



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년09월24일
(11) 등록번호 10-0918776
(24) 등록일자 2009년09월16일

(51) Int. Cl.

A23L 1/30 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)

A61K 36/82 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0034119

(22) 출원일자 2009년04월20일

심사청구일자 2009년04월20일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020070000573 A*

US20060153907 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

계명대학교 산학협력단

대구 달서구 신당동 1000번지

(72) 발명자

송대규

대구광역시 중구 동산동 194번지 계명대학교 의과대학 생리학교실

이진호

대구광역시 달서구 달구벌대로 2800 계명대학교 상서캠퍼스 자연과학대학 화학과

(74) 대리인

민병준, 백경업, 이문욱

전체 청구항 수 : 총 6 항

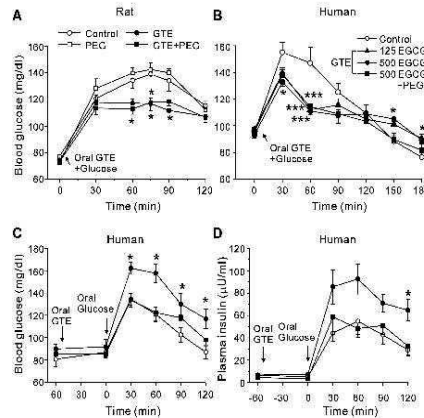
심사관 : 김기연

(54) 폴리에틸렌 글리콜과 갈레이트 카테킨을 이용한 혈당상승 억제 조성물

(57) 요약

본 발명은 갈레이트 카테킨을 포함하는 식후 혈당상승을 억제하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 혈당상승 억제 조성물은 장내에서 당의 흡수를 갈레이트 카테킨을 이용해 억제하고, 첨가된 조성물로서 갈레이트 카테킨 자체의 위장관으로부터 혈중으로의 흡수를 차단함으로써, 당 섭취에 따른 혈액내의 혈당 증가를 억제하는 것이다. 혈당상승 억제 조성물은 위장관으로부터 혈액내로의 흡수가 현저히 저하된 녹차 추출물 성분인 갈레이트 카테킨으로 갈레이트, 에피갈로카테킨 갈레이트, 에피카테킨 갈레이트 등을 포함한다.

대표도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	R13-2002-028-03002-0
부처명	교육과학기술부/한국과학재단
연구사업명	선도연구센터육성 기초의과학분야(MRC)
연구과제명	비만성 당뇨병의 예방 및 치료화학제 연구
주관기관	계명대학교 산학협력단
연구기간	2007년 09월 01일 ~ 2011년 08월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

유효성분으로 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate) 또는 에피카테킨 갈레이트(epicatechin gallate) 중에서 적어도 하나 이상을 함유하는 녹차 추출물과 상기 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate) 또는 에피카테킨 갈레이트(epicatechin gallate)의 혈중흡수를 억제하는 고분자 물질로서 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 유도체, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 공중합체, 수용성 공중합체, 메톡시폴리에틸렌 글리콜(mPEG) 또는 폴리프로필렌 글리콜(PPG) 중에서 적어도 하나 이상 선택되는 것을 포함하는 혈당조절 개선용 기능성건강식품.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 기능성건강식품은 위장관에서 당흡수 억제를 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 혈당조절 개선용 기능성 건강식품.

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 고분자 물질의 분자량이 1,000 내지 50,000 달톤인 것을 특징으로 하는 혈당조절 개선용 기능성건강식품.

청구항 5

유효성분으로 에피갈로카테킨 갈레이트 또는 에피카테킨 갈레이트 중에서 적어도 하나 이상인 화합물과 상기 에피갈로카테킨 갈레이트 또는 에피카테킨 갈레이트의 혈중흡수를 억제하는 고분자 물질로서 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 유도체, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 공중합체, 수용성 공중합체, 메톡시폴리에틸렌 글리콜(mPEG) 또는 폴리프로필렌 글리콜(PPG) 중에서 적어도 하나 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 혈당조절용 약학조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 약학조성물은 위장관에서 당흡수 억제를 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 혈당조절용 약학조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

제 5 항에 있어서,

상기 고분자 물질의 분자량이 1,000 내지 50,000 달톤인 것을 특징으로 하는 혈당조절용 약학적 조성물.

