



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2016-0047862

(43) 공개일자

2016년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/63 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2014-0144318

(22) 출원일자

2014년10월23일

심사청구일자

2014년10월23일

기술이전 희망 : , 실시권하여, 기술지도

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

임순성

강원도 춘천시 후석로 334 포스코 더샵아파트 105-301

이수경

강원도 춘천시 서부대성로 327 동아아파트 102-601

(뒷면에 계속)

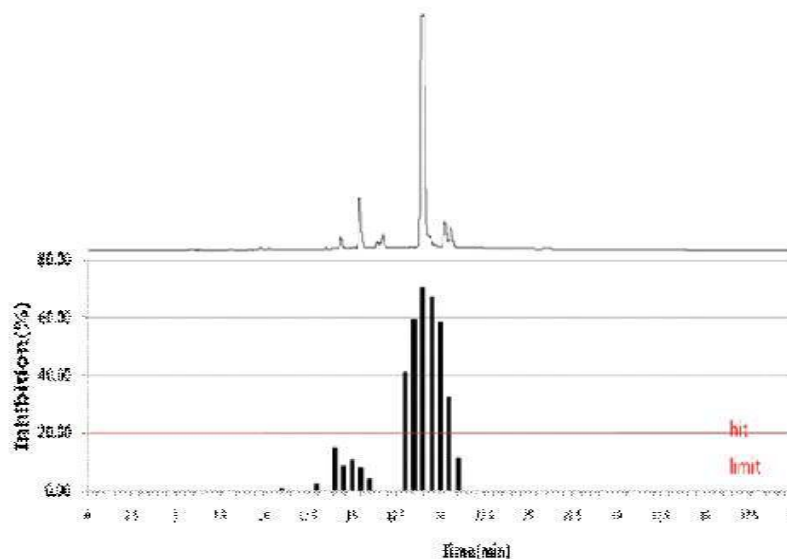
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 당뇨병성 합병증 치료 및 억제 작용을 갖는 목서초 추출물을 포함하는 조성물

(57) 요약

목서초(*Reseda odorata* L.) 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병성 합병증 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 알도스 환원효소 억제활성 작용이 뛰어나 당뇨병 합병증의 예방 및/또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

왕지강

강원도 춘천시 옥천동 한림대학교길 1(옥천동) 생명과학관 5층 8510호

강범구

강원도 춘천시 퇴계로 172 주공아파트 211-1105

장영수

강원도 횡성군 횡성읍 향교서로 1

박윤하

경기도 구리시 동구릉로53번길 85 아름마을 성원아파트 1차 301-302

권신화

경기도 남양주시 호평로 205-5 중흥2차 아파트 1907-1003

박태식

서울특별시 성북구 북악산로 705 장원아파트 202호

이원석

서울특별시 강동구 성내로 6 다길 42 몽촌토성아파트 403호

이은비

경기도 구리시 건원대로 56 삼보아파트 310-604

이지호

서울특별시 중랑구 신내로 51 성원아파트 101-906

조은지

서울특별시 송파구 성내천로47길 13

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014-D-7288-010100

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 산학협력선도대학(LINC)육성사업

연구과제명 산학협력선도대학(LINC)육성사업

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2014.03.01 ~ 2015.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

목서초(*Reseda odorata L.*)추출물을 유효성분으로 함유하는 당뇨병증의 예방 또는 치료용 조성물

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 목서초(*Reseda odorata L.*)를 알코올 추출물을 핵산으로 분획하여 얻어진 핵산 분획물; 상기 핵산 분획물을 분리하고 남은 수성층을 메틸렌클로라이드로 분획하여 얻어진 메틸렌클로라이드 분획물; 상기 메틸렌클로라이드 분획물을 분리하고 남은 수성층을 에틸아세테이트로 분획하여 얻어진 에틸아세테이트 분획물; 상기 에틸아세테이트 분획물을 분리하고 남은 수성층을 C1 내지 C4의 직쇄 또는 분지형 알코올로 분획하여 얻어진 알코올 분획물; 및 상기 알코올 분획물을 분리하고 남은 물 분획물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는, 당뇨병증의 예방 또는 치료용 조성물

