、0.5μg的RNA和蒸馏水(无核酸酶的水)的2μl的4x DNAMaster Mix制备总共8μl的反应物,并在37℃反应5分钟。然后,将5×RT Mastermix添加到反应产物中,而且将反应在37℃进行5分钟,在50℃进行5分钟,和在98℃进行5分钟,由此合成cDNA。

[0095] (2)PCR

[0096] 使用表1所示的引物通过本领域技术人员已知的方法,对由(1)中的方法合成的cDNA进行聚合酶链式反应(PCR)。然后,将获得的PCR产物在琼脂糖凝胶上电泳,并通过条带确认Olfr544基因的RNA是否表达。这里,作为对照,使用3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH,本领域技术人员通常已知的序列)。

[0097] 下表1示出了Olfr544引物序列。

[0098] [表1]

[0099]

名称	类型	序列(5'->3')	Seq.NO
mOlfr544_F	有义	GGG GAC ATC TCG CTG AAT AA	1
mOlfr544_R	反义	ATG AGG ACA TGG TGG AGG AG	2

[0100] (3)qPCR(定量实时PCR)

[0101] 使用(1)中的方法合成的cDNA、表1中所示的引物和Thunderbird Sybr qPCR Mix(TOYOBO,Osaka,Japan)和iQ5iCycler系统(Bio-Rad,California,U.S.),通过本领域技术人员已知的方法进行qPCR。更具体地,在95℃进行变性过程4分钟30秒,在相同温度进行40个循环的变性过程10秒,在55℃-60℃进行退火过程30秒,然后,在68℃进行延伸过程20秒。使用GAPDH的表达将每个基因的表达的程度标准化。使用国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)(NCBI)的核苷酸blast软件设计引物,并从Bionics(Seoul,Korea)购买。

[0102] 结果是,确认了,在RT-PCR和qPCR实验中,Olfr544基因(在RNA水平)在小鼠的脂肪组织中和3T3-L1脂肪细胞中显著表达,如图2A和2B所示。具体地,在这两个实验中,观察到Olfr544的表达水平在脂肪组织中比在3T3-L1脂肪细胞中高。

[0103] 1-4:Olfr544蛋白的表达

[0104] 为了确认对应于Olfr544基因的最终产物的蛋白质的表达,进行蛋白质电泳(十二烷基硫酸钠-丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE))、蛋白质印迹和免疫组织化学实验。

[0105] (1)蛋白提取

[0106] 通过实施例1-1和1-2中的方法从分化的3T3-L1脂肪细胞中提取蛋白质。

[0107] 在获得膜蛋白级分的情况下,使用磷酸盐缓冲盐水(PBS)冲洗3T3-L1脂肪细胞(或

脂肪组织)以仅收集细胞(或组织)沉淀并使用C溶液(120mM NaCl,5mM KCl,1.6mM $MgSO_4$,25mM $NaHCO_3$,7.5mM D-葡萄糖,pH 7.4)洗涤,然后向其中添加溶液D(溶液C+10mM $CaCl_2$)并搅拌20分钟,然后离心。将通过使离心分离后得到的上清液再次进行离心分离而得到的沉淀溶解于TEM缓冲溶液(10mM Tris,3mM $MgCl_2$,2mM EDTA,pH 8.0)和甘油,由此最终得到膜蛋白级分。已知如上所述的蛋白提取方法为钙离子休克方法,其中蛋白质产率高于对应于现有膜分级分离方法的机械搅拌方法。

[0108] 与此同时,在获得胞质溶胶蛋白级分的情况下,使用PBS冲洗3T3-L1脂肪细胞(或脂肪组织),以仅收集沉淀,向其中添加含有洋地黄皂苷(digitonin)的缓冲溶液(150mM NaCl,50mM HEPES,25μg/ml洋地黄皂苷,pH 7.4),并且允许所得物在冰上静置10分钟,然后离心分离,由此最终得到上清液作为胞质溶胶蛋白级分。

[0109] 与此同时,在得到全蛋白提取物而无需分级分离过程的情况下,向3T3-L1脂肪细胞添加细胞裂解缓冲溶液(50mM Tris,1%Triton-X 100,1mM EDTA,蛋白酶抑制剂(PI)),进行细胞裂解,然后以13,000rpm和在4℃离心分离20分钟,由此获得上清液。

[0110] (2)蛋白质电泳(SDS-PAGE)和蛋白质印记

[0111] 为了确认Olfr544蛋白质是否表达,用(1)的方法提取的蛋白质级分(膜蛋白质、胞质溶胶蛋白质和全蛋白质提取物)通过Bradford方法定量。使用变性的蛋白质进行12%SDS-PAGE,所述变性的蛋白质通过从各测试样品中提取约40μg的蛋白质,并根据提取的蛋白质的类型(分级分离的蛋白质、全蛋白质或磷酸化的蛋白质等)适当加热和/或溶解提取的蛋白质而获得。

[0112] 在进行蛋白质印迹实验时,为了防止与含有从SDS-PAGE凝胶印迹的蛋白质的硝化纤维素(NC)膜的非特异性结合,封闭后,将蛋白质使用被检测蛋白质的第一抗体(抗Olfr544兔抗体(Abcam,U.K.))、抗-β-肌动蛋白抗体(加样对照)(Santa Cruz,California,U.S.)和第二抗体(HRP-缀合的抗兔IgG,Santa Cruz,California,U.S.)顺序处理,并在室温分别处理1小时。然后,为了含量比较,通过软件程序(Gel-Pro Analyzer 4.0)进行定量和数字化蛋白质印迹实验中的蛋白质条带的含量。

[0113] (3)免疫组织化学

[0114] 为了通过免疫组织化学确认Olfr544的细胞内表达的程度和表达位置,将培养的细胞以1x 10^5个细胞/孔的浓度接种在6孔板中并且附着并稳定24小时后,使用Lipofectamine 2000(Invitrogen,California,U.S.)将lucy-flag-Olfr544表达载体转染到3T3-L1脂肪细胞中。然后,使用PBS洗涤细胞,并使用4%多聚甲醛处理20分钟,由此固定转染有lucy-flag-Olfr544表达载体的3T3-L1脂肪细胞,并且Olfr544蛋白质、膜和细胞核使用各自的染料(i、ii、iii)染色,如下所述。

[0115] i)为了染色Olfr544蛋白,在3T3-L1脂肪细胞与抗-flag第一抗体(Sigma,U.S.)或抗-Olfr544抗体(Abcam,Cambridge,U.K.)在室温反应1小时并使用PBS洗涤3次,向其中添加使用绿色荧光标记的抗兔IgG第二抗体,并且使用箔片遮光,然后处理1小时。

[0116] ii)为了染色膜,在37℃使用荧光标记的CellMask™橙色质膜染色(Invitrogen,California,U.S.)处理膜10分钟,由此使膜染色。

[0117] iii)为了染色细胞核,在使用4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)溶液(Sigma,U.S.)处理细胞核由此使其染色之后,盖上载玻片以气密地密封染色的核。

