

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2010-0104482 (43) 공개일자 2010년09월29일
(51) Int. Cl. <i>A61K 31/7048</i> (2006.01) <i>A61P 3/10</i> (2006.01) <i>A61K 36/899</i> (2006.01) <i>A23L 1/30</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0022925 (22) 출원일자 2009년03월18일 심사청구일자 2009년03월18일 기술이전 희망 : , 실시권허여, 기술지도	(71) 출원인 한림대학교 산학협력단 강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교 (72) 발명자 이재용 강원도 춘천시 퇴계동 그린타운아파트 103-1303 폴 콜로드지엑직 4500-50 Street, Olds College School of Innovation, Olds, Alberta, Canada T4H 1RC (뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 췌장베타세포를 보호하는 활성과 혈당조절 활성이 우수한 흑옥수수 안토시아닌 (purple corn anthocyanins)

(57) 요약

본 발명은 유효성분으로서 흑옥수수 안토시아닌(purple corn anthocyanins) 및 그와 같은 성분을 함유하는 당뇨병에 기인한 췌장베타세포의 소실로부터 췌장베타세포를 보호하는 활성과 혈당조절 활성이 우수한 당뇨병의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기조성물은 건강기능식품 또는 의약품의 제조에 적용될 수 있다.

대표도 - 도7



(72) 발명자

안나 바코우스카-마크작

4500-50 Street, Olds College School of
Innovation, Olds, Alberta, Canada T4H 1RC

임순성

강원 춘천시 퇴계동 현진아파트 102-805

홍수희

강원도 춘천시 후평1동 현대1차아파트 103-805

특허청구의 범위

청구항 1

췌장베타세포를 보호하는 활성과 혈당조절 활성이 우수한 흑옥수수 안토시아닌

청구항 2

제1항에 있어서, 흑옥수수 (*Zea mays*)에서 분리되는 흑옥수수 안토시아닌

청구항 3

제1항에 따른 흑옥수수 안토시아닌 포함하는 외부의약조성물

청구항 4

제1항에 따른 흑옥수수 안토시아닌을 포함하는 건강기능식품 조성물

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 당뇨병에 기인한 췌장베타세포 소실을 막아 췌장베타세포를 보호하는 활성과 혈당조절 활성이 우수한 흑옥수수 안토시아닌에 관한 것으로, 보다 상세하게는 제 2형 당뇨병모델동물인 db/db mouse에서 췌장베타세포를 보호하는 활성과 혈당조절 활성이 우수한 흑옥수수 안토시아닌 및 그와 같은 안토시아닌에 관한 것으로 상기조성물은 건강기능식품 또는 의약품의 제조에 적용될 수 있다.

배경 기술

[0002]

췌장베타세포에서 생산되어 혈액내의 당의 농도를 감소시키는 인슐린이 부족할 경우 고혈당을 만들어내는데 이 인슐린 부족이 원인인 당뇨병을 1형 당뇨병이라고 하고 인슐린이 분비되기는 하나 그 작용이 약한 것이 원인인 경우를 2형 당뇨병이라고 부른다. 전자는 젊은 사람에게 흔히 발병하고, 후자는 중년 이후에 많으며, 유전소질에 비만, 과식, 스트레스 등 발병인자가 더해져서 천천히 발병한다. 대부분의 당뇨병은 2형 당뇨병으로서 대표적인 성인병의 하나이다. 현재 사용되고 있는 당뇨치료제는 대부분이 인슐린 주사제와 경구투여용으로 사용하는 혈당강하제이다. 경구투여용으로 사용되고 있는 혈당강하제는 다음의 다섯 종류인데 Biguanide의 일종인 metformin, PPAR γ 를 활성화시키는 thiazolidinedione계열의 pioglitazone과 rosiglitazone, 소장에서 탄수화물의 흡수를 지연시켜 식후 혈당치가 급격히 상승하는 것을 막아주는 α -glucosidase 저해제들, 그리고 췌장의 β -세포에서의 인슐린 분비를 촉진시키는 sulfonylureas와 non-sulfonylureas이다. 최근에는 인슐린의 분비를 촉진하고 혈당을 떨어뜨리는 역할을 하는 “인크레틴” 효소를 바로 분해하는 “DPP-IV” 효소를 선택적으로 억제하는 저해하여 “인크레틴” 효소가 장시간 높은 농도로 유지되도록 하는 중요한 기능을 하는 DPP-IV 저해제가 개발되어 시판되고 있다. 현재까지 2형 당뇨의 1차 치료제 시장에서 metformin과 sulfonylurea가 대부분을 차지하는 가운데, 2-3차 치료제 시장에선 PPAR-감마 작용제를 중심으로 자누비아와 '바이에타 (Byetta, exenatide)가 경쟁하고 있으며, 자누비아는 주로 3차 치료 이후에 처방되고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0003]