명세서

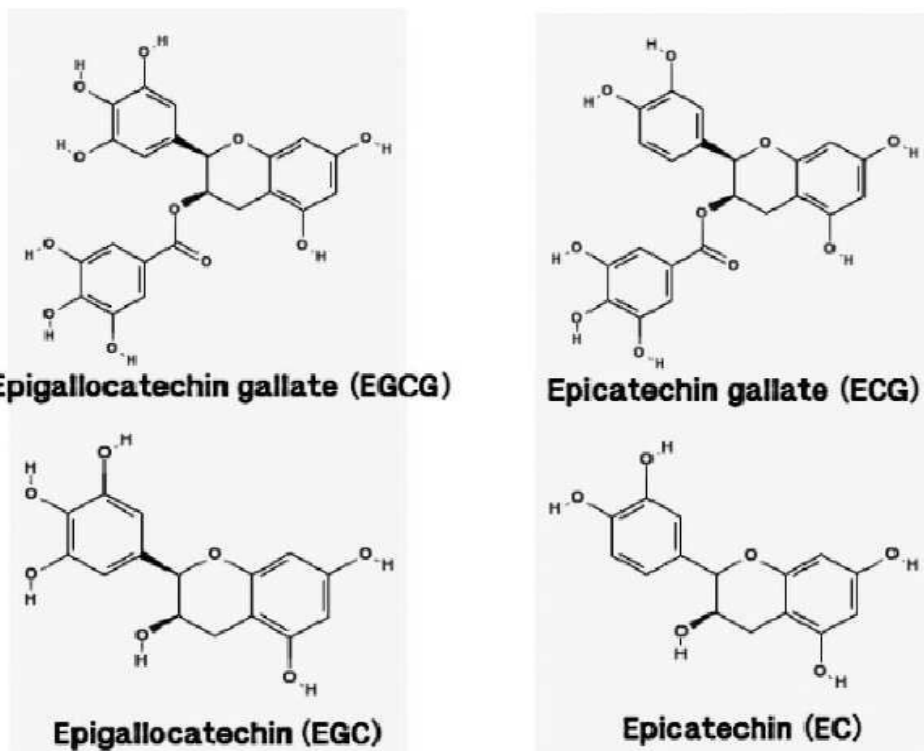
발명의 상세한 설명

기술분야

<1> 본 발명은 식후 혈당상승을 장기적으로 억제하기 위해 갈레이트 카테킨을 포함하는 혈당억제 조성물을 사용하는 것에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 제2형 당뇨병의 두가지 특징은 인슐린 저항성과 췌장 베타세포의 인슐린 분비부전이다. 어떤 유전적인 요인에 더하여, 후천적 요인 즉 비만이나 잦은 고혈당에 대한 노출 등이 당뇨병의 발생을 용이하게 하고 심화시킨다. 잦은 고혈당 노출은 이와 같이 인슐린 저항성도 증가시키고, 인슐린을 분비하는 췌장 베타세포의 과부담으로 인한 베타세포 기능부전 및 사멸을 야기한다.
- <3> 이를 포도당 독성(glucotoxicity)이라 부른다(Borona, 2008). 조기 발병 제2형 당뇨병의 한 종류로서, 글루코키나제(glucokinase) 유전자의 변이는 간세포의 당흡수를 억제하여 식후 고혈당을 야기하는 특징이 있으며(Jiang 등, 2008), 포도당 독성으로 연결된다. 이 예에서 보듯이 식후 고혈당을 감소시키는 노력이 당뇨병의 예방 및 치료에 중요한 부분이다. 식후 고혈당을 감소시키기 위해 아밀라제(α-amylase) 억제제 또는 글루코시다제(glucosidase) 억제제 등이 상용화 되어 있으나, 단당류로의 변이를 막음으로서 위장관내에서의 부작용 즉, 식욕부진, 소화불량 등을 초래할 수 있다.
- <4> 한편, 녹차 식물 차나무(카멜리아 시넨시스; *camellia sinensis*)의 잎은 건조 중량 기준으로 폴리페놀 36% 이하를 함유하지만, 이의 조성은 기후, 계절, 다양성 및 성장 상태에 따라 다양하다. 녹차 카테킨은 녹차 폴리페놀의 주요 그룹에 해당된다.
- <5> 녹차 추출물의 카테킨은 하기 화학구조와 같이 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate, 이하 "EGCG"라 칭함) 및 에피카테킨 갈레이트(epicatechin gallate, 이하 "ECG"라 칭함) 등의 갈레이트 카테킨(gallated catechin, 이하 "GC"라 칭함)과 그 외 에피카테킨(epicatechin, 이하 "EC"라 칭함) 및 에피갈로카테킨(epigallocatechin, 이하 "EGC"라 칭함) 등의 여러 종류의 카테킨을 포함한다.



- <6>
- <7> 제2형 당뇨병과 관련하여 녹차 추출물 또는 에피갈로카테킨 갈레이트(EGCG)의 좋은 효과가 많이 보고는 되고 있지만 아직 당뇨 치료약으로서의 개발이 되지 않고 있으며, 최근 연구는 장기간의 녹차복용이 당뇨병 환자의 혈당, 당화 혈색소(HbA1C) 농도, 인슐린 저항성 및 염증성 인자들의 호전에 영향이 없음이 보고되었다(Fukino 등, 2005).
- <8> 흥미롭게도 경구투여 녹차추출물은 위장관 내에서 포도당(Kobayashi 등, 2000) 및 콜레스테롤(Raederstorff 등, 2003)의 흡수를 막는다는 보고가 있다. 이것은 카테킨 중에서 갈레이트 카테킨(GC)에 의해 일어나며, 갈레이트 카테킨(GC)은 위장관세포에서 포도당 흡수를 책임지고 있는 Na-glucose cotransporter(SGLT1)를 억제할 뿐 아니라, 지방적의 마이셀(micelle) 형성을 억제하여 지방의 소화를 감소시킨다.

- <9> 이때 필요한 갈레이트 카테킨(GC)의 복용량은 낮은 경구 흡수율(oral bioavailability)을 보여 사람이 큰 부작용 없이 복용이 가능하다(Van Amelsvoort 등, 2001). 그러나 위장관으로 들어온 갈레이트 카테킨(GC)는 결국 혈액으로 흡수되며, 인체내에서 혈당에 영향을 미친다. 그러므로 경구 투여된 녹차추출액의 당뇨병에 대한 효과는 위장관에서의 효과와 혈액내에서의 효과를 합한 것으로 볼 수 있다. 몇몇 보고에서 녹차추출액의 경구복용은 쥐와 사람에서 당부하 검사시 혈당을 감소시킨다고 한다(Sabu 등, 2002; Tsuneki 등, 2004).
- <10> 그러나 이러한 결과는 당복용과 녹차복용을 거의 동시에 실시하였으므로 해서 녹차의 위장관 내에서의 당흡수 차단 효과만이 반영되었을 가능성이 크다. 또한 쥐는 사람보다 경구흡수율이 현저히 낮아 쥐를 대상으로 실험할 때, 순환계내에서의 녹차효과를 실험기간동안 보기가 어렵다. 그러므로 정확한 녹차추출액의 혈당 및 당뇨에 대한 효과를 알기 위해서는 혈액내에서의 효과를 동시에 알아야 하지만 현재까지 이러한 보고는 알려져 있지 않다.
- <11> 본 발명자들은 실시예처럼 실험을 수행하여 녹차추출물의 순환계내의 효과를 알고자 하였으며, 그 결과 갈레이트 카테킨(GC)이 순환계내에서 혈당 상승 및 인슐린 과분비를 야기한다는 사실을 규명하여, 녹차추출액의 위장관내에서의 당흡수억제 효과만을 응용하고자 갈레이트 카테킨(gallated catechin)의 혈중 흡수억제제 병용투여의 아이디어를 얻은 다음 수많은 실험을 통하여 당뇨병에 우수한 효과가 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <12> 본 발명의 목적은 기존의 혈당강하제와 다른 작용기전으로 당의 위장관 흡수를 저해함으로써 부작용 없이 식후 혈당증가를 감소시키는 새로운 혈당조절제를 제공하는데 그 목적이 있다.