[0118] 使用共焦荧光显微镜(LSM700,Carl Zeiss)拍摄如上所述的最终染色的3T3-L1脂肪细胞。

[0119] 结果是,如图2C所示,在蛋白质印迹实验中,在3T3-L1脂肪细胞的胞质溶胶中未检测到Olfr544蛋白,但在膜蛋白级分中以高水平表达。此外,如图2D所示,作为进行免疫组织化学实验的结果,Olfr544蛋白在膜中显著表达,同时与3T3-L1脂肪细胞的膜中的膜标志物共定位。

[0120] 实施例2:评价壬二酸的细胞毒性

[0121] 为了评价壬二酸的细胞毒性,进行MTT测定。

[0122] MTT测定是一种使用线粒体将MTT四唑(一种黄色水溶性底物)还原成蓝紫色水不溶性MTT甲臜(3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基-四唑鎓溴化物)的能力的测试方法。通过2至5mg/ml的浓度在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中稀释$C_{18}H_{16}BrN_5S$(噻唑蓝四唑鎓溴化物)来制备MTT试剂。

[0123] 首先将3T3-L1脂肪细胞(4×10^5个/ml)接种于96孔培养板中,并在37℃,在5%CO_2条件下培养24小时后,将培养的3T3-L1脂肪细胞使用浓度范围为0-500μM的壬二酸处理并培养24小时。在向各测试样品中添加100μL浓度为4mg/mL的MTT试剂,并在37℃在5%CO_2条件下培养4小时后,向其中添加100μL的二甲基亚砜(DMSO),并在540nm测量吸光度。吸光度值是使用吸光度与活细胞数成比例的原理来定量由毒性引起的细胞凋亡作用。

[0124] 结果是,确认了,即使在使用高浓度壬二酸(500μM)处理3T3-L1脂肪细胞的情况下,也没有观察到细胞毒性,如图3所示。因此,可以理解的是,包含在诸如大麦、燕麦等的谷物中并在人体的代谢过程中形成由此以约10-50μM的浓度范围存在的各种可摄取植物中所含的壬二酸为可安全摄取的物质。

[0125] 实施例3:评价壬二酸作为Olfr544配体的作用

[0126] 为了评价壬二酸作为Olfr544配体体外测定的活性,进行报告基因测定。一般地,组织细胞中嗅觉受体(OR)的基因表达的程度低,而且蛋白质表达的程度也低,因此对嗅觉受体的研究是困难的。为了解决这个问题,Hana3A细胞系由杜克大学Hiroaki Matsunami教授领导的团队提供,并用于实验(Zhuang H.,et al.,Nat.Protocol,3:1402-1413,2008)。Hana3A细胞系,是通过转化HEK293T细胞系以共表达在OR蛋白的膜表达中必需的辅因子,即受体-转运蛋白1S(RTP1S)和RIC8鸟嘌呤核苷酸交换因子B(Ric8b)而获得的稳定细胞系,是显著改善(优化)OR蛋白的膜表达的细胞系。

[0127] 报告基因测定如下进行。首先,将Olfr544表达载体和cAMP反应元件(CRE)-荧光素酶报告基因载体转染到Hana3A细胞系后,使用壬二酸处理转染的Hana3A细胞18小时。然后,使用萤火虫萤光素酶(FL)测定试剂盒测量萤光素酶活性,并且基于测量的萤光素酶活性绘制剂量响应曲线(DRC),由此计算对应于确定作为配体的作用的指标的50%有效浓度(EC_{50})。

[0128] 结果是,观察到在使用cAMP反应元件(CRE)-荧光素酶报告基因测定的情况下,壬二酸浓度依赖性地增加了1-1000μM浓度范围内的Olfr544活性,如图4所示。此外,EC_{50}值为29.71μM,从而在此浓度激活Olfr544的约50%。壬二酸在体内是天然形成的,并且一般地,已经在几十至几百微摩尔(μM)水平多方面报道了壬二酸的血液浓度,从而测量的EC_{50}值表明壬二酸可激活体内的Olfr544而无毒性。

[0129] 因此，基于在图4中确认的壬二酸就对应于壬二酸的靶蛋白的Olfr544而言的EC_{50}值(29.71μM)，和对应于用于代谢疾病的药物的Actos®(吡格列酮(pioglitazone)，PPAR-γ激动剂，EC_{50}＝0.5μM，人类施用剂量:15～30mg/天)和Xenical®(奥利司他(orlistat)，胰脂肪酶抑制剂，EC_{50}＝0.24μM，人类施用剂量:120mg/天)的EC_{50}值，计算壬二酸的有效施用剂量，壬二酸的有效施用剂量约为900-1800mg/天。这是能够作为每日摄取量使用的剂量，而且考虑到在体内形成的壬二酸的量和从一般食物摄取的壬二酸的量，实际上，壬二酸的有效摄取量可进一步减少。

[0130] 实施例4:分析在使用壬二酸处理的3T3-L1脂肪细胞中第二信使的浓度的变化

[0131] 本发明的发明人尝试确认壬二酸是否激活对应于G蛋白偶联受体(GPCR)的Olfr544并参与与甘油三酯水解相关的信号转导。

[0132] 已知GPCR通过配体结合激活G蛋白，由此使用第二信使调节细胞内信号转导。根据G蛋白的种类，使用cAMP、IP_3和/或钙作为第二信使。

[0133] 因此，测量了在3T3-L1脂肪细胞中cAMP、IP-1(IP_3的代谢物)和钙(它们是对应于Olfr544配体的壬二酸的第二信使)的浓度的变化。由于IP_3具有低稳定性由此容易地分解成IP-1，所以定量细胞内IP-1(IP_3的代谢物)的量而不是IP_3。

[0134] cAMP测定使用的原理是使用cAMP标准校准曲线来估计对应于由配体激活的GPCR受体的第二信使的cAMP的产生量。包括在cAMP测定ELISA试剂盒(Enzo Life science,New York,U.S.)中的96孔板使用GxR IgG抗体包被，并且在用于获得标准校准曲线的蓝色溶液的cAMP与碱性磷酸酶结合之后，蓝色溶液的颜色通过兔抗体变为黄色。当通过向与cAMP结合的孔中添加pNpp底物来激活碱性磷酸酶时，发生颜色变化，从而可使用比色分析在405nm的波长处测量cAMP的浓度。在本实验中，将$1x10^4$个3T3-L1脂肪细胞接种在96孔板的每个孔中并分化，然后使用对应于阳性对照的50μM壬二酸和1μM福斯柯林(Foskolin)处理18小时。然后，通过上述方法测量cAMP的浓度。

[0135] IP-1测定是测量GPCR信号转导过程中对应于由磷脂酶的磷脂酶解形成的第二信使的IP_3浓度以测量调节蛋白激酶C(PKC)信号转导的能力的方法。在本实验中，将$1x10^4$个3T3-L1脂肪细胞接种在96孔板的每个孔中并分化，然后使用50μM壬二酸处理18小时。然后，为了测量IP_3，使用IP-1ELISA测定试剂盒(Cisbio,France)测量误差小的细胞内IP-1(IP_3的代谢物，替代标志物)的浓度。

