



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년06월17일
(11) 등록번호 10-1274543
(24) 등록일자 2013년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	(73) 특허권자
<i>A61K 31/202</i> (2006.01) <i>A61K 31/20</i> (2006.01)	리콤 코포레이션
<i>A61P 3/04</i> (2006.01) <i>A61P 3/10</i> (2006.01)	일본 도쿄 1710022, 토시마쿠, 미나미- 아케부쿠로, 2-26-5, 토민-코교 아케부쿠로 빌딩 7에프
(21) 출원번호 10-2011-7000640	(72) 발명자
(22) 출원일자(국제) 2009년06월11일	푸지모토 야수오
심사청구일자 2011년01월12일	일본 도쿄 1780061, 네리마쿠, 오이주미가쿠엔 8 쵸메, 32-8
(85) 번역문제출일자 2011년01월10일	구리하라 쇼이치
(65) 공개번호 10-2011-0017437	일본 도쿄 1350016, 고토쿠, 도쿄, 1-4-6
(43) 공개일자 2011년02월21일	하마야 타다오
(86) 국제출원번호 PCT/JP2009/060682	일본 도쿄 1120002, 번쿄쿠, 고이시가와, 5-1-11
(87) 국제공개번호 WO 2009/151094	(74) 대리인
국제공개일자 2009년12월17일	한라특허법인
(30) 우선권주장	
JP-P-2008-153390 2008년06월11일 일본(JP)	
(56) 선행기술조사문헌	
WO2008000440 A1*	

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 신동환

(54) 발명의 명칭 인간 아드레날린 β 3 수용체 리간드, 이를 포함하는 식품 및 의약품

(57) 요약

하기의 3가지 성분을 포함하는 인간 아드레날린 β_3 수용체 리간드, 및 이를 함유하는 식품 및 의약품, 특히 비만, 비만증, 당뇨병, 고지혈증, 고혈압증, 통풍 등의 생활 습관병의 예방 및/또는 개선제: (A) 이중 결합을 3개 이상 갖는 불포화 지방산 또는 그 약학적으로 허용되는 염, (B) 이중 결합을 1개 또는 2개 갖는 불포화 지방산 또는 그 약학적으로 허용되는 염, 및 (C) 포화 지방산 또는 그 약학적으로 허용되는 염.

특허청구의 범위

청구항 1

인간 아드레날린 β_3 수용체 리간드로서 하기의 3가지 성분을 유효성분으로 포함하는 통풍, 고혈압증, 당뇨병, 비만, 고콜레스테롤혈증 또는 고지혈증의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물:

- (A) 이중 결합을 3개 이상 갖는 불포화 지방산 또는 그 약학적으로 허용되는 염,
- (B) 이중 결합을 1개 또는 2개 갖는 불포화 지방산 또는 그 약학적으로 허용되는 염, 및
- (C) 포화 지방산 또는 그 약학적으로 허용되는 염.

청구항 2

제 1항에 있어서,

- (A) 성분의 불포화 지방산의 탄소수가 8~24인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

- (B) 성분의 불포화 지방산의 탄소수가 8~24인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

- (C) 성분의 포화 지방산의 탄소수가 8~24인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

- (A) 성분과 (B) 성분의 질량비가 1:90~8:2인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

- (A) 성분 및 (B) 성분의 합계 질량과 성분(C)의 질량의 비가 50:1~1:3인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 7

인간 아드레날린 β_3 수용체 리간드로서 하기의 3가지 성분을 유효성분으로 포함하는 통풍, 고혈압증, 당뇨병, 비만, 고콜레스테롤혈증 또는 고지혈증의 개선용 식품 조성물:

- (A) 이중 결합을 3개 이상 갖는 불포화 지방산 또는 그 염,
- (B) 이중 결합을 1개 또는 2개 갖는 불포화 지방산 또는 그 염, 및
- (C) 포화 지방산 또는 그 염.

청구항 8

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 인간 아드레날린 β_3 수용체 리간드, 이를 포함하는 식품 및 의약품에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 아드레날린 수용체는 교감 신경으로부터 유리되는 아드레날린이나 노르아드레날린 등의 카테콜아민 작동약과 결합하는 수용체로서, 카테콜아민 작동약에 대한 감수성에 따라 α 수용체와 β 수용체의 2종류로 나뉘어진다. 아드레날린 α 수용체는 노르아드레날린 \geq 아드레날린 $>$ 도파민 $>$ 이소프로테레놀의 순으로 감수성을 나타낸다. 아드레날린 β 수용체는 이소프로테레놀 $>$ 아드레날린 \geq 노르아드레날린 $>$ 도파민의 순으로 감수성을 나타낸다.