청구항 3

제1항 내지 제2항 중에 있어서, 상기 알도스 환원효소를 억제함으로써 가능한 당뇨병증 억제 조성물

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 당뇨병증은 당뇨병 망막증(diabetic retinopathy), 당뇨병 백내장(diabetic cataract), 당뇨병 신증(diabetic nephropathy), 당뇨병 신경병증(diabetic neuropathy), 당뇨병 혈관합병증의 예방 또는 치료용 조성물

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 당뇨병증의 예방 또는 개선용 조성물

발명의 설명

기술 분야

[0001] 목서초 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병증 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 알도스 환원효소 억제활성 억제작용이 뛰어나 당뇨병 합병증의 예방 및/또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

배경 기술

[0002] 당뇨병은 인슐린의 부족으로 혈액 중의 포도당(혈당)이 정상인보다 그 농도가 높아져서 소변에 포도당을 배출하는 만성질환으로 인슐린 결핍 및 인슐린 저항성 또는 둘 모두를 특징으로 하는 흔히 비만과 관련되는 진행성 질환(progressive disease)이다. 공복 및 식후 혈당이 증가하면, 실명, 신부전, 심장 질환 및 절단(amputation)을 야기되지만, 혈당 조절의 개선이 이루어지면 합병증의 위험성을 낮추는 것으로 입증되었다.

[0003] 당뇨병 초기의 특징적인 증상으로는 다뇨(polyuria), 갈증(polydipsia), 식욕항진(polyphagia), 체중감소를 들 수 있다.

[0004] 당뇨병에는 1형 당뇨와 2형 당뇨가 있다. 1형 당뇨는 인슐린 의존형(소아형 당뇨)이라고 하며, 2형 당뇨는 인슐린 비의존형(성인형 당뇨)이라고 한다. 1형 당뇨병은 인슐린을 만드는 췌장의 베타세포가 망가져 인슐린을 거의 만들지 못하기 때문에 인슐린 치료가 절대적으로 필요하다. 1형 당뇨병은 전체 당뇨병의 5% 이하이고, 주로 소아나 30세 이하의 젊은이에게 발생하며, 체중이 정상 또는 마른 경우가 대부분이며, 증상으로는 다식, 다뇨, 다갈, 체중감소 등의 당뇨병 증상이 심하게 나타나기도 한다. 2형 당뇨병은 췌장에서 인슐린을 만들기는 하지만 충분한 양이 아니거나, 인슐린에 대한 반응이 저하돼있는 경우로 인슐린 치료가 반드시 필요하지는 않다. 2형 당뇨병의 경우는 체중조절이나 운동 등으로 인슐린에 대한 반응을 높여주거나, 췌장에서 인슐린 분비를 도와주

는 약을 복용한다. 2형 당뇨병은 우리나라 전체 당뇨병의 95% 이상이고 주로 40세 이상의 성인에서 발생하며, 비만이 동반되어있는 경우가 많다.

[0005] 당뇨병증의 주요 원인 폴리올 경로(polyol pathway)의 기작 변화에 의한 삼투압 스트레스 및 자유 라디칼에 의한 산화적 스트레스(oxidative stress) 등으로 설명되고 있다.