[0136] 使用含有用于标记钙离子的荧光染料的Fluo-4 Direct™钙测定试剂盒(Invitrogen,California,U.S.)测量细胞内钙的浓度。获得培养的3T3-L1脂肪细胞并使其经过离心，然后仅将沉淀以$2.5x10^6$个细胞/mL的浓度在包含在试剂盒中的Fluo-4 Direct™钙测定缓冲液中稀释。将所得物接种于96孔板，并且在37℃在5％CO_2条件下培养60分钟后，将50μL的2X Fluo-4Direct™钙试剂上样溶液接种于96孔板，并且在37℃在5％CO_2条件下培养30分钟。然后，在494nm和516nm的激发和发射波长处测量荧光。

[0137] 结果是，壬二酸显著增加细胞内cAMP的浓度，但不影响IP_3和钙的浓度，如图5A至5C所示。根据壬二酸的浓度，壬二酸的cAMP浓度的增加趋于增加。因此，可以确认，壬二酸通过激活3T3-L1脂肪细胞中的Olfr544来特异性地增加细胞内cAMP的浓度。

[0138] 实施例5:评价壬二酸的PKA活性调节作用

[0139] 根据组织细胞中细胞内cAMP浓度的变化调节与信号转导有关的蛋白质活性的代

表性蛋白质是蛋白激酶A(PKA)。在一般条件下,由于酶活性位点被蛋白质的调节结构域位点阻断,PKA活性被抑制,但是当cAMP的浓度增加时,cAMP与PKA的调节位点结合以暴露活性位点,从而增加PKA活性。在本实验中,测量了壬二酸对PKA活性的改变。使用Enzo PKA激酶活性试剂盒(Cat.#ADI-EKS-390A,Enzo Life Sciences,Korea)测量PKA活性。

[0140] 结果是,壬二酸显著增加了3T3-L1脂肪细胞中的PKA活性,如图6所示。确认了,在用壬二酸(50μM)处理3T3-L1脂肪细胞2小时时,与对照相比,PKA活性增加了113.8%。因此,因壬二酸处理引起的脂肪细胞中的cAMP的增加,增加了PKA活性。

[0141] 实施例6:分析通过壬二酸的CREB和HSL蛋白的磷酸化的变化

[0142] 当通过壬二酸增加PKA蛋白活性时,PKA的靶蛋白的磷酸化增加。因此,通过蛋白质印迹实验确认了称为PKA的靶蛋白的cAMP-反应元件结合蛋白(CREB)和激素-敏感性脂肪酶(HSL)的磷酸化。在蛋白质印迹实验中,使用实施例1中描述的方法,并且在壬二酸与3T3-L1脂肪细胞反应2小时后,提取蛋白质,由此进行实验。实验中使用的第一抗体为抗-磷酸-CREB抗体和抗-磷酸-HSL抗体(Santa Cruz,California,U.S.)。

[0143] 结果是,在使用壬二酸(50μM)处理脂肪细胞2小时的情况下,与对照(C)相比,CREB和HSL的磷酸化迅速增加,如图7所示。脂肪细胞中的cAMP浓度的增加刺激PKA活性以增加HSL的磷酸化,并且因HSL的磷酸化引起的HSL的激活促进储存在脂滴中的甘油三酯的水解。因此,此结果表明壬二酸具有水解脂肪细胞的甘油三酯的作用。

[0144] 实施例7:分析通过壬二酸的脂肪细胞中甘油三酯和胆固醇的浓度的变化和脂质水解

[0145] 为了确认壬二酸是否通过激活cAMP-PKA-HSL信号传导通路在脂肪细胞中诱导甘油三酯水解,将脂肪细胞直接使用壬二酸处理,并测量细胞内脂质的浓度。

[0146] 使用壬二酸(浓度:25或50μM)处理3T3-L1脂肪细胞后,提取细胞内脂质。然后,使用TG测定试剂盒(BioVision,California,U.S.)测量甘油三酯的浓度,并使用Amplex Red胆固醇测定试剂盒(Invitrogen,California,U.S.)测量胆固醇的浓度。

[0147] 结果是,壬二酸显著且浓度依赖性地降低了3T3-L1脂肪细胞中甘油三酯的浓度,如图8A至8C所示。在使用50μM壬二酸处理3T3-L1脂肪细胞的情况下,细胞内甘油三酯的浓度与对照相比下降了61.5%。与此同时,细胞内胆固醇浓度没有显著变化,从而可以理解,壬二酸选择性水解脂肪组织中的甘油三酯。

[0148] 此外,为了确认壬二酸是否具有水解甘油三酯的作用,测量对应于甘油三酯水解的产物的甘油的释放量。作为使用50μM壬二酸处理3T3-L1脂肪细胞2小时的结果,对应于甘油三酯水解的产物的甘油与对照相比增加了46.7%,从而甘油的释放量显著增加。

[0149] 总之,确认了根据本发明的壬二酸作为配体结合对应于在脂肪细胞的膜中表达的GPCR的Olfr544以激活Olfr544并激活cAMP-PKA-HSL信号传导通路,由此水解甘油三酯以降低脂肪细胞中甘油三酯的浓度。具体地,由于在诸如大麦,黑麦等谷物中含有在体内天然形成的天然物质壬二酸,因此壬二酸是可摄入成分,而且作用于体内的脂肪细胞以促进甘油三酯水解,由此可获得体重减轻效果和减轻肥胖效果。

[0150] 实施例8:使用Olfr544shRNA确认对壬二酸的脂解调节作用的Olfr544依赖性

[0151] 8-1:使用Olfr544shRNA敲低脂肪细胞中的Olfr544基因

[0152] 为了确认小鼠脂肪细胞中Olfr544基因的敲低作用,在6孔板中将3T3-L1细胞分化

成脂肪细胞。在靶向Olfr544或编码非靶向乱序shRNA发夹(顶链:5'-CACCGTAAGGCT-ATGAAGAGATACCGAAGTATCTCTTCATAGCCTTA-3')的shRNA碱基序列(顶链:5'-CACCGCTCACTGTTCGCATCTTCATTCGAAAATGAAGATGCGA-ACAGTGAG-3')使用Block-iT U6RNAi进入载体试剂盒(Invitrogen)插入到pENTR/U6载体中以构建Olfr544shRNA后,2.5μg的Olfr544shRNA或乱序shRNA使用10μL的Lipofectamin2000(Invitrogen)转染。48小时后,测量Olfr544的表达。通过实施例1-3和1-4中描述的方法确认了Olfr544RNA和蛋白质的表达模式。Scr shRNA用作阴性对照。

[0153] 结果是,可以确认Olfr544RNA和蛋白质的表达分别被Olfr544shRNA降低了80%和50%,如图9A至9C所示。

[0154] 8-2:敲低Olfr544基因的脂肪细胞中壬二酸的信号转导失活的影响

[0155] 在小鼠脂肪细胞中敲低Olfr544基因后,通过实施例4所述的方法确认了cAMP测定,通过实施例5所述的方法确认了PKA活性,并通过实施例6所述的方法确认了HSL蛋白质的磷酸化。

[0156] 结果是,可以确认,在其中转染Olfr544shRNA并且因此Olfr544基因的表达被抑制的脂肪细胞中,即使用壬二酸处理脂肪细胞,,cAMP-PKA-HSL信号传导通路全部失活,如图10A至10C所示。