당뇨치료제라고 개발된 약제들은 실제로는 어느 것도 췌장베타세포가 소실되거나 나빠진 것을 치료하는 근원치료제가 아니며 단지 약제 처리 시 일시적인 혈당강하 효과를 보여주는 인슐린의 분비제이거나 혈당강하제이다. 현재까지 베타세포를 보호하고 소실된 베타세포를 재생시켜주는 근원치료제의 개발은 아직도 보고된 바가 없으며, 이 근원치료제의 개발이 절실히 필요한 상황이다. 본 발명이 이루려는 기술적과제는 바로 여러 원인에 기

인한 췌장베타세포의 소실과 기능상실을 근원적으로 해결하여 건강하고 풍부한 베타세포를 만들어주는 활성을 가진 흑옥수수의 안토시아닌 및 그와 같은 안토시아닌을 포함하는 당뇨병의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0004] 췌장베타세포의 손상 과 소실은 1형 당뇨병과 2형 당뇨병 모두에서 나타나는 근본적인 문제이지만 현재 이를 해결하는 근원 치료제가 없는 상태이다. 본 과제는 실시예에서 나타나있듯이 흑옥수수로부터 안토시아닌을 분리하는 방법을 제공하고, 2형 당뇨병모델동물인 db/db mouse를 사용하여 흑옥수수의 안토시아닌이 점진적인 췌장 베타세포의 손상과 소실로부터 베타세포를 보호해주는 활성과 혈당조절 활성이 우수하다는 사실을 제공함으로써 흑옥수수의 안토시아닌과 그와 같은 안토시아닌을 포함하는 조성물을 당뇨병의 예방 또는 치료용 건강기능 식품 또는 의약품으로 활용할 수 있도록 하는 것이다.

효 과

[0005] 이상에서 상술한 바와 같이 본 발명은 췌장베타세포를 보호하는 활성과 혈당조절 활성이 우수한 흑옥수수 안토시아닌 및 그와 같은 안토시아닌을 포함하는 조성물을 이용하여 당뇨병의 예방 또는 치료용 건강기능식품 또는 의약품의 소재를 개발 공급할 수 있다.

[0006] 본 발명의 단순한 변형 또는 변경은 모두 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 실시될 수 있으며 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0007] 이하, 본 발명의 바람직한 실시예를 제시한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위하여 제시되는 것일 뿐 본 발명의 범위가 실시예에 한정되는 것은 아니다. 흑옥수수로부터 안토시아닌을 추출하는 방법의 실시예는 새로운 방법이 아니며 어떤 다른 분리 방법도 가능하다. 2형당뇨모델 동물로 사용한 db/db mouse는 2형 당뇨병 연구에 많이 사용되고 있으며, 약 10주 경과 후부터 혈당이 증가되고, 베타세포가 점차 소실되는 특징을 가지고 있다. db/db mouse를 실험동물로 사용하여 흑옥수수 안토시아닌을 7주동안 투여하면서 흑옥수수 안토시아닌의 췌장베타세포 소실을 보호하는 활성과 혈당조절 활성을 입증하였다.

[0008] [실시예 1] 흑옥수수 안토시아닌추출물의 제조

[0009] 1-1. 흑옥수수의 확보

[0010] 흑옥수수는 중국과 페루에서 주로 재배되고 있으며 원명은 일반옥수와 같이 *Zea mays* 이나 흑옥수수는 변종(variant)의 하나이다. 중국산과 페루산, 캐나다산, 국내산은 안토시아닌의 성분이 다소 달라 췌장베타세포 소실을 보호하는 활성과 혈당강화활성이 약간 다를 수 있다.

