



- (51) 국제특허분류:
A61K 31/7084 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61K 9/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/007491
- (22) 국제출원일: 2015년 7월 20일 (20.07.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0101710 2015년 7월 17일 (17.07.2015) KR
- (71) 출원인: 울산대학교 산학협력단 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) [KR/KR]; 680-749 울산시 남구 대학로 93, Ulsan (KR).
- (72) 발명자: 김민선 (KIM, Min-Seon); 138-788 서울시 송파구 양재대로 1218, 257 동 308 호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 위병갑 (WIE, Byoung-Gap); 135-915 서울시 강남구 테헤란로 33 길 7, 대영빌딩 7층, 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.

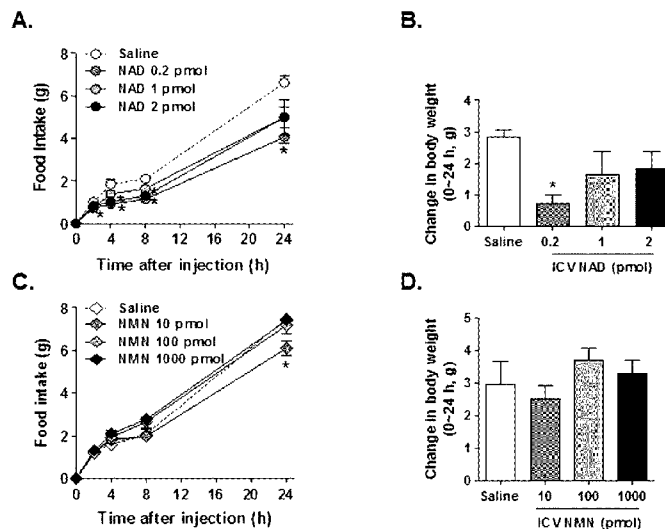
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, 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))

(54) Title: COMPOSITION CONTAINING NAD FOR PREVENTING AND TREATING OBESITY OR IMPAIRED GLUCOSE TOLERANCE

(54) 발명의 명칭: NAD를 함유하는 비만 또는 내당능장애의 예방 및 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition containing nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) as an active ingredient for preventing and treating obesity or impaired glucose tolerance, a food composition, and a method for preventing and treating obesity or impaired glucose tolerance using the same. The NAD of the present invention remedies an abnormal food intake pattern of an obese animal model induced by the intake of a high-fat diet and increases mobility, thereby exhibiting an effect of suppressing the weight increase due to the high-calorie intake and also showing an effect of improving glucose tolerance. In addition, it was verified that the NAD of the present invention is capable of maintaining the above effects with even a much smaller quantity than an NAD precursor known in the prior art. Therefore, the composition containing NAD of the present invention can be favorably used as a pharmaceutical composition or a food composition capable of effectively preventing and treating obesity or impaired glucose tolerance.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



본 발명은 NAD (nicotinamide adenine dinucleotide)를 유효성분으로 함유하는 비만 또는 내당능장애의 예방 및 치료용 약학적 조성물, 식품 조성물 및 이를 이용한 비만 또는 내당능장애의 예방 및 치료방법에 관한 것이다. 본 발명의 NAD는 고지방식이의 섭취에 의해 유도된 비만 동물모델의 비정상적 음식섭취 패턴을 개선하고, 운동성을 증가시킴으로써 고칼로리 섭취에 따른 체중 증가를 억제하는 효과를 나타냈으며, 내당능(glucose tolerance) 또한 개선하는 효과를 보였다. 또한, 종래 알려져 있던 NAD의 전구체 보다 훨씬 적은 양으로도 위와 같은 효과를 지속시킬 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 발명의 NAD를 포함하는 조성물은 비만 또는 내당능장애를 효과적으로 예방 및 치료할 수 있는 약학적 조성물 또는 식품 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: NAD를 함유하는 비만 또는 내당능장애의 예방 및 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 NAD (nicotinamide adenine dinucleotide)를 유효성분으로 함유하는 비만 또는 내당능장애의 예방 및 치료용 약학적 조성물, 식품 조성물 및 이를 이용한 비만 또는 내당능장애의 예방 및 치료방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide)는 산화적 또는 환원적 대사반응에서 수소 전달을 매개하는 효소 보조인자(enzyme cofactors)로 기능을 한다(Berger, F., et al. (2004). "The new life of a centenarian: signalling functions of NAD⁺(P)." Trends in biochemical sciences 29(3):111-118). NAD⁺는 글리세르알데히드 3-포스페이트 디하이드로게나아제(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)에 의해 촉매되는 해당반응(glycolytic reaction) 및 TCA (tricarboxylic acid) 사이클의 네 단계에서 NAD⁺H로 전환된다(Lin, S.-J. and L. Guarente (2003). "Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease." Current opinion in cell biology 15(2): 241-246). 또한, NAD⁺는 미토콘드리아에서 지방산과 아미노산의 산화 과정 동안에도 NAD⁺H로 전환된다. 적절한 산화환원 상태를 유지하기 위해서 NAD⁺H는 재산화되며, 미토콘드리아에서 산화적 인산화 및 ATP 합성 과정에서 전자공여자로 기능을 한다(Lin and Guarente, 2003).
- [3] 나아가, NAD⁺는 시르투인(sirtuins) 및 CD38 체외효소(ectoenzymes)에 의해 촉매되는 생화학적 반응에서 중요한 보조기질(cosubstrate)로 작용한다. 시르투인(sirtuins)은 클래스 III-NAD⁺-의존적 탈아세틸화효소(class III-NAD⁺-dependent deacetylases)이며, 단식, DNA 손상, 및 산화적 스트레스와 같은 영양학적 및 환경적 스트레스에 대한 적응 반응에 있어서 중요한 역할을 한다. 시르투인은 기질이 되는 단백질의 라이신(lysine)에 결합되어 있는 아세틸 그룹을 제거하여 ADP-리보오스(ribose)로 전달한다. 시르투인에 의해 촉매되는 탈아세틸화 반응 과정 중 NAD⁺는 nicotinamide로 분해된다.
- [4] 니코틴산(nicotinic acid, NA)으로부터 시작되는 NAD⁺ 합성의 Preiss-Handler 경로는 단세포 생물에서 널리 관찰되며, NAD⁺ 합성효소에 의한 NA 부분(moiety)의 후속적인 아미드화 반응을 필요로 한다(Preiss, J. and P. Handler (1958). "Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide." Journal of biological chemistry 233:493-500). 포유동물에서 NAD⁺ 생합성은 다음 네 개의 다른 경로를 통하여 이루어진다: 1) 트립토판으로부터의 드 노보(de novo) 합성, 2) NA 또는 니코틴아마이드(nicotinamide)로부터의 전환, 3) 니코틴아마이드