[0157] 8-3:测量敲低Olfr544基因的脂肪细胞中壬二酸的脂解作用

[0158] 在小鼠脂肪细胞中敲低Olfr544基因后,使用壬二酸处理脂肪细胞,并且确认了是否保持壬二酸的甘油三酯水解作用。

[0159] 结果是,在其中转染Olfr544shRNA并且因此Olfr544基因的表达被抑制的脂肪细胞中,即使用壬二酸处理脂肪细胞,甘油的浓度没有变化,如图11所示。因此,可以确认,脂肪细胞中壬二酸的脂解依赖于Olfr544。

[0160] 实施例9:使用肥胖诱导的小鼠动物模型确认壬二酸的抗肥胖作用

[0161] 以50mg/kg的浓度向对应于遗传肥胖诱导的小鼠的ob/ob小鼠(Samtako,Seoul,Korea)口服施用壬二酸后,将其肥胖的程度与没有施用壬二酸的对照组的肥胖的程度比较。更具体地,分析了体重的增加、采食量、体脂、血液指数、血脂指数、肝组织的重量、对应于肝毒性指数的ALT和AST以及能量代谢。

[0162] 9-1:根据壬二酸的施用分析体重的增加和采食量

[0163] 每周一次观察壬二酸施用组和对照组的体重的变化,实验期为6周。

[0164] 结果是,可以确认,与对照组相比,壬二酸施用组的体重在实验第一周时和之后显著降低,如图12A和12B所示。与此同时,作为在实验的最后一周测量采食量的结果,壬二酸施用组与对照组之间没有显著差异。

[0165] 9-2:根据壬二酸的施用分析体脂

[0166] 通过微CT图像分析测量了口服施用壬二酸6周的壬二酸施用组和对照组的小鼠的体脂(总脂肪、皮下脂肪和腹部脂肪)。定量小鼠全部部位的皮下脂肪,并且通过定量小鼠第15至第20腰椎部位的腹部脂肪的量来计算腹部脂肪。

[0167] 结果是,可以确认,与对照组相比,口服施用壬二酸6周的小鼠的总脂肪、皮下脂肪和腹部脂肪显著减少,如图13所示。

[0168] 9-3:根据壬二酸施用分析血脂指标

[0169] 为了评价施用壬二酸6周的施用组和对照组对壬二酸的小鼠脂质代谢的效果，测量血中甘油三酯、脂联素和胆固醇的浓度。

[0170] 结果是，确认了，在壬二酸施用组中，血液甘油三酯和胆固醇的浓度显著降低，如图14所示。

[0171] 9-4：根据壬二酸的施用分析肝脏组织的重量、ALT和AST

[0172] 测量了口服施用壬二酸6周的壬二酸施用组和对照组的小鼠的肝脏组织的重量、ALT和AST。

[0173] 结果是，壬二酸施用组的肝脏组织的重量减少，但是，对应于指示壬二酸施用组和对照组之间肝毒性的指标的ALT和AST没有大的差异，如图15A至15C所示。

[0174] 实施例10：根据正常小鼠中壬二酸的施用分析能量代谢

[0175] 通过使用间接量热法测量壬二酸施用组和对照组的O_2的消耗量和CO_2的产生量来确认相对代谢率。

[0176] 结果是，可以确认，在壬二酸施用组中，总能量消耗(EE)没有变化，但呼吸商(RQ)降低，并且脂肪酸氧化增加，如图16所示。呼吸商的降低意味着脂肪酸被用作主要的能量来源。因此，从上述结果可以理解，壬二酸引起脂肪组织的脂解以增加作为能量来源消耗的脂肪的比例，并且因此，储存的脂肪的量减少并且体脂减少。

[0177] 工业实用性

[0178] 根据本发明的含有壬二酸的组合物具有在脂肪组织中降低脂质的积累和在脂肪组织中改善脂质代谢的优异作用，从而组合物可用作用于改善脂肪组织(减轻肥胖)的脂质代谢诸如体重减少和体脂减少的食物原料、药物组合物和保健功能食物。

[0179] 文本文件

[0180] 参见所附序列表。

序列表

<110> 高丽大学校产学协力团(KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)