과제 해결수단

- <13> 본 발명에 따른 혈당강하작용을 가지는 조성물을 제조하는 방법은 에피갈로카테킨 갈레이트(EGCG) 또는 에피카테킨 갈레이트(ECG) 중에서 적어도 하나 이상 포함된 갈레이트 카테킨(gallated catechin)을 녹차로부터 추출하는 단계, 상기 녹차 갈레이트 카테킨을 포함한 추출액 또는 추출 후 건조된 분말에 폴리에틸렌 글리콜(PEG), PEG 유도체(예: PEG-alkyl, PEG-dialkyl, PEG-ester, PEG-diester 등), PEG 공중합체[예: PEG-PPG, PEG-PPG-PEG (Poloxamer, Pluronic)], 수용성 공중합체(폴리비닐피롤리딘 등), 메톡시폴리에틸렌 글리콜(mPEG), 또는 폴리프로필렌 글리콜(PPG) 중에서 적어도 하나 이상 선택된 폴리 글리콜(PG) 또는 선택적으로 갈레이트 카테킨과 결합하는 고분자 중 적어도 하나 이상 선택된 물질을 혼합하는 단계를 포함한다.
- <14> 상기 조성물은 또한 갈레이트 카테킨이 농축되어있는 상용 제품과 폴리 글리콜(PG)을 섞는 단계로 제조될 수 있다. 상기 조성물은 갈레이트 카테킨을 10 내지 2000 mg 포함하며, 갈레이트 카테킨 1 중량부 대비 0.01 내지 50 중량부의 폴리 글리콜(PG)을 포함하는 것이다. 상기 폴리 글리콜(PG)의 분자량은 100 내지 2,000,000 달톤을 사용하며, 바람직하게는 분자량이 500 내지 100,000 달톤인 것을 사용하며, 더욱 바람직하게는 분자량이 1,000 내지 50,000 달톤인 경우 복용감이나 혈당 조절효과가 좋다.
- <15> 이때 사용하는 폴리 글리콜(PG)의 화학구조는 요구되는 물성과 성질에 따라 폴리 글리콜(PG)의 말단 부위에 C₁-C₆알킬, 아릴, 아세틸, C₁-C₆알킬 혹은 아릴이 치환된 아세틸, C₁-C₆알킬 혹은 아릴이 치환된 설펜기 등이 1개 내지 2개가 치환된 다양한 폴리 글리콜(PG) 유도체를 사용할 수 있다.
- <16> 상기 갈레이트 에피카테킨(GC)의 제조방법은
- <17> 1) 건조된 녹차잎을 열수 추출하여 얻은 추출액을 여과하는 단계;
- <18> 2) 상기 여과액을 동결건조하여 분말을 얻는 단계;
- <19> 3) 상기 분말을 증류수에 용해시킨 후 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 갈레이트 에피카테킨 또는 이를 포함하는 분획을 분리정제하는 단계;
- <20> 상기 과정을 보다 자세히 설명하면, 단계 1에서는 녹차잎을 10~50배 중량의 80~95℃ 열수에 침지시켜 가볍게 교반하면서 5분~1시간 동안 추출한 후 여과하였다.