[0011] 1-2. 흑옥수수 안토시아닌추출물의 제조

[0012] 100g의 건조된 흑옥수수를 200 ml에 물을 가하고 믹서(mixer)에서 잘게 부수고 혼합액을 80 ℃에서 5분간 가열한다. 300 ml의 에탄올(주정)을 5ml의 초산(acetic acid)와 함께 가하고 2.5 시간 동안 안토시아닌을 추출한다. 혼합액을 4 ℃에서 30분간 원심분리하여 추출액을 따로 모은다. 잔여물에 다시 600ml의 1% 초산(acetic acid)를 포함하는 60% 에탄올을 가하여 같은 방법으로 추출하고 추출액을 모아서 1차 추출액과 합친다. 모여진 추출액(supernatant)을 40° C에서 진공회전증발기(rotary evaporator)에서 용매를 제거한다. 농축물을 0.1% 초산(acetic acid)를 포함하는 물에 녹이고 비이온성 흡착흡착컬럼(nonionic polymeric absorbent column) (Amberlite, Diaion 등)에 넣어주고 0.1% 초산(acetic acid)를 포함하는 물로 세척한다. 물로 다시 세척한 후 안토시아닌은 0.1% 초산(acetic acid)를 포함하는 에탄올로 용출(elution)시킨다. 용출액(eluate)을 진공회전증발기에서 건조시키고 건조물을 0.1% 초산(acetic acid)를 포함하는 물에 녹인다.

- [0013] [실시예 2] 베타세포를 이용한 당뇨개선 효능평가
- [0014]
- [0015] 2-1. 시험관내 (in vitro) 세포의 생존력 측정
- [0016] 햄스터 판크레아스의 베타세포주인 HIT-T15를 10% FBS (fatal bovine serum), 2 mM L-glutamine, 100 IU of penicillin-G and 100 µg/ml of streptomycin를 포함하는 RPMI1640배지를 사용하여 5% CO₂, 37 ° C에서 세포 배양기를 사용하여 배양한다. 세포배양용 디쉬나 multiwell plates에 세포를 1.05.0×10⁵ cells/ml의 밀도로 접종하고 80%까지 도달했을 때 세포에 여러 물질을 첨가하여 생존력을 검사한다. 매 2일마다 배지를 갈아주고, HIT-T15의 생존력에서 안토시아닌들의 영향을 평가하기위해 24-well plate에서 1×10⁵ 의 HIT-T15세포에 여러 농도의 안토시아닌을 첨가하고 평가한다. 세포 생존력은 MTT reduction assay에 의해 분석하였다. 실험 결과 도 1 에 나타난 바와 같이 흑옥수수 안토시아닌은 100 µg/ml 까지 세포에 독성이 전혀 없었으며 오히려 세포성장을 촉진하였다.
- [0017]
- [0018] 2-2. 세포의 인슐린 분비 및 인슐린 분석
- [0019] HIT-T15세포주를 30분 동안 37 ° C에서 glucose가 없는 KRB buffer (Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer, 115 mM NaCl, 4.7mM KCl, 2.56 mM CaCl₂, 1.2mM KH₂PO₄, 1.2mM MgSO₄, 20mM NaHCO₃, pH 7.4)에서 배양하고 11.1 mM glucose를 포함하는 KRB buffer로 바꾸고 60분간 배양한다. 세포배양액을 3000g에서 5분간 원심 분리한 다음 상층액을 -80 ° C에 인슐린 분비분석을 위해 보관한다. 세포배양액에 분비된 인슐린은 rat insulin을 표준물질로 ELISA insulin kit를 사용하여 측정한다. 단백질은 albumin을 표준물질로 BCA protein assay reagent kit (PIERCE)를 사용하여 분석하였다. 실험 결과 도 2에 나타난 바와 같이 흑옥수수 안토시아닌은 100 µg/ml에서 인슐린 분비를 촉진하였다.
- [0020] [실시예 3] 2형 당뇨모델 마우스를 이용한 당뇨 개선효능 평가
- [0021] 3-1. 실험동물 및 식이
- [0022] 본 실험은 제2형 당뇨 동물모델인 Specific-pathogen-freen male C57BL/KsJ-db/db mice(중앙실험동물(주))를 구입하여 일정한 온도 (25℃)와 습도 (50±5%)하에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 마우스를 실험군(시료 처리군)과 대조군(시료 무처리군) 및 양성대조군(glimepiride)으로 각각 6마리를 사용하여 당뇨개선 효능을 평가하였다. 각 그룹에 체중 kg당 10 mg/일을 7주간 경구(oral gavage) 투여하였다. 매주 체중의 변화를 측정하였고 hepatin 처리된 모세관으로 안와 채혈하여 얻어진 혈액을 원심분리하여 혈당을 얻었다.
- [0023] 3-2. 체중변화
- [0024] 체중은 체중계를 사용하여 매주 측정하였으며 도 3에 나타난 바와 같이 체중의 변화는 군에 상관없이 거의 일정하게 유지되었다.
- [0025] 3-3. 혈당변화
- [0026] 매주 한번 씩 대조군과 실험군의 공복 혈당을 portable glucose meter (OneTouch Ultra)를 사용하여 매주 측정하였다. 도 4에 나타난 바와 같이 흑옥수수 안토시아닌 (purple corn, PCP) 투여군의 혈당은 대조군이나 양성대조군 (glimepiride 투여군)에 비교하여 유의적인 감소를 보였다. 흑옥수수 안토시아닌이 인슐린분비제 처방약인 glimepiride 보다 같은 투여량에서 더 우수한 혈당강하 효과를 보여주었다.
- [0027] 3-4. 당화혈색소(HbA1c)