[0006] 알도스 환원효소는 망막, 공막, 렌즈, 신장, 적혈구, 뇌, 근육, 간 및 말초신경 등에 존재하는데, 특히 말초신경에서는 포도당 투과가 인슐린에 의하여 영향을 받지 않기 때문에 문제가 될 수 있다. 즉, 고혈당 시 세포에 소르비톨이 과다 축적되면 이로 인하여 삼투압이 증가하여 수초(myelin sheath)의 부종, 괴사 및 붕괴가 발생할 수 있고, 지속적으로 증가한 삼투압으로 인하여 수분이 인입되어 당뇨병 합병증으로 진행된다. 알도스 환원효소 활성화는 산화스트레스를 악화시켜 세포내 미요이노시톨과 타우린의 결핍을 초래하기도 하다. 이는 산화스트레스가 Na^+ -미요이노시톨 콘트랜스포터(Na^+ -myoinositol cotransporter)와 타우리엔 트랜스포터(taurine transporter)를 직접 하향 조절하거나, 소듐-포타슘 아데노신 트리포스파테이즈(sodium-potassium adenosine triphosphatase, ATPase)에 의한 소듐-경사의 방해를 통해 간접적으로 작용해서 미요이노시톨의 세포 내 결핍을 초래한다. 이는 수정체 및 말초신경 등 비교적 고농도의 소르비톨이 축적되는 조직의 합병증 유발기전으로 유력하다. 이들 조직에서는 소르비톨의 농도가 높음에도 불구하고 지속적으로 AR을 발현하여 소르비톨의 축적을 더욱 진행시키게 된다

[0007] 이와 같이 폴리올 경로가 당뇨병증을 유발시킨다. 따라서, 당뇨병증의 발병을 지연하거나 예방 또는 치료하기 위해서는 알도스 환원효소 활성 억제하는 것이 매우 중요하다. 지금까지 개발된 알도스 환원 효소 억제제들인 zopolrestat, ponalrestat, sorbinil, tolrestat, fidarestat, ranirestat와 epalrestat 등이 여러 동물실험에서 당뇨 합병증을 예방, 지연시킨다는 보고가 있다. sorbinil의 과민반응과 tolrestat의 간기능 장애와 같은 부작용으로 보다 안전한 새로운 저해제에 대한 탐색 및 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 목서초 추출물로부터 당뇨병증의 치료 및 예방에 사용될 수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 일례는 목서초의 추출물 및 분획물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 당뇨병증 예방 및/또는 치료용 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0010] 알도스 환원효소의 활성을 저해하여 당뇨병 합병증을 예방 및/또는 치료할 수 있는 천연 식물 추출물을 유효성분으로 하는 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0012] 목서초 추출물 및/또는 상기 추출물의 분획물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병증 예방 및/또는 치료용 조성물이 제공된다.

[0013] 목서초의 이명으로는 미뇨네트, 목서초과에 속하며, 단년초로 지중해연안, 서남아시아가 원산이며, 높이는 약 80센치이고 가지가 장 나옴 근경엽은 로제타형으로 상부는 돌려나기 형식으로 달린다. 꽃은 향기가 좋아 향수나 에센셜 오일의 원료로 사용되며 향낭(sachet), 포프리(potpourri)로 이용된다. 목서초는 미뇨네트(Mignonette)가 회록색을 의미할 정도로 회록색 염료로 이용된다.

[0014] 목서초는 그 사용 부위에 특별한 제한이 없으며, 전초를 사용하거나, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 등의 특정 부위를 사용하여도 무방하다. 상기 추출용매는 물 및 유기용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 상기 알코올 희석수 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매와 에테르, 클로로포름, 벤젠, 헥산 또는 디클로로메탄의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매일 수 있다. 상기 탄소수 1 내지 5의 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 이소프로판올 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 알코올 희석수는 알콜을 50 내지 99.9%(v/v)로 물에 희석한 것일 수 있다.

[0015] 목서초 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 바람직하게는 가압추출법, 환류추출법, 온침 추출법, 초음파 분쇄 추출법 등에 의할 수 있고, 바람직하게는 가압추출법에 의할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 또한, 상기한 바와 같이 제조된 추출물은 이후 감압 여과과정을 수행하거나 추가로 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 농축하거나 용매를 제거할 수 있다.

[0017] 당뇨병증의 유발기전 중 하나인 폴리올 경로(polyol pathway)의 증가는 세포손상을 일으키는 기전이다. 폴리올 경로의 촉매 효소인 알도스 환원효소(aldose reductase) 활성에 대한 목서초 추출물의 효과를 확인하였다. 알도오스 환원효소 억제제는 글루코오스를 소르비톨로 변환하는 알도오스 환원효소를 억제하는 효소 억제제이며 소르비톨의 생산을 저하시키는 것이 목적이다. 많은 연구에서 폴리올 대사 이상이 당뇨병성 합병증을 유발하는 것으로 알려져 있으므로, 알도오스 환원효소 억제제는 당뇨병성 합병증의 치료제로서 유용할 수 있다.