<120> 具有脂肪组织甘油三酯水解作用的壬二酸组合物

<130> PF-B1999

<140> PCT/KR2016/006859

<141> 2016-06-27

<150> KR 10-2015-0095529

<151> 2015-07-03

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> m olfr544_F

<400> 1

ggggacatct cgctgaataa 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

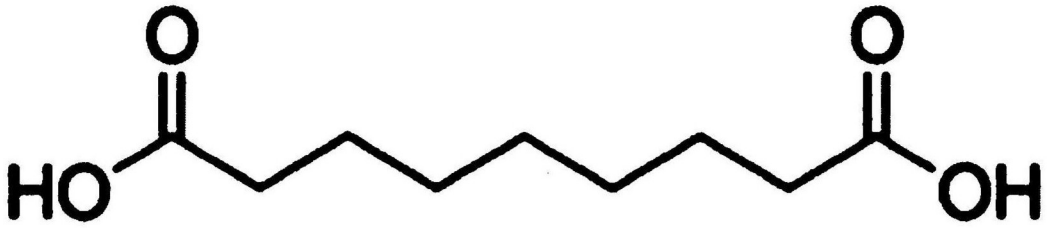
<213> 人工序列

<220>

<223> m olfr544_R

<400> 2

atgaggacat ggtggaggag 20



分子量：188.22 g/mol,分子式：$C_9H_{16}O_4$

图1

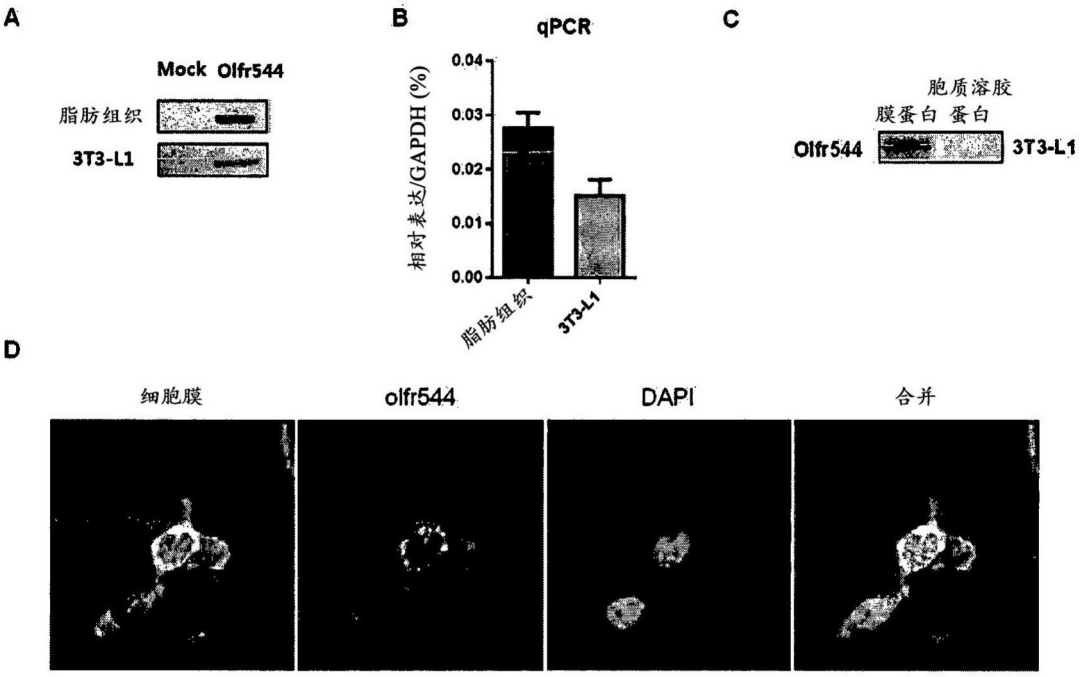


图2

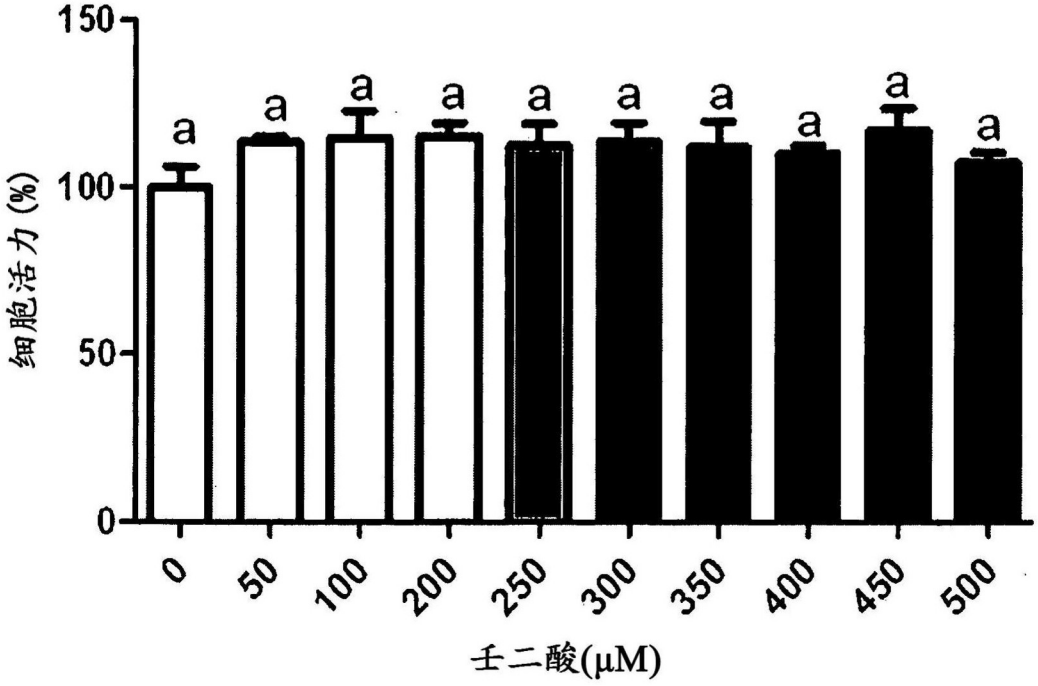

150
100
50
0
细胞活力(%)
a
a
a
a
a
a
a
a
a
a
0
50
100
200
250
300
350
400
450
500
壬二酸(μM)

图3

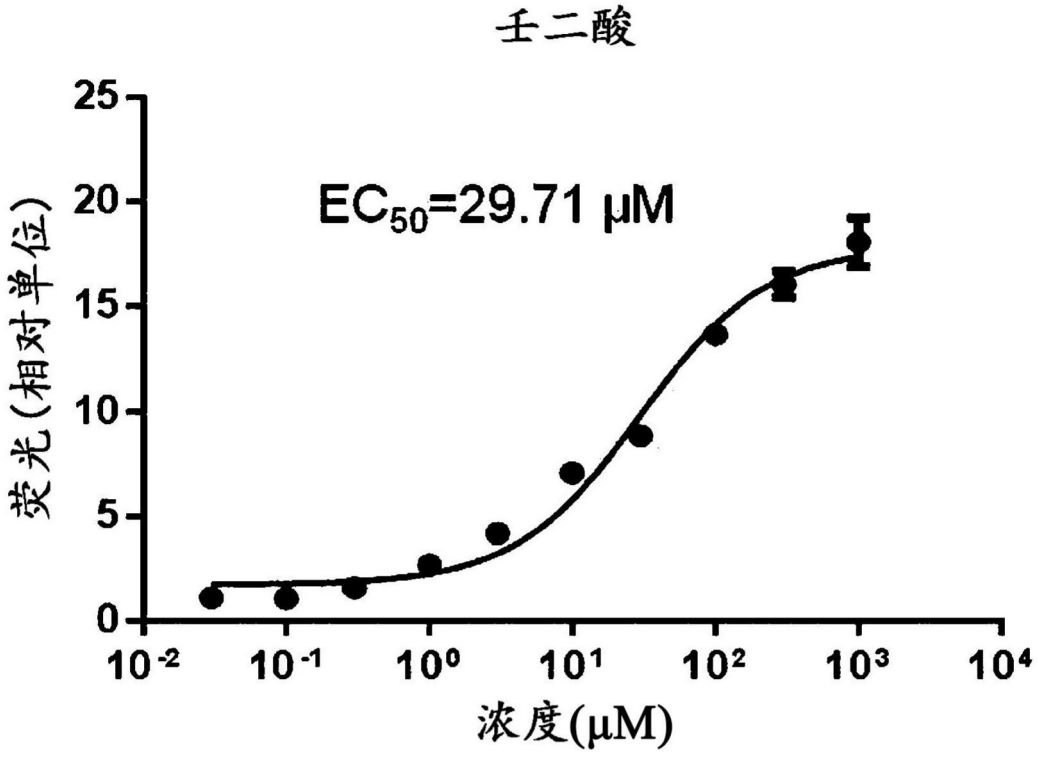

壬二酸
25
20
15
10
5
0
荧光(相对单位)
EC50=29.71 μM
10-2
10-1
100
101
102
103
104
浓度(μM)

图4

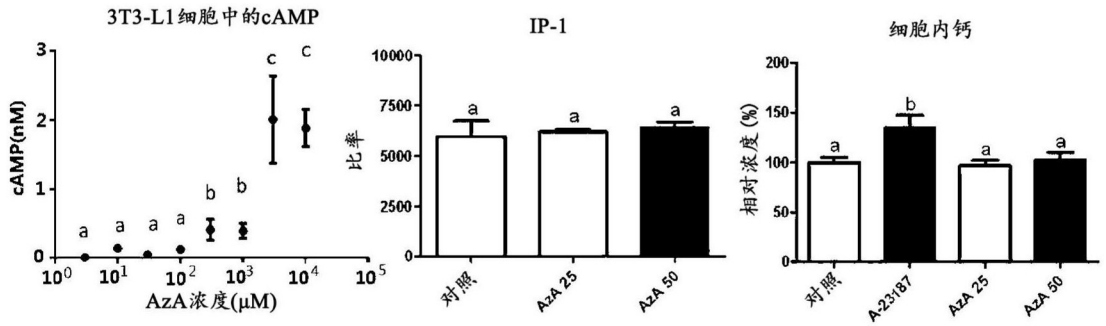

3T3-L1细胞中的cAMP
cAMP(nM)
AzA浓度(μM)
IP-1
比率
对照
AzA 25
AzA 50
细胞内钙
相对浓度(%)
对照
A-23187
AzA 25
AzA 50