- <21> 단계 2에서는 상기 여과액을 동결건조시켜 녹차의 폴리페놀류를 포함하는 분말을 얻었다.
- <22> 단계 3에서는 분말내 폴리페놀류 화합물의 성분을 분리정제하기 위하여 칼럼 크로마토그래피를 수행하였는데, 본 발명에서는 고 다공성 폴리스티렌 겔 칼럼 크로마토그래피(high porosity polystyrene gel column chromatography; particle size, 75-150 μ m, Diaion HP-20, Mitsubishi Kagaku Co., Japan; Column, 25 ϕ × 1,000 mm)를 이용하였다. 이때, 용출용매는 100 ml의 메탄올:H₂O = 1:5 (분획 1 및 2)을 사용하여 용출한 후 다시 100 ml의 메탄올:H₂O = 2:5 (분획 3)를 사용하여 재용출하였다. 유속은 5 ml/분으로 유지하였다.
- <23> 상기 제조방법에 의해 얻은 녹차 폴리페놀류 화합물의 성분을 HPLC로 분석한 결과, 분획 1에서는 갈로카테킨과 에피갈로카테킨이 검출되었고, 분획 2에서는 카테킨, 에피카테킨, 갈로카테킨 갈레이트 및 에피갈로카테킨 갈레이트가 검출되었으며, 분획 3에서는 에피카테킨 갈레이트가 검출되었다.
- <24> 본 발명에 따르면, 제조된 조성물은 장에서 당의 흡수를 수행하는 SGLT(sodium-dependent glucose transporter)의 활성을 갈레이트 카테킨이 저해함으로써 당의 흡수를 억제하는 것으로 아밀라제를 억제하여 혈당강하제로 작용하는 기존의 당뇨병치료제가 가지는 부작용이 나타나지 않게 된다. 또한, 혈중으로 흡수되었을 때 혈당을 증가시키는 갈레이트 카테킨(GC) 자체의 위장관 흡수는 폴리 글리콜(PG)에 의해 차단하게 된다.
- <25> 따라서 본 발명은 식후 혈당의 증가를 완화시킴으로써 정상인의 당뇨예방, 당뇨소인을 가진 사람의 당뇨진행 억제 그리고 당뇨병자의 합병증 완화 혹은 당뇨치료제의 조성물을 제공한다.
- <26> 본 발명에 따른 갈레이트 카테킨(GC) 조성물은 통상의 제제형태로 만들어져 경구로 투여한다. 투여 시기는 식전 혹은 식사와 같이 투여할 수 있으나 식사 직전에 투여하는 것이 바람직하다.
- <27> 본 발명의 갈레이트 카테킨이 포함된 조성물은 녹차로부터 분리 추출한 천연적인 생리 활성 물질이기 때문에, 인체 또는 동물 투여시, 체내 부작용이나 급성 독성 등의 면에서 비교적 안전한 성분으로, 대량 투여시에도 실질적으로 문제없이 안전하게 사용할 수 있는 우수한 물질이므로, 본 발명은 혈당조절을 위해 갈레이트 카테킨 화합물의 위장관 흡수를 저해하는 저해제로서 폴리 글리콜(PG)을 포함하는 식품 또는 기능성건강식품을 제공한다.
- <28> 본 발명에 따라서 약학적 제제의 형태로 제조하는 경우, 갈레이트 카테킨(GC) 화합물과 폴리 글리콜(PG)은 약학적으로 허용되는 통상적인 담체와 함께 배합하여 투여 목적에 따라, 정제, 경질 또는 연질 캡셀제, 츄잉정, 분말제, 액제나 현탁제와 같은 경구 투여용 제제 형태로 제형화될 수 있다.
- <29> 경구 투여의 목적으로 본 발명의 활성 화합물을 정제, 캡셀제, 츄잉정, 분말제, 액제, 현탁제 등의 제제로 제형화하는 경우에 있어서는, 아라비아 고무, 옥수수 전분, 미세 결정질 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 인산 이칼슘 또는 락토오스와 같은 부형제, 알긴산, 옥수수 전분 또는 감자 전분과 같은 붕해제, 스테아르산 마그네슘과 같은 윤활제, 슈크로오스 또는 사카린과 같은 감미제 및 페퍼민트, 메틸 살리실산염 또는 과일향과 같은 향미제가 포함될 수 있으며, 투여 단위형이 캡셀제인 경우에는 상기 성분외에도 지방유와 같은 액상 담체가 포함될 수도 있다.
- <30> 전술한 약제학적으로 허용되는 담체로는 약제학적으로 순수하고, 실질적으로 무독성이며, 활성 성분의 작용을 저해하지 않는 임의의 모든 보조제를 사용할 수 있다.
- <31> 본 발명에서 혈당조절제로서 효과가 충분히 달성되는데 필요한 용량으로, 환자가 앓고 있는 질환의 종류 및 질환의 중증도, 투여하고자 하는 환자의 성별, 연령, 체중 및 건강 상태, 투여 방식, 투여 횟수와 시간, 병용 약물의 사용 여부 및 기타 관련 환경에 따라, 환자 처치의사의 판단하에 적절한 범위에서 결정할 수 있다.
- <32> 본 발명의 갈레이트 카테킨과 함께 갈레이트 카테킨의 0.01 내지 50 중량부의 폴리 글리콜(PG)을 유효성분으로 함유하는 약학적 제제는 경구 투여의 경우 EGCG, ECG 또는 이들 혼합물 기준으로 체중 kg당 0.5 내지 100mg, 바람직하게는 1 내지 50mg을 1일 1회 내지 수회, 바람직하게는 1회 내지 3회에 나누어 식전, 식사 중 또는 식사 직후에 투여할 수 있다.
- <33> 본 발명의 갈레이트 카테킨과 폴리 글리콜은 전술한 약학적 제제외에도, 기존의 청량 음료, 미네랄 워터, 알코올 음료 등의 음료 제품 또는 츄잉껌이나 캐러멜 제품, 캔디류, 빙과류, 과자류 등에 적당량 배합하거나, 비타민이나 미네랄 등을 포함한 건강 보조 식품, 또는 식품 첨가제 등에 포함시킴으로써 혈당조절 개선용 기능성건강식품 또는 건강식품의 형태로 제조할 수도 있다.