[0018] 따라서 본 발명에서는 부작용이 없으며 효과적으로 당뇨병증을 예방할 수 있는 새로운 천연물을 개발하기 위하여, 목서초 추출물 및 분획물의 알도오스 환원효소 활성 억제능 효과를 시험하였다. (도 2, 및 표 1 참조).

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 목서초 추출물 및/또는 분획물을 포함하는 조성물은 당뇨병증 치료 효과가 우수하면서도 독성과 부작용이 없는 천연물 유래의 조성물이므로, 당뇨병증의 치료에 보다 안전하게 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 실시예 1의 목서초 추출물 및 용매별 분획물의 TLC 확인 결과를 나타낸 것이다.

도 2 은 96-well 플레이트 중 목서초의 에틸 아세테이트 분획의 HPLC-micro-fractionated 의 Rat lens aldose reductase 억제 활성을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하도록 한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 대표적으로 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0022] 실험예 1: 시료 제조

[0023] 본 발명의 목서초 추출물 및 분획물은, 건조된 목서초 무게 1kg의 10배의 70% 에탄올을 가하고 수용액상에서 80℃에서 3시간 추출한 다음 이를 여과하여 추출액을 얻는다. 추출하는 과정을 3회 반복한다. 얻어진 추출액을 40℃ 이하에서 감압 농축한 후 이를 동결 건조하여 분말상의 추출물을 얻는다. 상기 시료 제조예1에서 얻은 목서초 추출물 106 g에 증류수 20 L를 가하여 현탁하고 헥산 20 L 를 가하여 혼합한 후 헥산 가용성 분획부 및 수가용성 분획부로 분리하였다. 동일과정을 3회 반복하여 헥산 가용성 분획부만을 모은 후 이를 감압 건조하여 헥산 가용추출물 분말을 얻었으며, 이와 동일하게 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 부탄올 가용성 분획부와 수가용성 분획부도 따로 모아 이를 감압건조하여 분말을 얻었다. 헥산 3g, 메틸렌클로라이드 1.4g, 에틸아세테이트 3.1g, 부탄올 5.2g, 수가용성 분획부 45g을 얻었다.

[0024] 실험예 2: 박층크로마토그램(Thin Layer Chromatography)를 이용한 성분 분석 시험

[0025] 물질 분포를 확인하기 위하여, TLC(Thin layer chromatography, silicagel 60(Merk Co. USA) F254 precoated 사용)에 목서초 10mg/ml 농도로 메탄올에 용해한 후, 10ul 점적 한 후 전개용매 (헥산 : 에틸아세테이트 : 아세트익시드 = 1:1:0.04, 클로로포름 : 메탄올 = 6.5:3.5)에 전개하였다.

[0026] 전개 후 UV (254, 366 nm)로 관찰한 뒤, 전개면에 10%의 황산을 분사시켜 100℃에서 건조시켜 밴드를 확인하는 방법을 사용하였다. 시료의 유기성분을 발색시켜 모든 유기성분을 볼 수 있는데, 이러한 방법을 이용하여 상기 얻어진 추출물 및 분획물을 시험하여 얻어진 결과를 도 1에 나타내었다

[0027] **실험예 3: 알도스 환원효소 억제작용 시험**

[0028] 당뇨병합병증 발생에 중요한 역할을 한다고 알려져 있는 글루코오스 대사경로인 폴리올 경로의 촉매 효소인 알도스 환원효소(aldose reductase) 활성에 대한 목서초 추출물의 효과를 확인하였다.

[0029] 무게가 300g이 넘는 래트(Sprague-Dawley(SD) rats; 수컷, 8주령, 300-400g, 한림대실험동물센터]의 수정체(lens)를 적출하여 그 안의 수정체의 습증량에 따라 0.05M의 소듐 버퍼(pH 6.8)를 수정체 1개당 500 μ L을 넣어 얼음 안에서 균질화시켰다. 이를 4℃, 10,000rpm에서 20분간 원심분리(centrifuge UNION 55 R Hanil, Korea) 후, 그 상등액을 취하여 알도스 환원효소 시험의 효소원으로 사용하였다.