图5

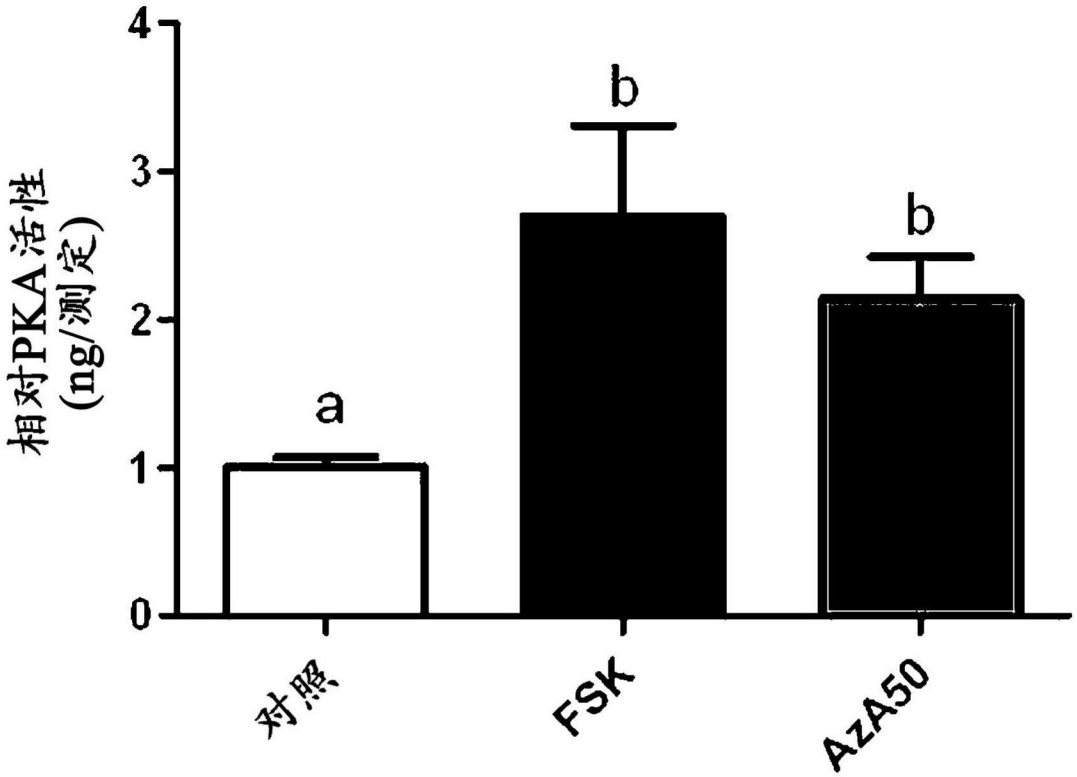

相对PKA活性
(ng/测定)
对照
FSK
AzA50

图6

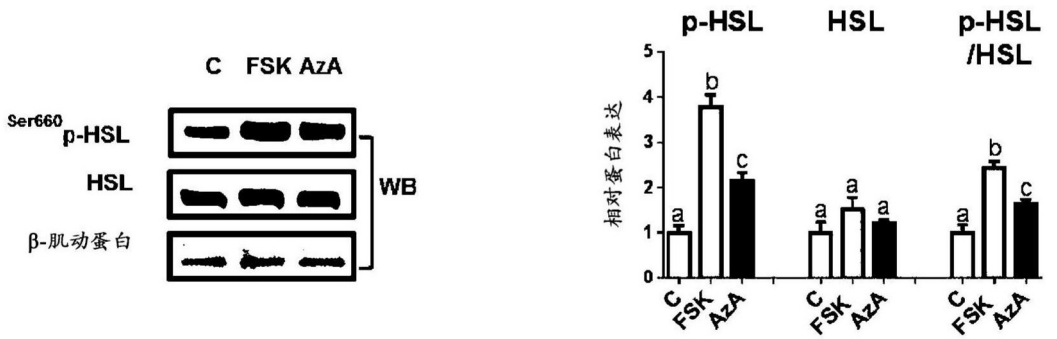

C FSK AzA
Ser660 p-HSL
HSL
β-肌动蛋白
WB
p-HSL
HSL
p-HSL /HSL
相对蛋白表达
C
FSK
AzA

图7

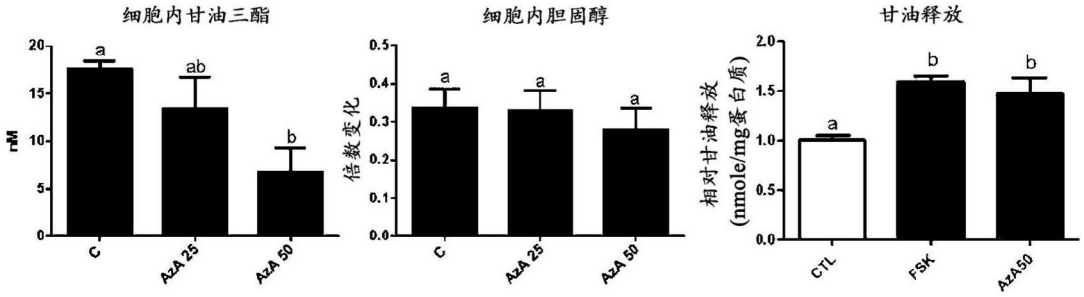

细胞内甘油三酯
nM
a
ab
b
C
AzA 25
AzA 50
细胞内胆固醇
倍数变化
a
a
a
C
AzA 25
AzA 50
甘油释放
相对甘油释放
(nmole/mg蛋白质)
a
b
b
CTL
FSK
AzA50

图8

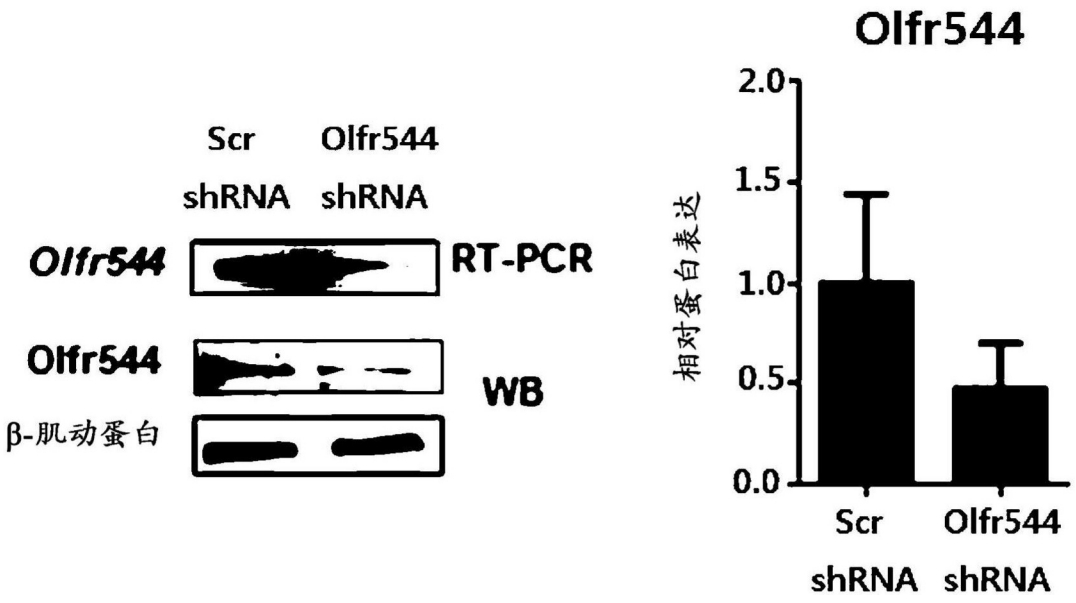

Scr
shRNA
Olfr544
shRNA
Olfr544
RT-PCR
Olfr544
WB
β-肌动蛋白
Olfr544
相对蛋白表达
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Scr
shRNA
Olfr544
shRNA