효 과

- <34> <시험예 1: 사람 당부하검사에서 녹차추출액 복용이 혈당과 혈중 인슐린 농도에 미치는 영향>
- <35> 공복의 정상 남자 성인을 대상으로 경구 당부하검사를 실시한 결과 녹차추출액복용이 혈당치에 미치는 영향은 녹차추출액과 포도당 복용사이의 시간차이에 의존하는 것으로 나타났다(도 1). 즉 실시예 3에서 얻어진 녹차추출액 350 ml와 포도당액(75 g/150 ml)을 거의 동시에 복용을 한 군에서는 혈당이 포도당만을 복용한 대조군에 비해 낮게 나타났으나(도 1의 A) 인슐린은 차이가 없었다(도 1의 B). 녹차추출액을 포도당 복용 한시간 전에 복용한 군에서는 당부하검사에서 대조군보다 혈당 및 인슐린 농도가 유의하게 높았다(도 1의 C 및 D). 1시간의 복용시간 간격은 녹차추출액의 카테킨이 혈중으로 흡수되는데 걸리는 시간을 반영하였으며, 카테킨의 혈중 농도가 복용후 1 내지 2시간에서 최고치에 도달한다는 점이 반영되었다(Yang 등, 1998; Lee 등, 2002). 인슐린 농도가 이때 함께 증가하는 것은 혈당의 상승으로 인한 보상 기전으로 보인다. 이 현상은 동일한 당 부하를 처리하기 위해 분비되어야 하는 인슐린양이 더 큰 상태로서 장기적으로는 베타세포에 부담을 주는 예이다. 시험예의 실험 결과들은 Analysis of variance (ANOVA)의 Bon Ferroni 법으로 통계분석되었으며, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001로 표시하였다.
- <36> <시험예 2. 혈당 상승에 영향을 미치는 녹차 성분 갈레이트 카테킨>
- <37> 녹차추출액 중 혈중에서 혈당을 증가시키는 데 관여하는 카테킨 성분을 알아보고자, 12시간 공복 수컷쥐 (Sprague-Dawley male rat)의 정맥으로 EGCG, ECG, EC 및 EGC를 각각 10 mg/kg씩을 쥐의 꼬리정맥에 주사하고, 30 분후, 복강을 통한 당부하검사(2 g/kg)를 실시하였다(도 2). 그 결과 갈레이트 카테킨(GC)인 에피갈로카테킨 갈레이트(EGCG)와 에피카테킨 갈레이트(ECG)에서만 혈당이 증가하는 것을 관찰하였고, 에피갈로카테킨(ECG) 및 에피카테킨(EC)는 혈당에 큰 영향을 주지 않았다.
- <38> <시험예 3. 에피갈로카테킨 갈레이트(EGCG)가 체내 세포들의 포도당 흡수에 미치는 영향>
- <39> 에피갈로카테킨 갈레이트(EGCG)가 지방세포(3T3L1 세포주), 간세포(HepG2 세포주), 골격근세포(L6 세포주) 및 췌장 베타세포(INS-1 세포주)의 기저(basal) 및 인슐린자극(insulin-stimulated) 포도당 흡수에 미치는 영향을 보고자 2-deoxy-[³H]-glucose uptake실험을 실시하였다. 혈청이 없는 상태로 각 세포를 30분 배양한 후 Krebs-Ringer-phosphate-HEPES 완충액으로 씻고, 100 nM 인슐린이 있거나 없는 상태에서, EGCG 농도 0, 0.1, 1.0, 또는 10 μ M에 20분간 노출시켰다. 당수송은 2-deoxy-[³H]-glucose (0.1 mM, 0.5 μ Ci/ml)를 포함시킨 후 10 분에 차게 냉각된 포스페이트완충 식염수로 반응을 정지시켰다. 세포들은 0.2 M NaOH가 포함된 식염수로 용해되었으며, 이후 방사능을 측정하여 값을 얻었다. 기저 및 인슐린자극 포도당 흡수율이 EGCG 농도에 비례하여 감소하는 것을 관찰하였다(도 3). 이 결과는 도 1C 및 도 2에서의 녹차 및 갈레이트 카테킨의 혈당상승 효과가 혈중 갈레이트 카테킨이 세포내로의 당흡수를 방해하여 나타난 것임을 보여준다.
- <40> <시험예 4. 에피갈로카테킨 갈레이트(EGCG)가 혈당 및 인슐린에 의한 쥐 혈당 감소율에 미치는 영향>
- <41> 쥐를 4시간 공복시킨 후 EGCG(10 mg/kg)가 함유된 식염수를 꼬리정맥으로 주사하고 혈당을 관찰하였다(도 4). EGCG 주사 30 분후 혈당이 식염수만을 투여 받은 대조군에 비해 현저히 증가되었으며, 이후 복강으로 투여된 인슐린(1 IU/kg)에 대한 혈당강하 반응도 EGCG 주사군에서 더욱 둔화되었다(도 4의 A와 C). 이 결과는 EGCG가 혈중에서 혈당을 직접 증가시키며, 그로 인해 동량의 인슐린에 대해 세포들의 포도당 제거가 대조군에 비해 느려진다는 것을 의미한다. Kir6.2 knock-out mice에서도 똑같은 반응을 보여(도 4의 B와 D), 갈레이트 카테킨의 혈당 상승 기전은 ATP-민감성 칼륨통로와는 무관한 것으로 생각되었다.
- <42> <시험예 5. 갈레이트 카테킨 결핍 녹차추출액의 효과>
- <43> 시험예 4에서 EGCG 만으로도 혈당이 증가하는 결과를 바탕으로 녹차 추출액의 영향을 조사하였다. 실시예 1에서 제조한 녹차분말(이하 "GTE"라 칭함)을 식염수에 녹여 여과한 후, 4시간 금식 쥐에 GTE 100 mg/kg의 용량으로 정맥주사하였을 때, 30 분 후 혈당이 역시 유의하게 증가하는 것을 관찰하였다(도 5A 및 B). 이후 인슐린을 복강으로 주입하였을 때 혈당 감소율도 현저히 떨어짐을 관찰하였다. 한편 실시예 2에서 제조한 갈레이트 카테킨 결핍 녹차분말(이하 "GTE-GC"라 칭함)을 100 mg/kg의 용량으로 정맥주사한 군에서는 대조군과 마찬가지로 30분 후 혈당의 증가가 없었으며, 인슐린 반응성도 개선되었다. 4시간 공복과는 달리 12시간 금식시킨 쥐를 사용하여 녹차분말 주입만으로는 혈당이 올라가지 않도록 한 후, GTE 또는 GTE-GC를 각각 100 mg/kg씩 정맥주사하고, 30 분후 복강당부하검사를 실시한 결과 GTE-GC군에서 혈당 증가가 현저히 개선되고 대조군에 근접함을 알 수 있었

다(도 5C). 반면 GTE(900 mg/kg), EGCG(100 mg/kg) 또는 GTE-GC(900 mg/kg)를 경구로 포도당과 함께 투여하였을 때는 혈당강하 효과가 GTE에서 더욱 좋게 나타났으며, EGCG 단독투여군 또는 GTE-GC군에서는 효과가 약하였다(도 5D). 이는 혈액에서 혈당을 올리는 것이나 위장관에서 당흡수를 억제하여 혈당을 낮추는 것이나 모두 그 원인은 카테킨 중 갈레이트 카테킨이라는 사실을 뒷받침한다. 또한 EGCG 단독 투여 보다는 갈레이트 카테킨들이 복합적으로 존재할 때 효과가 커지는 현상이 관찰된다.