[0003] 아드레날린 β 수용체에는 β_1 , β_2 , β_3 수용체가 있고, 최근 β_4 수용체의 존재도 시사되고 있다. 각각의 수용체에 대한 리간드의 작용으로서, 아드레날린 β_1 수용체 아고니스트는 심박수 증가 작용, 아드레날린 β_1 수용체 아고니스트는 강압 작용, 아드레날린 β_2 수용체 아고니스트는 기관지 평활근 이완 작용, 아드레날린 β_3 수용체 아고니스트는 열산생의 활성화 작용 및 지방 분해의 촉진 작용이 있는 것으로 알려져 있다. 이런 점에서, 교감 신경을 활성화하여 카테콜아민 작동약의 분비를 촉진시키는 것, 또는 비선택적인 아드레날린 β 수용체 아고니스트는 β_1 이나 β_2 작용에 의한 부작용이 염려되어, 비만 등의 생활 습관병의 예방 및/또는 개선에는 적합하지 않다. 따라서, 비만 등의 생활 습관병의 예방 및/또는 개선에는 아드레날린 β_3 수용체 아고니스트가 유효하다.

[0004] 아드레날린 β_3 수용체 리간드로서 그 아고니스트는 1984년에 처음 발견되어 동물 실험에서 열산생이나 지방 분해에 의한 항비만 작용, 항당뇨병 작용이 인정되었다. 그러나, 이들 작용은 인간에서는 미약하였다. 이 효과 차이의 원인이 1989년, 마우스나 래트 등의 설치류와 인간의 아드레날린 β_3 수용체의 화학 구조상의 종차인 것이 명확해졌다(타카쿠라 야스히토, 요시다 토시히데, 일본 약리학 잡지, 118, 315~320, 2001 및 C. Weyer, et al., Diabetes & Metabolism, 25, 11~21, 1999). 이와 같은 점에서, 인간 아드레날린 β_3 수용체 리간드, 특히 아고니스트가, 비만, 당뇨병 등의 생활 습관병의 예방 및/또는 개선에 유효하여, 그 개발이 요망되고 있다.

[0005] 최근, 인간 아드레날린 β_3 수용체 아고니스트로서 몇 가지 화합물이 알려져 있으며(타카쿠라 야스히토, 요시다 토시히데, 일본 약리학 잡지, 118, 315~320, 2001), 임상 시험에서 항비만약 또는 항당뇨약으로서의 효과가 확인되고 있다. 또한, 산초 추출물을 유효 성분으로 하는 인간 β_3 아드레날린 수용체 아고니스트제도 보고되어 있다(일본 특허공개 2006-96666).

[0006] 한편, 아가리쿠스, 표고버섯, 팽나무버섯, 송이버섯, 일새버섯, 나도팽나무 버섯 등의 버섯으로부터 제조된 키토산 함유 다당은 혈압, 당뇨치, 혈당치, 요산치, 총 콜레스테롤치, 중성 지방치 등의 저하 작용을 가지며, 고혈압증이나 당뇨병 등의 생활 습관병, 성인병의 검사 수치 개선에 크게 효과가 있는 것으로 보고되어 있다(WO 2004/033502).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 인간 아드레날린 β_3 수용체 리간드를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 인간 아드레날린 β_3 수용체 리간드를 포함하는 식품 및 의약품을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 인간 아드레날린 β_3 수용체 리간드를 함유하는, 비만, 비만증, 당뇨병, 고지혈증, 고혈압증, 통풍 등의 생활 습관병의 예방 및/또는 개선제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명자는 상기 목적을 달성하기 위하여 각종 검토를 수행한 결과, 특정의 불포화 지방산과 포화 지방산의 조합이 인간 아드레날린 β_3 수용체에 대한 높은 결합 활성을 갖는 것을 발견하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [0011] 본 발명은 이하의 특정 불포화 지방산과 포화 지방산의 조합을 유효 성분으로 하는 인간 아드레날린 β_3 수용체 리간드, 이를 함유하는 식품 및 의약품을 제공하는 것이다.
- [0012] 1. 하기의 3가지 성분을 포함하는 인간 아드레날린 β_3 수용체 리간드.
- [0013] (A) 이중 결합을 3개 이상 갖는 불포화 지방산 또는 그 약학적으로 허용되는 염,
- [0014] (B) 이중 결합을 1개 또는 2개 갖는 불포화 지방산 또는 그 약학적으로 허용되는 염, 및
- [0015] (C) 포화 지방산 또는 그 약학적으로 허용되는 염.
- [0016] 2. (A) 성분의 불포화 지방산의 탄소수가 8~24인 상기 1항에 기재된 인간 아드레날린 β_3 수용체 리간드.
- [0017] 3. (B) 성분의 불포화 지방산의 탄소수가 8~24인 상기 1 또는 2항에 기재된 인간 아드레날린 β_3 수용체 리간드.
- [0018] 4. (C) 성분의 불포화 지방산의 탄소수가 8~24인 상기 1 내지 3항 중 어느 한 항에 기재된 인간 아드레날린 β_3 수용체 리간드.
- [0019] 5. (A) 성분과 (B) 성분의 질량비가 1:90~8:2인 상기 1 내지 4항 중 어느 한 항에 기재된 인간 아드레날린 β_3 수용체 리간드.
- [0020] 6. (A) 성분 및 (B) 성분의 합계 질량과 성분(C)의 질량의 비가 50:1~1:3인 상기 1 내지 5항 중 어느 한 항에 기재된 인간 아드레날린 β_3 수용체 리간드.
- [0021] 7. 상기 1항 내지 6항 중 어느 한 항에 따른 인간 아드레날린 β_3 수용체 리간드를 함유하는 식품.
- [0022] 8. 상기 1항 내지 6항 중 어느 한 항에 따른 인간 아드레날린 β_3 수용체 리간드를 함유하는 의약품.