[0030] 알도스 환원효소(Aldose reductase) 활성 억제능은 Haymanh와 Kinoshita가 사용한 방법을 변형하여 실험을 수행하였다(Hayman S, Kinoshita JH. 1965. Isolation and properties of lens aldose reductase. J. Biol. Chem. 240(2): 877-882). 0.05M 포타슘 포스페이트 버퍼(pH 7.0) 530 μ L에 상기 준비한 효소원 160 μ L와 1.6mM NADPH(Applichem, Germany) 100 μ L, 시료 (실시에 1)에서 얻어진 목서초 추출물 및 분획물, 1mg/mL) 10 μ L를 넣어주고, 마지막으로 0.1M DL-글리세르알데하이드(DL-Glyceraldehyde, Sigma, USA) 100 μ L를 넣어주었다. 큐벳 내부에서 4분 동안 반응시켜 340nm에서 NADPH 흡광도의 감소율을 측정하였다. 큐벳 내부에서 4분 동안 반응시켜 0s와 240s의 흡광값으로 sample의 흡광도값을 계산하였다.

[0031] 계산식 2={0s에서의 흡광도 값-240s에서의 흡광도값}/반응시킨 시간}

[0032] 상기 계산식 2에서 얻어진 흡광도 값을 이용하여 아래의 계산식으로 억제율을 구하였다.

[0033] 계산식 3={(control-sample)/(control-blank)}*100

[0034] (control: 약물을 넣지 않은 상태에서 효소와 기질을 넣은 것,

[0035] blank: 기질을 뺀 나머지를 모두 넣은 상태)

[0036] 또한 알도스 환원효소 억제효과가 있다고 알려진 대조 물질로 퀘르세틴 (Quercetin, Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA))을 사용하여 상기와 같은 방법으로 처리하여 흡광도의 감소율을 측정하여 실시예 1 에서 제조된 목서초 추출물 및 분획물의 결과와 비교하였다.

[0037] 50% 흡광도의 감소를 나타내는 각 시료의 농도 (IC₅₀)으로 표시하여 그 결과를 아래의 표 1에 나타내었다.

표 1

[0038]

	Concentration (μ g/ml)	AR 억제율 (%)	IC ₅₀ (μ g/ml)
목서초 추출물	10	88.91	3.62
	5	58.94	
	1	33.64	
Hexane fr.	10	89.04	0.96
	5	75.90	
	1	50.84	
CHCl ₃ fr.	10	-	-
EtOAc fr.	10	74.50	2.49
	5	66.21	
	1	31.89	
n-BuOH fr.	10	-	-
Water fr.	10	-	-
Quercetin	10	83.71	0.43
	5	77.59	
	1	59.35	