<44> <시험예 6. 녹차추출물과 메톡시폴리에틸렌 글리콜(mPEG) 동시복용의 효과>

<45> 메톡시폴리에틸렌 글리콜(mPEG)이 녹차의 갈레이트 카테킨(GC)에 대한 선택적인 친화성이 있다는 것을 바탕으로 GC의 혈액내로의 흡수를 억제시킬 것이라는 가정하에 녹차추출물(GTE)과 mPEG를 동시에 경구복용을 시행하였다. 쥐에서 GTE 900 mg/kg를 mPEG(EGCG 100 mg당 100 mg 사용)와 함께 복용한 후 즉시 경구당부하검사(2 g/kg)를 실시한 결과 위장관에서 당 흡수억제효과가 GTE만을 복용한 군과 차이가 없어, mPEG가 위장관에서 GTE의 당흡수 억제효과를 방해하지 않음을 알 수 있었다(도 6A). 녹차 추출물(그 중 125 또는 500 mg EGCG 함유)의 혈당을 올리는 혈액내 효과와 혈당을 낮추는 위장관내의 효과를 동시에 관찰하기 위해 경구 당부하검사(2 g/kg)를 한시간 연장하여 3시간 동안 사람에서 실시하였다(도 6B). 사람에서도 GTE만을 준 군과 mPEG를 섞어 준 군의 위장관 효과는 거의 차이가 발견되지 않았다. 그러나 GTE만 투여한 군은 2시간 이후부터 혈당이 대조군보다 높게 나타났으나, mPEG와 함께 복용한 군은 2시간 후부터도 혈당이 대조군과 다르지 않았다. 이는 GTE만을 주었을때 초기 2시간 동안 위장관 효과(당흡수 방해로 인한 혈당 강하)가 나타나지만, GTE 자체가 혈액내 흡수되어 2시간 이후부터 결국 당을 대조군 보다 올리며(혈액으로부터 세포내로의 당이동 억제효과), 이러한 혈액내 효과를 mPEG 동시 복용이 해결해 줄 수 있다. 결국 식사와 함께 복용하는 초기에는 GTE가 혈당을 감소하는 것으로 보이지만, GTE 자체가 혈중으로 들어가 혈당을 올리며, 이때 과량의 당의 공급이 다시 일어나면 혈당을 더욱 상승시키게 될 것이다. 이러한 GTE 복용시의 양가적 혈당조절 효과가 이제까지 녹차추출물이 그 자체의 복용만으로는 당뇨치료제로서 개발될 수 없었던 한계로 보여진다(Polychronopoulos 등, 2008). 실험결과를 확증하기 위해, 포도당을 녹차추출물 복용 한시간 후에 경구 투여하여 녹차가 혈중으로 흡수된 후의 혈중 효과를 본 결과, GTE만 먹인 사람에서는 혈당과 인슐린이 대조군에 비해 유의하게 높게 나타났지만, mPEG와 함께 준 군은 혈당과 인슐린이 대조군 수준으로 유지됨을 알 수 있었다 (도 6C 및 D).

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<46> 본 발명을 이하의 실시예를 들어 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명은 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.

<47> <실시예 1. 녹차 추출액 및 그 분말의 제조>

<48> 20 g의 건조된 녹차 잎(상품명: 세작, 제조사: 보성녹차명가, 전남)을 500 ml의 물에 넣고, 80℃로 5분간 교반하였다. 이후 0.45 μm 필터로 걸러 고형 잎 성분을 제거한 후 추출된 액(녹차추출액)을 동결건조시켜 3 g의 분말을 얻었다. 분말 그램당 카테킨의 함량을 HPLC를 이용하여 분석한 결과 EGCG 99 mg, ECG 53 mg, EGC 56 mg, EC 31 mg으로 나타났다.

<49> <실시예 2. 갈레이트 카테킨-결핍 녹차 분말의 제조>

<50> 실시예 1과 동일하게 제조된 녹차추출액에 2 g의 폴리에틸렌 글리콜 비드[PEG(3,000~4,000) bead]를 넣고 5분간 실온에서 교반하였다. 이후 0.45 μm 필터로 걸러 PEG(3,000~4,000) bead를 제거한 다음 그 추출액을 동결건조하여 분말을 얻었다. HPLC 정량을 수행한 결과 분말 그램당 카테킨의 함량은 EGCG 16 mg, ECG 7 mg, EGC 45 mg, EC 27 mg 이었다. 이로써 PEG는 카테킨 중 갈레이트 카테킨에 선택적 친화도가 있음을 알 수 있다.

<51> <실시예 3. 녹차 추출액의 제조>

<52> 30 g의 건조된 녹차 잎을 500 ml의 물에 넣고, 80℃로 3분간 교반하였다. 이후 0.45 μm 필터로 걸러 고형 잎 성분을 제거하여 녹차 추출액 350 ml를 얻었다. 얻어진 추출액 350 ml 에는 EGCG 약 500 mg과 ECG 약 260 mg이 포함되어 있는 것을 HPLC 사용으로 정량하여 확인하였다.

<53> <실시예 4. 약학 조성물 제제예>

<54> 실시예 4-1: 정제의 제조

<55> EGCG, ECG, 또는 이들 혼합물 50mg, 폴리에틸렌 글리콜(4,000) 50mg, 전분 20mg 및 스테아린산 마그네슘 적당량을 통상의 정제 제조방법에 따라 타정하여, 정제형의 혈당조절제를 제조하였다.