발명의 효과

- [0023] 본 발명의 인간 아드레날린 β_3 수용체 리간드는 인간 아드레날린 β_3 수용체에 대한 결합 활성이 높아, 혈압, 당뇨치, 혈당치, 요산치, 총 콜레스테롤치, 중성 지방치, 내장 지방치 등의 저하 작용을 가지며, 고혈압증, 당뇨병, 비만, 고콜레스테롤혈증, 고지혈증 등의 생활 습관병의 예방 및/또는 치료에 유효하다. 또한, 본 발명의 유효 성분은 세포 독성이 낮아, 식품이나 의약품으로서 안전하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 피험 물질 투여 6일째(과종 10일째)의 세포 형태 관찰 현미경 사진(VAC)(배율 100배)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명의 유효 성분(A)의 이중결합을 3개 이상 갖는 불포화 지방산으로는, 탄소수가 바람직하게는 8~24, 더욱 바람직하게는 10~20인 것이 바람직하다.
- [0026] 트리불포화 지방산으로서, α -리놀레산(18:3, 9, 12, 15-트리불포화 지방산), α -에레오스테아린산(α -eleosteric acid)(18:3, 9c, 11t, 13t), β -에레오스테아린산(β -eleosteric acid)(18:3, 9t, 11t, 13t), 퓨니신산(punicic acid)(18:3, 9c, 11t, 13c), 카렌딘산(calendic acid)(18:3, 8t, 10t, 12c), 자카린산(jarcaric acid)(18:3, 8c, 10t, 12c), 카탈핀산(catalpic acid)(18:3, 9t, 11t, 13c), 캄로레닌산(kamlorenic acid)(18:0H, 9c, 11t, 13t), 테트라불포화지방산으로서, 스테아리돈산(stearidonic acid)(6, 9, 12, 15-테트라불포화지방산), 아라키돈산(arachidonic acid)(5, 8, 11, 14-테트라불포화지방산), 파리나린산(parinaric acid)(18:4, 9c, 11t, 13t, 15c), 펜타 불포화지방산으로서, 에이코사펜타엔산(all-cis-icos-5, 8, 11, 14, 17-pentaenoic acid), 이와시산(7, 10, 13, 16, 19-펜타불포화 지방산), 헥사 불포화지방산으로서, 도