图9

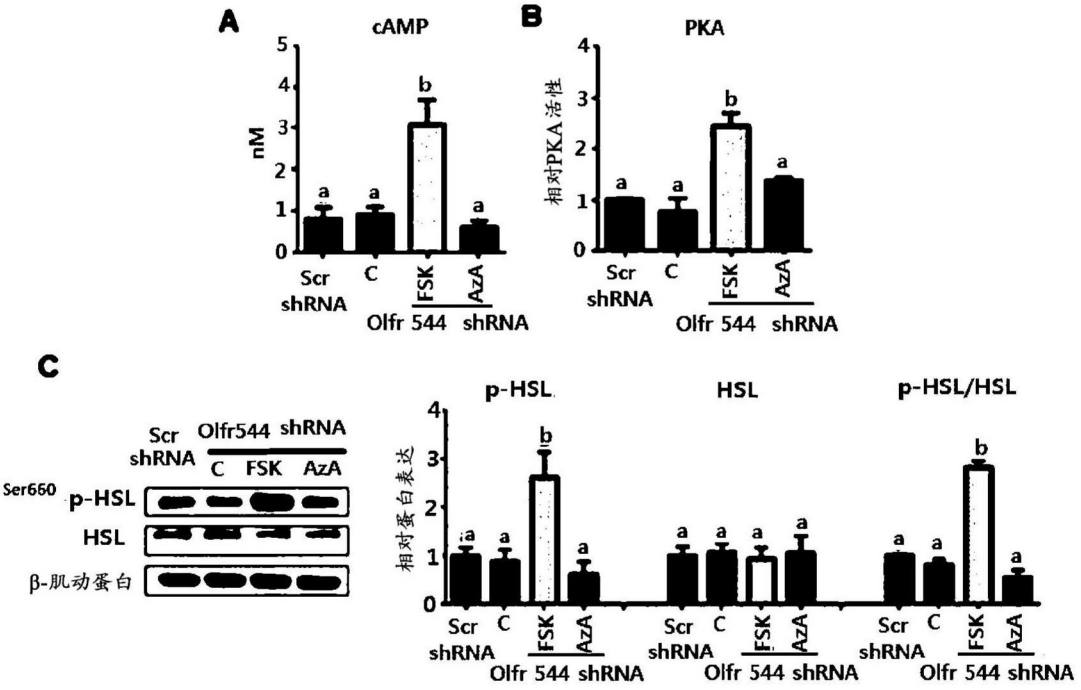

A
cAMP
nM
B
PKA
相对PKA活性
Scr shRNA
C
FSK
AzA
Olfr 544 shRNA
C
Scr Olfr544 shRNA
shRNA
C FSK AzA
Ser660
p-HSL
HSL
β-肌动蛋白
p-HSL
HSL
p-HSL/HSL
相对蛋白表达

图10

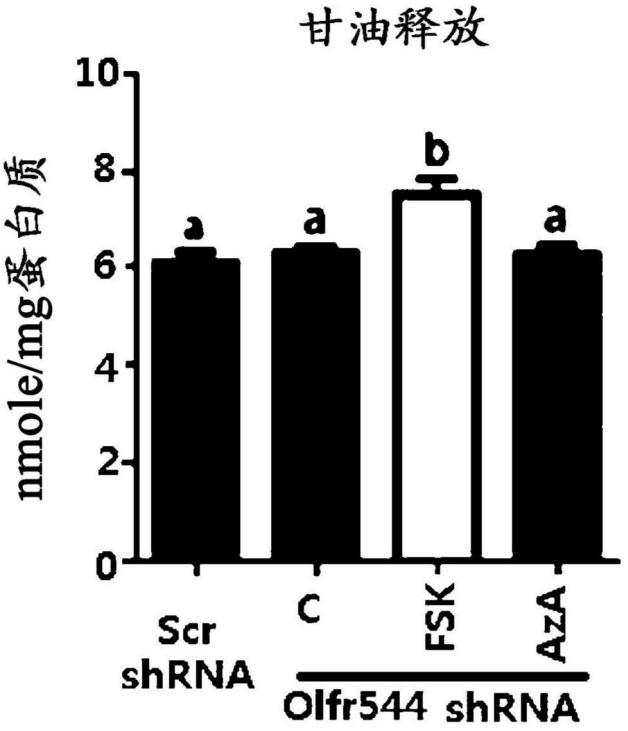
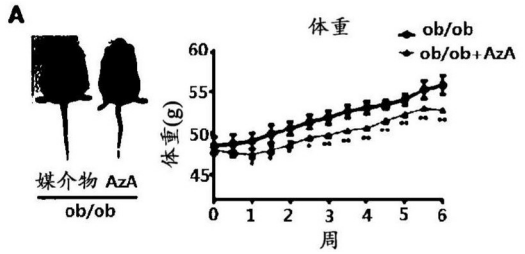

甘油释放
nmole/mg蛋白质
Scr shRNA
C
FSK
AzA
Olfr544 shRNA

图11



B

周	*ob/ob* 小鼠	
	媒介物(g)	AzA(g)
5.0	4.94 ±0.32	4.07 ± 0.27
5.5	4.83 ± 0.27	4.24 ± 0.56
6.0	4.93 ± 0.31	3.98 ± 0.18