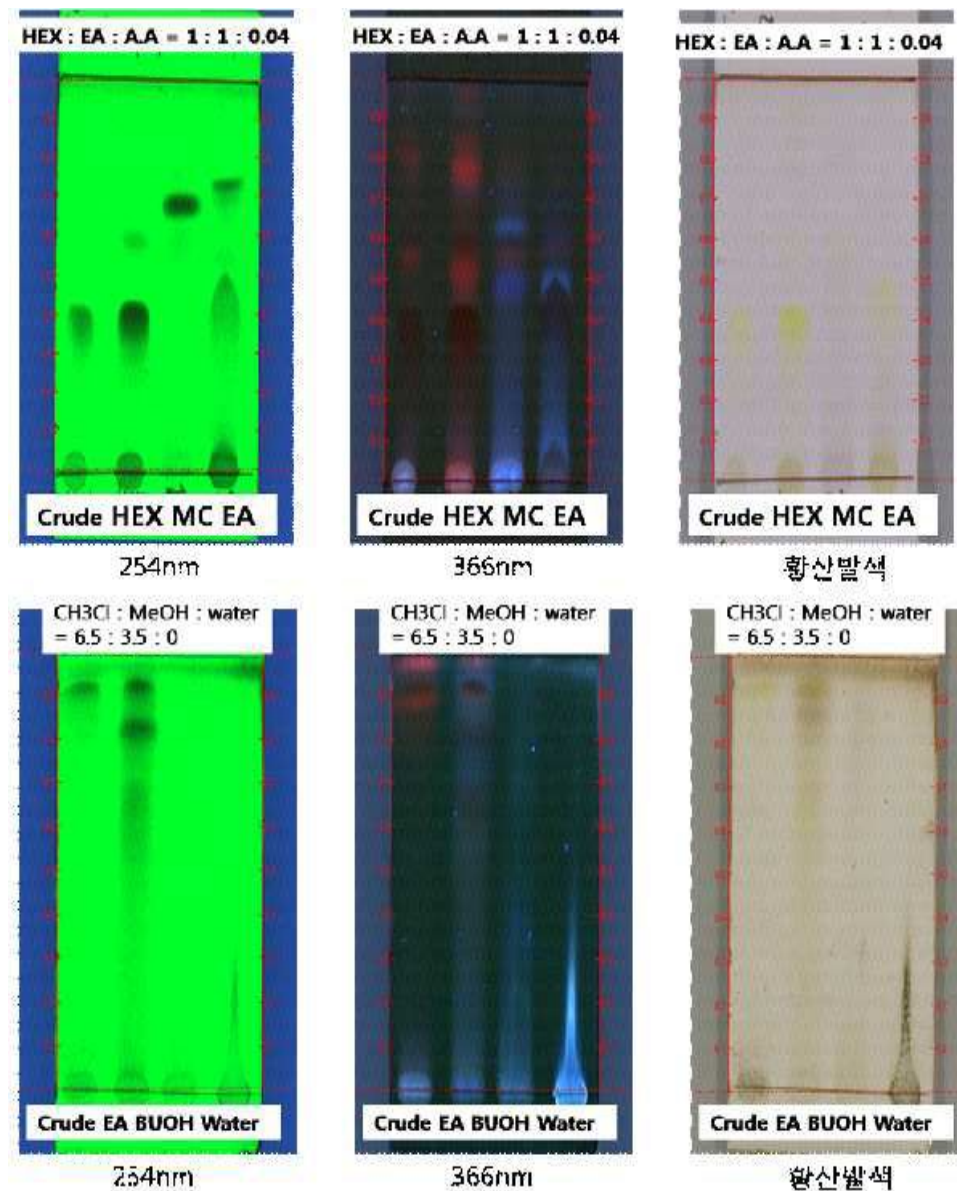
[0039] 목서초 추출물과 분획물을 이용하여 rat lens aldose reductase(RLAR)활성을 측정하여 IC₅₀ 값으로 나타내었다. RLAR 억제 활성에서 양성 대조구로 사용된 quercetin의 IC₅₀ 값이 0.43 μ g/ml로 나타났으며, 이와 비교하여 목서초 추출물은 3.62 μ g/ml의 활성을 가졌으며, 분획물에서는 Hexane fr.에서 0.96 μ g/ml, EtOAc fr.에서 2.49 μ g/ml에서 50% 억제율을 보였다. 우수한 aldose reductase 억제 활성을 보이는 것으로 확인되었다.

[0040] 실험예 4: 오프-라인 알도스 환원효소 억제작용 시스템 시험

[0041] 분석 칼럼은 Agilent Eclips XDB-C18 (3.5 μ g, 4.6 * 150 mm i.d.) flow rate 0.7 mL/min, 이동상 0.1% TFA water (A)와 아세토나이트릴 (B)을 사용하여 0분 A:B=60:40 20분 A:B=0:100 27분 A:B=0:100 30분 A:B=60:40 40분 A:B=60:40 로 분석하고 UV 254 nm 에서 검출하여 피크를 확인하였으며, 이를 도 2에 도시하였다.

도면

도면1



도면2