- 코사헥사엔산 등을 들 수 있다.
- [0027] 특히 바람직하게는, α -리놀레산, 에이코사펜타엔산, 도코사헥사엔산 등이다.
- [0028] 본 발명의 유효 성분(B)의 이중결합을 1개 또는 2개 갖는 불포화 지방산으로는 탄소수가 바람직하게는 8~24, 더욱 바람직하게는 10~20인 것이 바람직하다.
- [0029] 모노불포화지방산으로서, 미리스토레인산(myristoleic acid)(탄소수 14), 팔미토레인산(palmitoleic acid)(탄소수 16), 올레산(oleic acid)(탄소수 18), 엘라이딘산(elaidic acid)(탄소수 18), 박센산(vaccenic acid)(탄소수 18), 가돌레인산(gadoleic acid)(탄소수 20), 에루크산(erucic acid)(탄소수 22), 네르본산(nervonic acid)(탄소수 24) 등이, 디불포화지방산으로서, 리놀레산(linoleic acid)(탄소수 18) 등을 들 수 있다.
- [0030] 본 발명의 유효 성분(C)의 포화 지방산으로는, 탄소수가 바람직하게는 8~24, 더욱 바람직하게는 10~20인 것이 바람직하다.
- [0031] 구체예로는, 옥탄산, 노난산, 데칸산, 도데칸산, 테트라데칸산, 펜타데칸산, 헥사데칸산, 헵타데칸산, 노나데칸산, 이코산산, 도코산산, 테트라도코산산, 헥사도코산산, 옥타도코산산, 트리아콘탄산 등을 들 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 유효 성분 (A), (B) 및 (C)는 염, 에스테르, 아미드 등의 형태일 수도 있다.
- [0033] 염으로는, 식품학적, 영약학적, 또는 약리학적으로 허용되는 것이면 특별히 제한되지 않으며, 나트륨염, 칼슘염 등의 금속염, 암모늄염, 메틸아민, 에틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 피로리딘, 피페리딘, 몰포린, 헥사메틸렌아민, 아닐린, 피리딘 등의 유기 염기와의 염, 알기닌, 글루타민산, 오르니틴 등의 아미노산과의 염 등을 들 수 있다.
- [0034] 또한, 에스테르 유도체로는, 식품학적, 영양학적, 또는 약리학적으로 허용되는 것이면 어떤 것이라도 선택할 수 있지만, 에틸에스테르, 부틸에스테르, 프로필에스테르 및 글리세롤에스테르가 바람직하고, 더욱 바람직하게는 에틸에스테르 및 글리세롤 에스테르이다. 글리세롤 에스테르 유도체로는 모노글리세리드, 디글리세리드, 트리글리세리드의 어떤 형태라도 무방하지만, 디글리세리드 및 트리글리세리드의 형태가 바람직하고, 트리글리세리드가 가장 바람직하다.
- [0035] 또한, 아미드 유도체로는 식품학적, 영약학적, 또는 약리학적으로 허용되는 것이면 특별히 제한되지 않으며, 아세트아미드, 프로피온아미드, 부틸아미드, 발레르아미드 등을 들 수 있다.
- [0036] 본 발명에 있어서 (A)성분과 (B)성분의 질량비는 바람직하게는 1:90~8:2, 더욱 바람직하게는 1:60~3:7이다.
- [0037] 또한, (A)성분 및 (B)성분의 합계 질량과 성분(C)의 질량의 비는 바람직하게는 50:1~1:3, 더욱 바람직하게는 40:1~1:1이다.
- [0038] 본 발명의 아드레날린 β_3 수용체 리간드는 유효 성분만으로 사용할 수도 있지만, 부형제 등을 첨가한 형태로 사용할 수도 있다.
- [0039] 예를 들면, 본 발명의 리간드를 액제의 형태로 사용하기 위해서는, 상기 유효 성분에, 안식향산나트륨, p-옥시안식향산메틸, 테하이드로초산나트륨 등의 보존제, 사과산, 아스코르빈산, 구연산, 초산 등의 용해 보조제, 그리고 착색제, 향료, 풍미제, 글루코오스, 만니톨 등의 감미제 등을 필요에 따라 배합하고, 여기에 중류수, 생리식염수 등의 희석제를 필요에 따라 첨가하여 의약품 또는 식품을 조제한다.
- [0040] 상기 성분을 유효 성분으로 하는 의약품은 통상, 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 좌제 등의 고형 제제의 형태로 조제한다. 이 때, 이들 의약 제제는 통상 사용되는 충진제, 증량제, 결합제, 부습제, 봉괴제, 표면활성제, 활택제 등의 희석제 또는 부형제를 이용하여 조제된다.
- [0041] 정제의 형태로 형성할 때에는, 담체로서 이 분야에서 종래 공지된 것을 널리 사용할 수 있으며, 예를 들면, 유당, 만니톨, 백당, 염화나트륨, 포도당, 전분, 탄산칼슘, 카오린, 결정셀룰로오스 등의 부형제, 중류수, 생리식염수, 단일 시럽, 포도당액, 전분액, 젤라틴 용액, 카르복시메틸셀룰로오스, 인산칼륨, 폴리비닐피로리돈 등의 결합제, 건조 전분, 알긴산나트륨, 칸텐 분말, 탄산수소나트륨, 탄산칼슘, 라우릴황산나트륨, 스테아린산모노글리세리드, 전분, 유당 등의 봉괴제, 백당, 스테아린, 카카오버터, 수소 첨가유 등의 봉괴 억제제, 초산, 아스코르빈산, 사과산 등의 용해 흡수 촉진제, 글리세린, 전분, 유당, 카오린, 벤토나이트, 콜로이드상 규산 등의 흡착제, 정제 타르크, 스테아린산염, 폴리에틸렌글리콜 등의 활택제 등을 들 수 있다. 또한 정제는 필요에 따라

당의정, 젤라틴 피포정, 장용피정, 필름 코팅정 또는 이중정, 다층정으로 할 수 있다.