图12

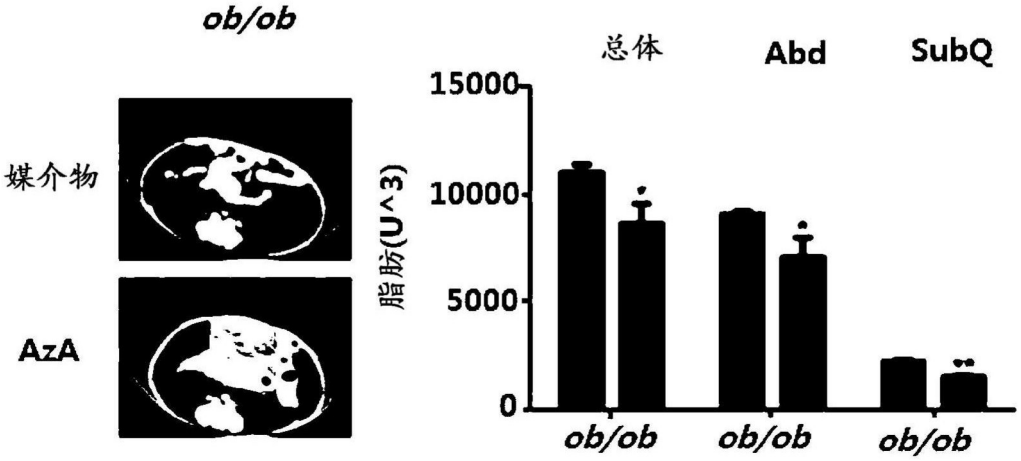


图13

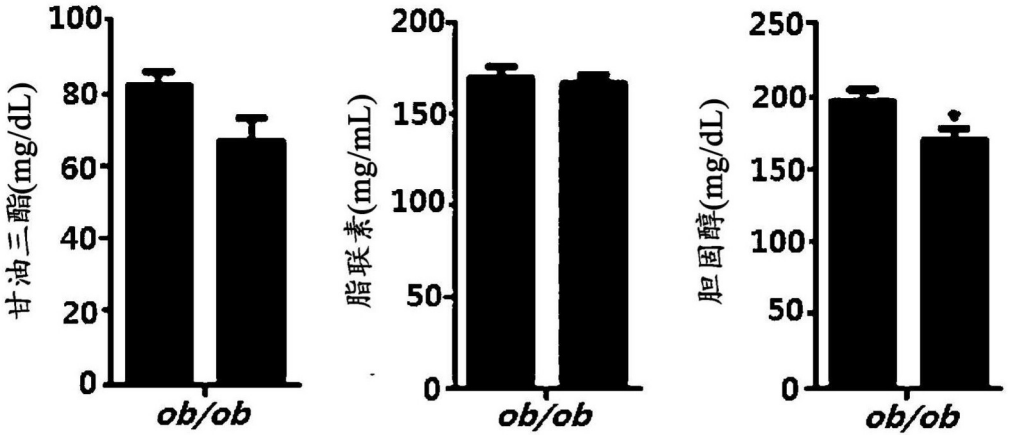


图14

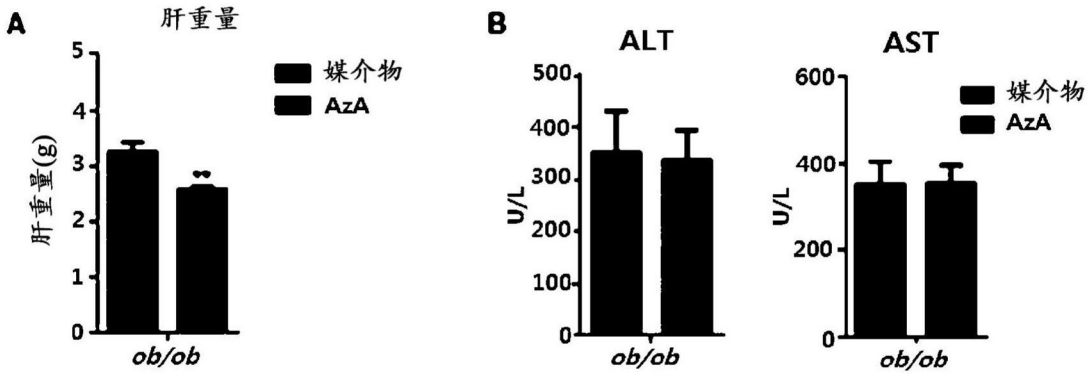

A
肝重量
肝重量(g)
媒介物
AzA
ob/ob
B
ALT
U/L
AST
媒介物
AzA
ob/ob

图15

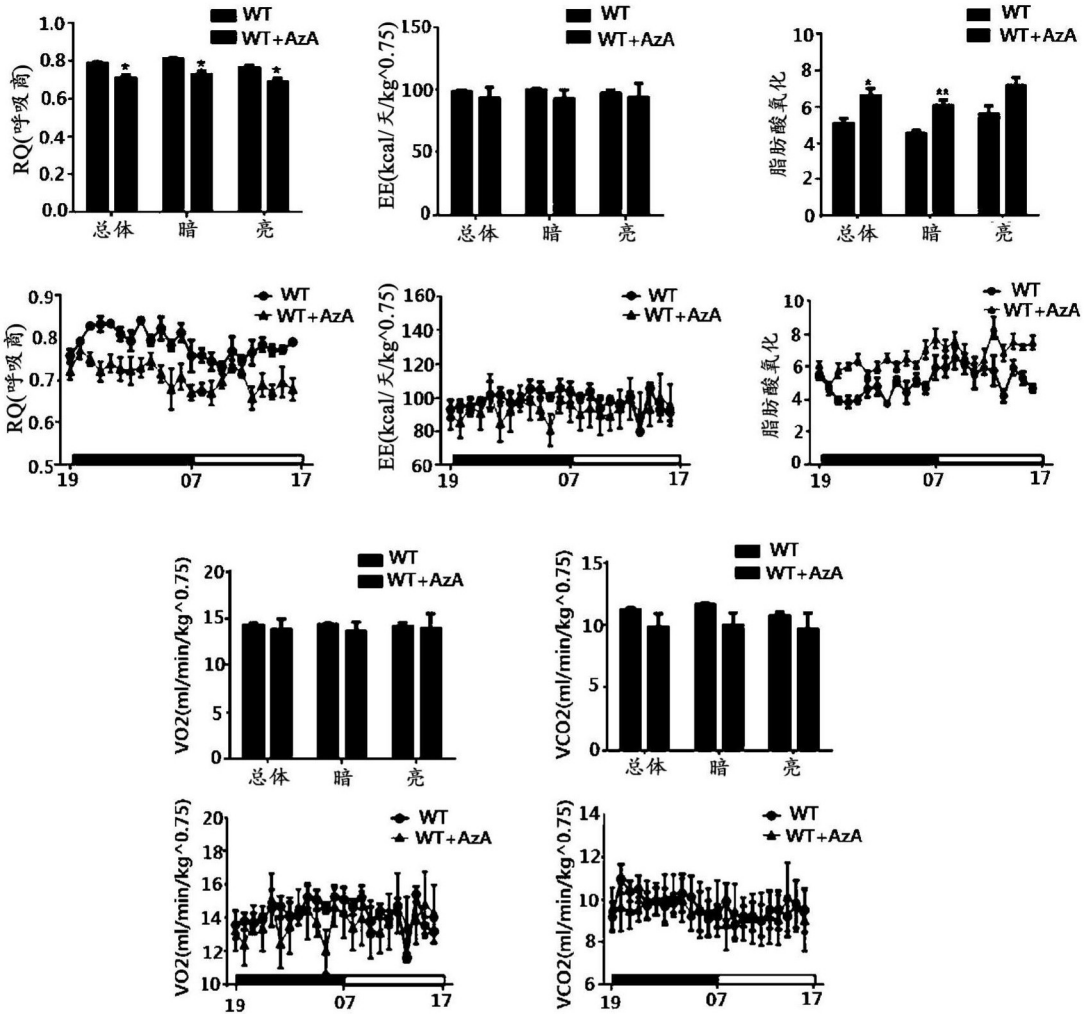

WT
WT+AzA
RQ(呼吸商)
EE(kcal/天/kg^0.75)
脂肪酸氧化
总体
暗
亮
19
07
17
VO2(ml/min/kg^0.75)
VCO2(ml/min/kg^0.75)

图16