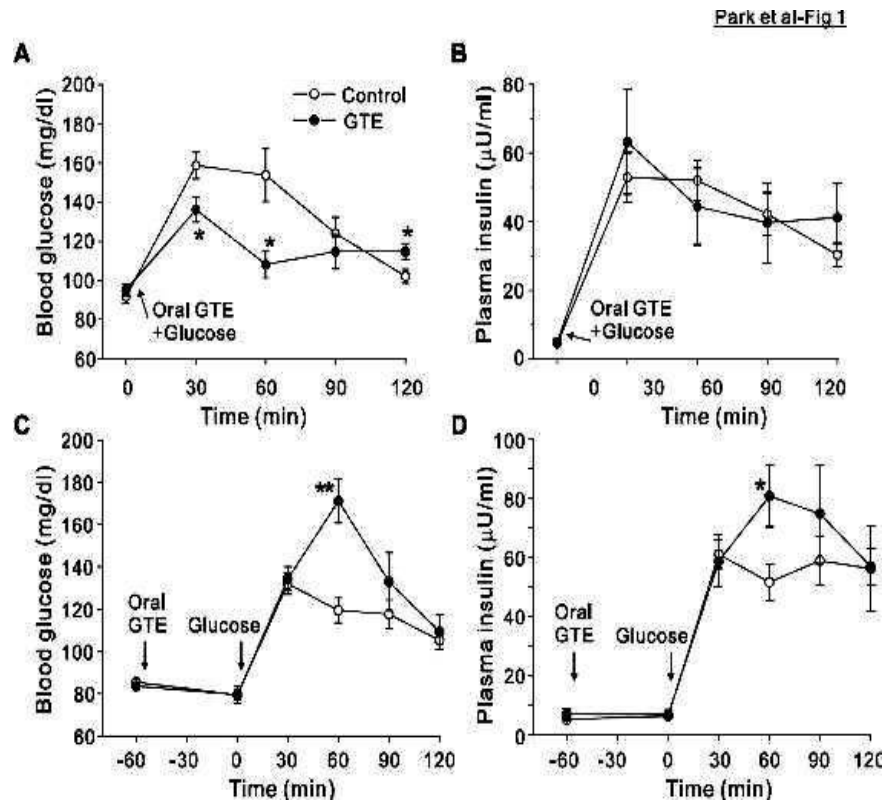
- <56> 실시예 4-2: 캡셀제의 제조
- <57> EGCG, ECG, 또는 이들 혼합물 50mg, 폴리에틸렌 글리콜(4000) 50mg, 전분 19mg, 탈크 1mg 및 스테아린산 마그네슘 적당량을 통상 캡셀제의 제조방법에 따라 캡셀에 충전하여, 캡셀제형의 혈당조절제를 제조하였다.
- <58> 실시예 4-3: 과립제의 제조
- <59> EGCG, ECG, 또는 이들 혼합물 50mg, 폴리에틸렌 글리콜(4000) 50mg, 유당25mg을 통상의 압출조립기로 압출시켜서, 과립제형의 혈당조절제를 제조하였다.
- <60> <실시예 5. 건강식품 제제예>
- <61> 실시예 5-1: 건강식품의 제조
- <62> EGCG, ECG, 또는 이들 혼합물 20mg, 폴리에틸렌 글리콜(4000) 20mg, 비타민 혼합물 적량, 비타민 A 아세테이트 70 mg, 비타민 E 1.0 mg, 비타민B1 0.13 mg, 비타민 B2 0.15 mg, 비타민 B6 0.5 mg, 비타민 B12 0.2 mg, 비타민 C 10 mg, 비오틴 10 mg, 니코틴산아미드 1.7 mg, 엽산 50 mg, 판토텐산 칼슘 0.5 mg, 무기질 혼합물 적량, 황산제1철 1.75 mg, 산화아연 0.82 mg, 탄산마그네슘 25.3 mg, 제1인산칼륨 15 mg, 제2인산칼슘 55 mg, 구연산 칼륨 90 mg, 탄산칼슘 100 mg, 염화마그네슘 24.8 mg, 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물은 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였다. 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

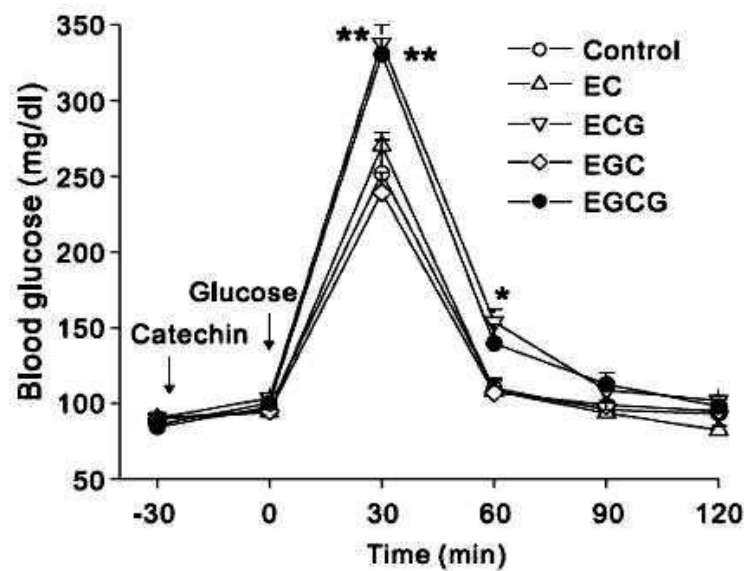
- <63> 도 1 은 사람 당부하검사에서 녹차추출액 복용이 복용시간에 따른 혈당과 혈중 인슐린 농도에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
- <64> 도 2 는 혈당 상승에 영향을 미치는 녹차 성분에 대한 그래프이다.
- <65> 도 3 은 EGCG가 지방세포(3T3L1 세포주), 간세포(HepG2 세포주), 골격근세포(L6 세포주) 및 췌장 베타세포(INS-1 세포주)의 기저(basal) 및 인슐린자극(insulin-stimulated) 포도당 흡수에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
- <66> 도 4 는 EGCG가 혈당 및 인슐린에 의한 쥐 혈당 감소율에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
- <67> 도 5는 갈레이트 카테킨 결핍 녹차추출액의 효과를 나타내는 그래프이다.
- <68> 도 6 은 녹차추출물과 mPEG 동시복용의 효과를 나타낸 그래프이다.