[0042] 환제의 형태로 성형할 때에는, 담체로서 이 분야에서 종래 공지의 것을 널리 사용할 수 있으며, 예를 들면 포도당, 유당, 만니톨, 전분, 카카오지, 경화식물유, 카오린, 타르크 등의 부형제, 아라비아검 분말, 젤라틴 등의 붕괴제 등을 들 수 있다. 좌제의 형태로 성형할 때에는, 담체로서 종래 공지의 것을 널리 사용할 수 있으며, 예를 들면 카카오지, 고급 알콜의 에스테르류, 젤라틴 등을 수 있다.

[0043] 유효 성분의 함유량은 특별히 한정되지 않고 광범위하게 선택되는데, 유효 성분(A), (B) 및 (C)의 전체에서, 통상 제제 중에 0.001~30질량%, 바람직하게는 0.01~10질량% 함유시키는 것이 좋다.

[0044] 투여량은 특별히 한정되지 않지만, 용법, 환자의 연령, 성별, 질환의 정도 등의 조건에 따라 적절하게 선택하면 된다. 예를 들면 체중 1kg에 대하여 유효 성분(A), (B) 및 (C)의 전체로 0.01~20mg, 바람직하게는 0.02~10mg이 되는 양을 1일 1~4회로 나누어 경구 투여한다.

[0045] 본 발명의 유효 성분 (A), (B) 및 (C)를 함유하는 식품은 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면, 스프, 된장국, 드링크, 젤리, 구미 등을 들 수 있다. 이들 식품 중의 유효 성분 (A), (B) 및 (C) 전체의 함유량은, 바람직하게는 0.001~30질량%, 더욱 바람직하게는 0.01~10질량%이다.

[0046] 아드레날린 β_3 수용체 결합 활성을 예를 들면, 인간 재조합체 아드레날린 β_3 수용체를 발현하는 HEK-293 세포를 사용하여, Cell Biology: Feve et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(1994), Vol. 91, pp. 5677-5681에 기재된 방법에 준거하여 수행할 수 있다. 즉, 트리스 완충액(pH 7.4)에, 시료의 1% DMSO 용액, 및 0.5nM [125 I] 시아노핀돌룰을 첨가하여, HEK-293세포를 25°C에서 90분 배양한 후, 여과, 세정하여, 아드레날린 β_3 수용체 결합 리간드의 방사능을 측정함으로써 수행할 수 있다.

[0047] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

시험예 1

[0049] 래트 초대 전구 지방 세포 4종(내장 지방·정소 상체 주위 지방·피하 백색 지방·갈색 지방)을 이용하여, 본 발명의 조성물에 의한 지방 축적 억제 효과 및 지방 방출 효과를 *in vitro*로 예비 검토를 수행하였다.

시험 재료 및 시험 방법

음성 대조 물질

[0052] Dimethyl Sulfoxide(이하 DMSO)(와코준야쿠 공업(주))를 사용하였다.

피험 물질

[0054] 하기의 표 1에 나타낸 성분을 표 1에 나타낸 질량비로 함유하는 성분을 DMSO로 1w/v%로 용해하고, 지방 세포 분화 미디움((주)프라이마리셀, Lot. No. 080411)에 최종 농도 10 μ g/mL이 되도록 첨가하여 사용하였다. 아드레날린 β_3 수용체 결합 활성 시험은 상술한 방법으로 수행하였다.

표 1

화합물	실시예				비교예								
	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9
C12:0				1									
C15:0	1	1				5							
C16:0	1	0.5	9				5	1		10			
C17:0									1				
C18:0											5	1	
C18:1	1		3										
C18:2	1	44	2	1	10	1	1	10	10				
C18:3 a	3	1	1	1						1	10	1	5
결합활성 (%)	71	67	72	56	34	14	35	-8	-13	-15	22	-1	43

[0056] 사용 세포

[0057] 전구 지방 세포 배양 키트 3종 세트 H-3(초대, 래트, (주)프라이머리셀: 내장 지방 전구 세포(이하, VAC) Lot. No. FIHA-FV · 피하 백색 전구 지방 세포(이하, SAC) FIHA-FS · 정소 상체 주위 전구 지방 세포(이하, EAC) FIHA-FE) 및 갈색 지방 세포 배양 키트 F-8(초대, 래트, (주) 프라이머리셀: Lot. No. HDOA-1)를 이용하였다.

[0058] 노르에피네프린(이하, NE)(-)-Norepinephrine(+)·bitartrate salt hydrate(SIGMA: Lot No. 103K0979)를 사용하였다.