[0028] 장기간 동안의 평균 혈당의 상태를 알 수 있는 방법으로 당화혈색소를 측정하였다. 본 실험에서 2형 당뇨병모델인 db/db mouse에 무처리 (대조군), Glimipiride(양성대조군), 흑옥수수 안토시아닌 (처리군, PCP)을 처리하고 1주 및 7주째 HbA1c를 측정하였다. 실험결과 도 5에 나타난 바와 같이 당화혈색소(Hb1AC)는 이흑옥수수 안토시아닌 처리군 (PCP)이 양성대조군인 Glimipiride보다도 약간 낮은 것으로 나타나 흑옥수수 안토시아닌이 장기적인 혈당조절 능력이 우수하다는 것이 입증되었다.

[0029] 2-5. 경구 당부하검사 (Oral Glucose Tolerance Test)

[0030] 단기간 혈당조절 능력을 시험하기 위하여 7주의 처리 후에 마우스를 공복 시키고 glucose (0.2g/kg)를 경구투여한 후 혈액샘플을 여러 시간 별로(0-120min) 안와정맥에서 채혈하여 혈당을 측정하여 실험군과 대조군을 비교하였다. 실험결과 도 6에 나타난 바와 같이 흑옥수수 안토시아닌 처리군 (PCP)이 양성대조군인 Glimipiride보다 혈당을 더 잘 감소시킨다는 결과를 보여주었고, 흑옥수수 안토시아닌을 투여한 쥐는 단기적인 혈당조절능력이 정상화되었다는 것을 입증하였다.

[0031] 2-6. 베타세포의 면역조직화학적 분석 (Immunohistochemistry)

[0032] 마우스를 phenobarbital sodium (10 mg/100 g body weight i.p.)으로 완전히 마취시키고, 0.9% saline and 4% paraformaldehyde in 0.1 mol/L PBS (pH 7.4)으로 심장을 통하여 관류한다. 채장을 잘라내고 4% paraformaldehyde에 6시간 동안 고정시키고, paraffin에 embed시킨다. 5- μ m 두께 slice로 자르고 1% bovine serum albumin (BSA)를 포함하는 PBS에 희석된 1차 antibody (guinea pig anti-insulin antibody)로 4 ° C 14 시간 동안 배양한다. 다음 실온에서 30분간 2차 antibody (biotinylated goat anti-guinea pig IgG antibody:1:1000)로 배양하고, horseradish peroxidase-conjugated streptavidin으로 처리하여 발색하였으며 현미경에서 관찰하고 사진을 촬영하였다. 실험결과 도 7에 나타난 바와 같이 당화혈색소(Hb1AC)는 이흑옥수수 안토시아닌 처리군 (PCP)이 양성대조군인 Glim보다도 약간 낮은 것으로 나타나 흑옥수수 안토시아닌이 장기적인 혈당조절 능력이 우수하다는 것이 입증되었다. 2형 당뇨병모델인 db/db mouse의 대조군 (무처리군)에서는 췌장 islet의 인슐린 분비 세포 (베타세포)의 수가 islet내에서 상당히 감소되었으나 양성대조군인 glimepiride 처리군에서는 다소 증가되었으며, 흑옥수수 안토시아닌 처리군 (PCP)에서는 뚜렷하게 증가된 것이 관찰되어, 흑옥수수 안토시아닌이 인슐린을 분비하는 베타세포를 보호해준다는 사실을 입증하였다.