도면

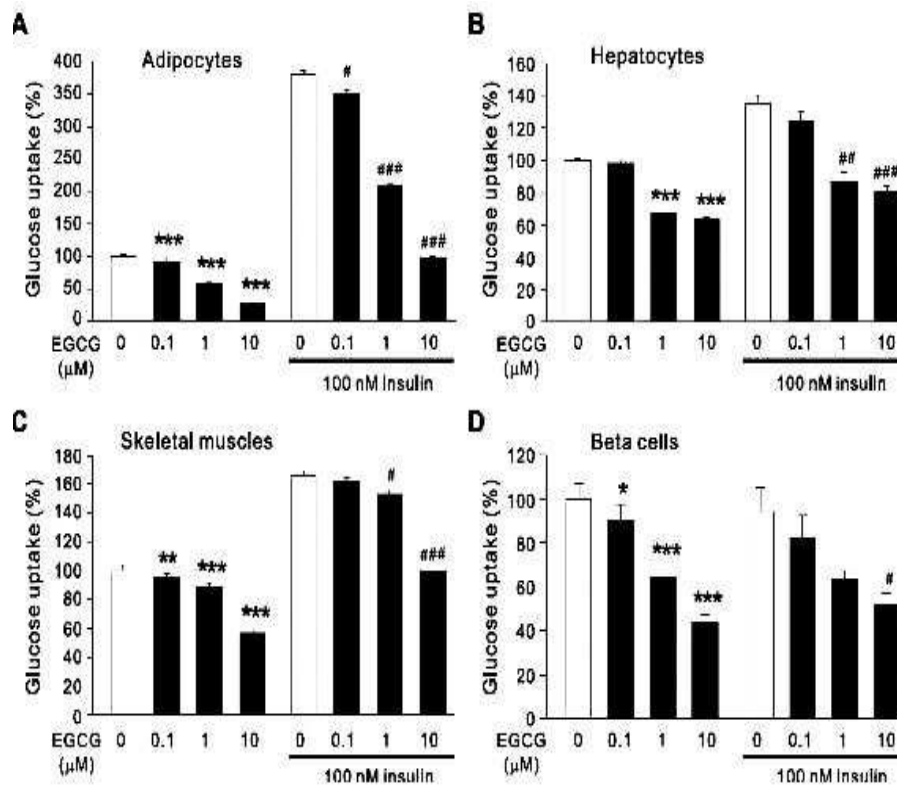
도면1



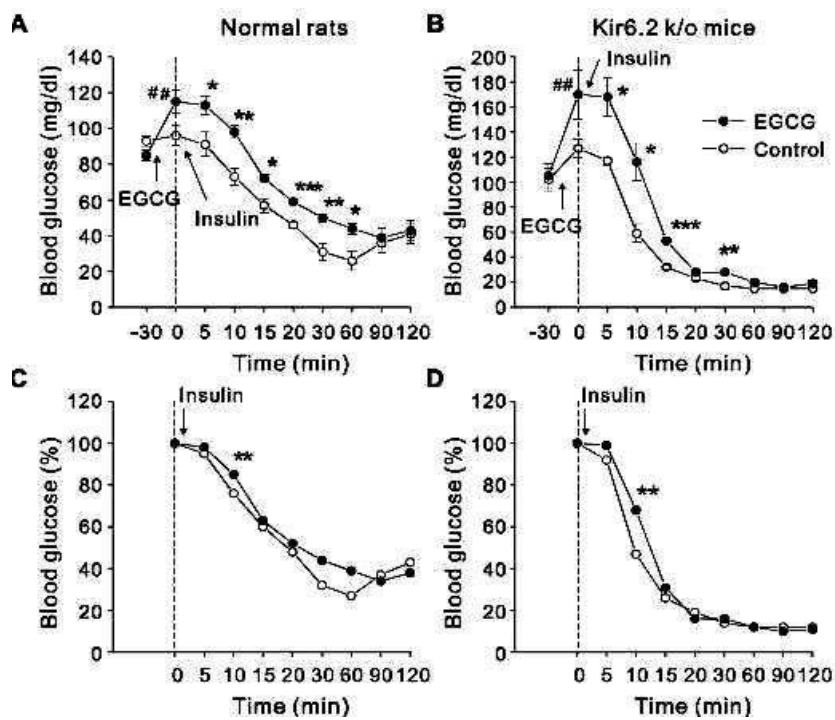
도면2



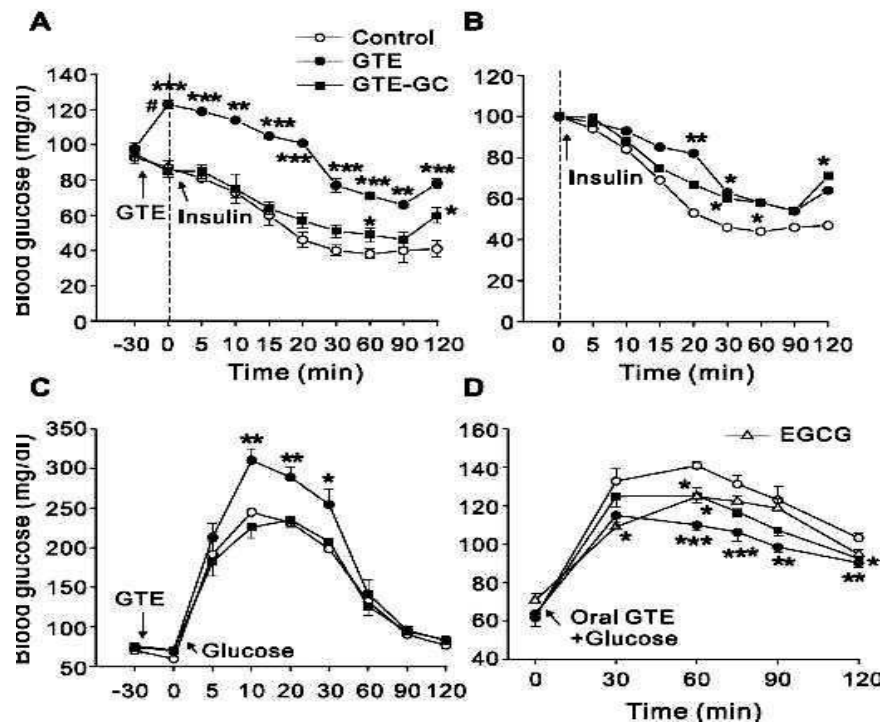
도면3



도면4



도면5



도면6