[0059] 셀라이세이트의 조제

[0060] TRI-Reagent (Molecular Research Center: Lot No. 3681)을 사용하였다.

[0061] 시험 방법

[0062] 배양 조작

[0063] (1) 전구 지방 세포 3종(VAC · SAC · EAC)

[0064] 3종의 지방 세포 전구 세포(내장 지방, 정소 상체 주위, 피하 백색) 1.5×10^6 cells를 24혈 플레이트의 12웰에 과종하고(세포수는 1.2×10^5 cells/mL/well), 4일간 지방 세포 분화 미디움으로 예비 배양을 수행하였다. 예비 배양 후(과종 후 4일째)에 음성 대조 물질 및 피험 물질을 내장 지방 분화 미디움에서 규정 농도로 조제하고, 조제가 끝난 배지를 세포에 첨가하였다.

[0065] 배지 교환은 피험 물질 첨가 0, 2, 4일째(과종 4, 6, 8일째)에 수행하고, 회수 후에는 새로운 조제 완료된 배지를 첨가하였다. 마지막 날은 NE 미처리군에 대해서는 그대로 셀라이세이트의 조제를 수행하고, NE 처리군에 대해서는 셀라이세이트 조제 6시간 전에 피험 물질 및 음성 대조 물질을 규정 농도로, NE를 1×10^{-6} M 농도로 지방 세포 분화 미디움에서 조제하여 세포에 첨가하였다. 현미경 관찰은 피험 물질 첨가일 및 NE 첨가 전후에 수행하고, 대표예에 대해서 호프만 모듈 렌즈에 의한 사진 촬영을 수행하였다.

[0066] (2)갈색 지방 세포(이하, BAT)

[0067] 24혈 플레이트에 과종된 갈색 지방 세포를 증식용 미디움에서 3일간 배양하여, 컨플루언트가 된 것을 확인하였다. 분화 유도 배지로 교환하여 2일간 배양하고, 음성 대조 물질 및 피험 물질을 유지 미디움에서 규정 농도로 조제하여, 조제 완료된 배지를 세포에 첨가하여 4일간 배양을 수행하였다. NE 처리에 대해서는, VAC와 동일한 처리를 유지 미디움에서 수행하였다.

[0068] 현미경 관찰은 NE 첨가 전후에 수행하고, 대표예에 대하여 호프만 모듈 렌즈에 의한 사진 촬영을 수행하였다.

[0069] 시험군의 구성을 이하의 표 2 및 표 3 나타낸다.

표 2

VAC · SAC · EAC3 종의 지방 세포				
	군명	NE 첨가	피험 물질 최종 농도	검체수
1	대조군	-	-	1
2	4일간 샘플 계속 첨가	-	$10 \mu\text{g}/\text{mL}$	1
3	최종일 샘플 첨가 6시간	-	-	1
4	최종일 NE 첨가 6시간	+	-	1
5	최종일 NE+샘플 첨가 6시간	+	$10 \mu\text{g}/\text{mL}$	1
6	4일간 샘플 계속 첨가→ 최종일 NE 첨가 6시간	+	$10 \mu\text{g}/\text{mL}$	1

표 3

BAT				
	군명	NE 첨가	피험 물질 최종 농도	검체수

1	대조군	-	-	1
2	4일간 샘플 계속 첨가	-	10 μ g/mL	1
3	최종일 샘플 첨가 1시간	-	-	1
4	최종일 NE 첨가 1시간	+	-	1
5	최종일 NE+샘플 첨가 1시간	+	10 μ g/mL	1
6	4일간 샘플 계속 첨가→ 최종일 NE 첨가 1시간	+	10 μ g/mL	1

[0072] 시험 결과

[0073] 세포 형태 관찰 현미경 사진(VAC)

[0074] 피험 물질 투여 0일째(파종 4일째)

[0075] 내장 지방 세포를 파종하고 나서 4일째에, 통상 배지 및 피험 물질 조제 완료된 배양액 1mL를 첨가하여, 현미경 관찰 및 대표예의 사진 촬영을 수행하였다.

[0076] 각 웨일 전체를 관찰한 결과, 지방 세포에 지방 방울이 조금씩이기 하지만 축적되기 시작한 것이 확인되었다.

[0077] 각 군간의 차이는 인정되지 않았으며, 시험계가 각 군 동일 조건에서 수행되고 있음이 확인되었다.

[0078] 피험 물질 투여 2일째(파종 6일째)

[0079] 대조군에서는 작은 지방 방울을 축적한 지방 세포도 보이지만, 성숙한 지방 세포도 약간 보여졌다.