[0033] 2-7. 2형 당뇨병모델 마우스에서 기초 안전성 평가

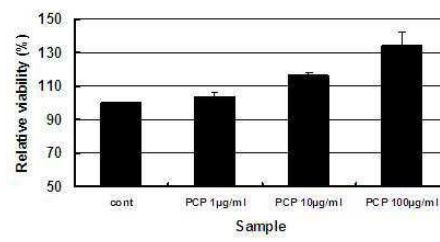
[0034] 2형 당뇨병모델 동물인 db/db mouse에 흑옥수수 안토시아닌을 10mg/kg/day의 양으로 경구 7주간 투여 후 행동양상 검사에서 무처리군과 전혀 차이를 주지 않았으며 각 장기의 상태를 육안으로 분석한 결과 무처리군과 아무런 차이를 발견하지 못하였음. 결론적으로 db/db mouse에 경구 투여 시 흑옥수수 안토시아닌의 독성이 없음을 입증하였다.

도면의 간단한 설명

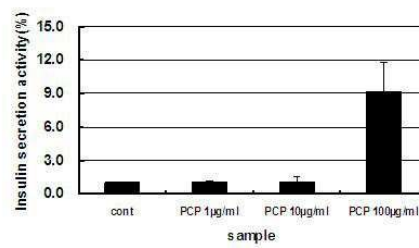
[0035] 도 1은 햄스터 췌크레아스의 베타세포주인 HIT-T15의 세포배양에 흑옥수수 안토시아닌을 여러 농도로 첨가하고 세포의 성장을 저해하는지를 MTT분석법으로 조사한 결과이며, 도 2는 흑옥수수 안토시아닌의 첨가에 의한 베타세포주인 HIT-T15의 인슐린의 분비정도를 보여주는 결과이다. 도 3, 4는 제2형 당뇨 동물모델인 db/db mouse에 대조구인 glimepiride (인슐린 분비촉진제)과 흑옥수수 안토시아닌을 7주 동안 섭취시키면서 체중 (도 3)과 혈당의 변화 (도 4)를 분석한 결과이다. 도 5는 1주와 7주에서 장기간의 평균 혈당의 상태를 나타내주는 당화혈색소 (Hb1Ac)의 분석결과를 보여주고, 도 6은 단기적인 해당능력을 보여주는 경구당부하 측정 (Oral glucose tolerance test, OGTT) 결과를 보여준다. 도 7은 db/db mouse에 흑옥수수 안토시아닌, 양성대조군인 glimepiride를 7주 동안 섭취시킨 후 췌장의 islet에서 베타세포의 분포를 insulin에 대한 항체로 분석한 면역조직화학염색의 결과이다.

도면

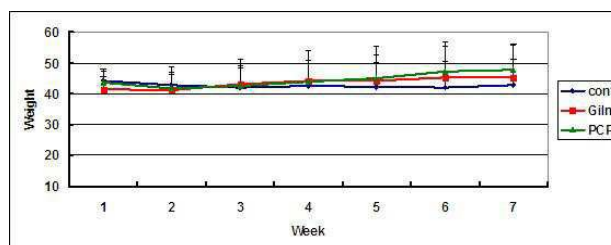
도면1



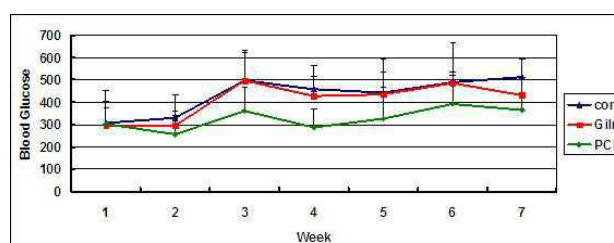
도면2



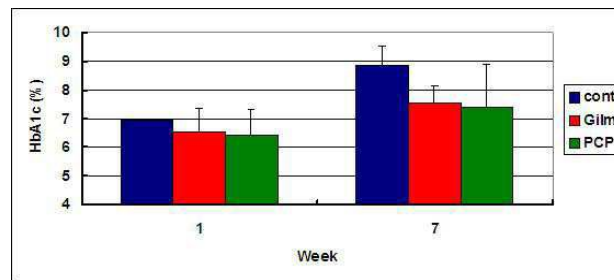
도면3



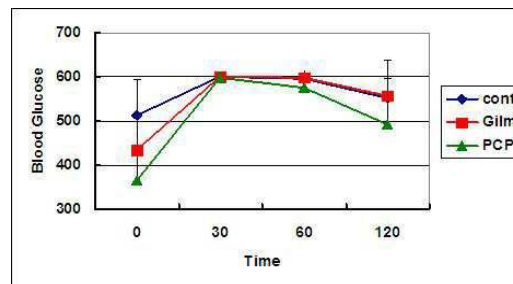
도면4



도면5



도면6



도면7