[0080] 본 발명의 조성물(실시예 3) 10 μ g/mL 첨가군에서는 작은 지방 방울을 축적한 지방 세포가 많았고, 비대화한 지방 세포는 거의 인정되지 않았다.

[0081] 어떤 군에서도 세포 장애의 모습은 확인되지 않았다.

[0082] 피험 물질 투여 4일째(파종 8일째)

[0083] 대조군에서는 대부분의 지방 세포가 성숙 세포가 되었고, 비대화하고 있는 세포도 많이 보여졌다.

[0084] 본 발명의 조성물(실시예 3) 10 μ g/mL 계속 첨가군에서는 성숙한 지방 세포가 증가하였다. 또한, 비대화한 지방 세포도 약간 보여졌다. 대조군과 비교하여 큰 차이는 인정되지 않았다.

[0085] 샘플 첨가 6시간에 따른 효과는 명확하게 보이지 않았다.

[0086] NE 첨가 6시간에 따른 반응은 얻어졌다. 또한, 샘플의 계속 첨가에 의해, NE 반응성은 올라가고 있는 듯이 보여졌다. NE+샘플 6시간 첨가에서는, NE 첨가 6시간군과 동등한 반응성이 것처럼 보여졌다.

[0087] 피험 물질 투여 6일째(파종 10일째)

[0088] 대조군에서는 비대화하고 있는 세포가 많았고, 지방 방울의 융합이 인정된다.

[0089] 샘플 첨가군에서는 비대화 세포는 거의 인정되지 않고, 명확한 비대화 억제 작용이 확인되었다.

[0090] 세포 형태 관찰 현미경 사진(VAC)(배율 100배)을 도 1에 나타낸다.

[0091] 세포 형태 관찰 현미경 사진(SAC)

[0092] 피험 물질 투여 0일째(파종 4일째)

[0093] 피하 배색 지방 세포를 파종하고 나서 4일째에, 통상 배지 및 피험 물질 조제 완료된 배양액 1mL를 첨가하여, 현미경 관찰 및 대표예의 사진 촬영을 수행하였다.

[0094] 각 웨일 전체를 관찰한 결과, 지방 세포에 지방 방울이 축적되기 시작한 것이 확인되었다.

[0095] 각 군간의 차이는 인정되지 않았으며, 시험계가 각 군 동일 조건에서 수행되고 있음이 확인되었다.

[0096] 피험 물질 투여 2일째(파종 6일째)

[0097] 대조군에서는 작은 지방 방울을 축적한 지방 세포도 보이지만, 성숙한 지방 세포도 보여졌다.

[0098] 본 발명의 조성물(실시예 3) 10 μ g/mL 첨가군에서는 대조군과 비교하여 작은 지방 방울을 축적한 지방 세포가 많

았고, 비대화한 지방 세포는 거의 인정되지 않았다.

[0099] 본 발명의 조성물(실시예 3) 10 μ g/mL 첨가군에서는 세포의 벗겨짐이라고 생각되는 현상이 약간 보여지고, 세포 밀도가 낮아지고 있음이 확인되었다.

피험 물질 투여 4일째(파종 8일째)

[0101] 대조군에서는 대부분의 지방 세포가 성숙 세포가 되었음이 확인되었다.

[0102] 본 발명의 조성물(실시예 3) 10 μ g/mL 첨가군에서는 성숙한 지방 세포가 증가하였다. 또한, 6일째에 보여진 세포 벗겨짐이라고 생각되는 현상이 진행하여, 대조군과 비교해 지방 세포의 수는 적었다.

[0103] 샘플 첨가 6시간군에서는 형태 관찰에서는 별로 효과는 인정되지 않았다.

[0104] NE 첨가에 따른 반응은 얻어졌다. 또한, 샘플의 동시 첨가에 의해, 반응이 잘 진행되고 있을 가능성이 시사되었다.

세포 형태 관찰 현미경 사진(EAC)

피험 물질 투여 0일째(파종 4일째)

[0107] 정소 상체 주위 지방 세포를 파종하고 나서 4일째에, 통상 배지 및 피험 물질 조제 완료된 배양액 1mL를 첨가하여, 현미경 관찰 및 대표예의 사진 촬영을 수행하였다.

[0108] 각 웨일의 전체를 관찰한 결과, 지방 세포에 지방 방울이 조금씩이긴 하지만 축적되기 시작한 것이 확인되었다.

[0109] 각 군간의 차이는 인정되지 않았으며, 시험계가 각 군 동일 조건에서 수행되고 있음이 확인되었다.

피험 물질 투여 2일째(파종 6일째)

[0111] 대조군에서는 작은 지방 방울을 축적한 지방 세포도 보이지만, 지방 축적이 진행되고 있음이 확인되었다.

[0112] 본 발명의 조성물(실시예 3) 10 μ g/mL 첨가군에서는 대조군과 비교하여 지방 방울이 작은 세포가 많았고, 지방 방울이 비대화한 지방 세포는 거의 인정되지 않았다.

[0113] 대조군에 비교하여 세포 밀도가 낮아, 세포 벗겨짐의 가능성이 생각되었다.

피험 물질 투여 4일째(파종 8일째)

[0115] 대조군에서는 대부분의 지방 세포가 성숙 세포가 되었고, 지방 방울이 비대화하고 있는 세포가 많이 인정되었다.

[0116] 본 발명의 조성물(실시예 3) 10 μ g/mL 첨가군에서는 지방 방울이 비대화한 지방 세포도 약간 보여졌지만, 대조군과 비교하여, 지방 방울이 비대화한 지방 세포의 수는 적었다. 또한, 세포 밀도가 낮아 세포 벗겨짐의 가능성이 생각되었다.

[0117] 샘플 첨가 6간에 따른 효과는 명확하게 인정되지 않았다.

[0118] NE 첨가에 따른 반응은 얻어졌다. 또한, 샘플의 동시 첨가 또는 계속 첨가에 따른 NE 반응성은 NE 첨가 6시간군과 같은 정도였다.

세포 형태 관찰 현미경 사진(BAT)

피험 물질 투여 0일째(파종 5일째)

[0121] 갈색 지방 세포를 파종하고 나서 5일째에, 유지 배지 및 피험 물질 조제 완료된 배양액 1mL를 첨가하여, 현미경 관찰 및 대표예의 사진 촬영을 수행하였다.

[0122] 각 웨일의 전체를 관찰한 결과, 지방 세포에 지방 방울이 조금씩이긴 하지만 축적되기 시작한 것이 확인되었다.

[0123] 각 군간의 차이는 인정되지 않았으며, 시험계가 각 군 동일 조건에서 수행되고 있음이 확인되었다.

피험 물질 투여 4일째(파종 9일째)

[0125] 대조군에서는 대부분의 지방 세포가 성숙 세포가 되어 있음이 확인되었다.

[0126] 본 발명의 조성물(실시예 3) 10 μ g/mL 계속 첨가군에서는 지방 방울의 크기가 작고, 또한 세포의 밀도가 낮아지

고 있는 것처럼 보여졌다.

- [0127] 샘플 첨가 자극 1시간의 효과는, 형태 관찰에서는 명확하게 확인할 수 없었다.
- [0128] NE 첨가 1시간에 따른 반응은 충분히 확인할 수 있었다.
- [0129] NE와 샘플의 동시 첨가, 또는 샘플의 계속 첨가 후의 NE 첨가에 따른 자극에 대해서도 형태 관찰로부터 반응이 확인되었다.
- [0130] **제제예 1(정제)**

[0131] 실시예 1에서 제조한 조성물 10g에 사과산 10g, 아스코르빈산 10g을 첨가하고 1000ml의 물에 용해하여, 동결 건조하였다. 이 것은 순수에 순식간에 용해되는 특성을 갖는다. 이 동결 건조물 10g에 만니톨 20g, 유당 50g, 폴리넥스트로스 20g을 첨가하여 잘 혼합하고, 결착제로서 수크로오스 지방산 에스테르 2g을 첨가하여 정제를 만들었다.

[0132] **제제예 2(과립제)**

[0133] 실시예 2에서 제조한 조성물 1g을 텍스트린 100g에 충분히 분산시킨 후, 이것을 텍스트린 900g과 섞어, 유동층 조립에 의해 과립제를 만들었다.

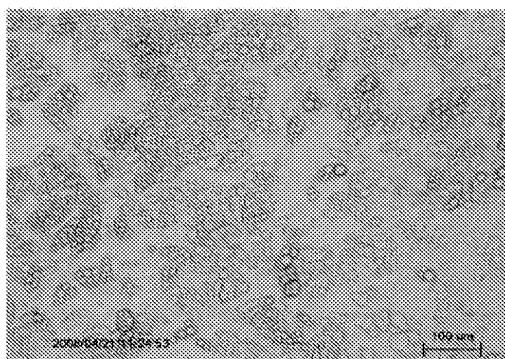
[0134] **제제예 3(겔리)**

[0135] 실시예 3에서 제조한 조성물 1g에 아스코르빈산 10g을 첨가하여 500g의 액당에 분산·용해하고, 겔화제 0.1g, 레몬 향료 0.1g과 물 500ml를 첨가하여 플라스틱 용기에 충진하고, 냉각하여 겔리를 만들었다.

도면

도면1

DMSO Control



Sample 10 μg/ml