리보시드(nicotinamide riboside, NR)로 부터 전환, 4) 재활용(salvage) 경로를 통한 니코틴아마이드로 부터 재활용되어 합성된다. 포유류에서도 트립토판(tryptophan)으로부터 카이뉴레인(kynurenine) 경로를 통하여 NAD⁺를 새로 합성할 수 있지만, 정상적인 NAD⁺ 수준을 유지하기에는 부족하다. 사람에서 대부분의 NAD⁺는 니코틴아마이드로 부터 합성되며(Rongvaux, A., et al. (2003). "Reconstructing eukaryotic NAD⁺ metabolism." *Bioessays* 25(7):683-690), 니코틴아마이드는 NAD⁺-의존적 효소 반응에서 방출된다. 영양학적으로 추천되는 니코틴아마이드의 1일 섭취량은 약 15 mg이지만(Institute of Medicine Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes its Panel on Folate 1998), NAD⁺ 회전율(turnover)은 간에서만 수 그램의 범위이다(~ 6.5-8.5 g NAD⁺, 이는 약 1.5 g의 니코틴아마이드에 해당하는 양임) (Chiarugi, A., et al. (2012). "The NAD⁺ metabolome a key determinant of cancer cell biology." *Nature Reviews Cancer* 12(11):741-752). 따라서, 조직의 NAD⁺ 수준을 유지하기 위해 니코틴아마이드는 완전히 재활용될 필요가 있으며, 여기에는 니코틴아마이드 포스포리보실 전달효소(nicotinamide phosphoribosyl transferase, Nampt)라는 효소가 필요하다. Nampt는 포스포리보실 그룹의 5-포스포리보실-1-피로포스페이트(PRPP)로 부터 포스포리보실-기를 니코틴아마이드로에 전달을 촉매하는 율속효소(rate-limiting enzyme)로서, 효소 반응 결과 니코틴아마이드 모노뉴클레오티드(nicotinamide mononucleotide, NMN)와 피로포스페이트(pyrophosphate)가 생성된다(Revollo, J. R., et al. (2007). "The regulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis by Nampt/PBEF/visfatin in mammals." *Current opinion in gastroenterology* 23(2): 164-170). 그 다음 단계로 NMN은 니코틴아마이드 모노뉴클레오티드 아데닐일 전달효소(nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase, Nmnat)에 의해 NAD⁺로 전환된다.

- [5] 한편, 노화는 세포 및 기관 수준에서 NAD⁺ 생합성에 상당한 영향을 미쳐, 사람 및 설치류에서 조직의 NAD⁺ 양의 감소를 초래한다는 증거들이 보고되었다. 노령의 마우스는 체장, 백색지방조직, 간 및 골격근에서 PARP 활성의 증가로 인한 NAD⁺ 수준의 감소가 동반되고, 이는 SIRT1 활성의 감소와 미토콘드리아 기능의 감소를 야기한다. 노화된 랫 (rats)은 심장, 폐, 간 및 신장에서 DNA 손상의 증가로 인한 PARP 활성의 증가에 의해 세포내 NAD⁺ 수준의 감소를 보이고, 이로 인해 SIRT1 활성의 감소 및 미토콘드리아 활성의 감소를 나타낸다. 또한, 노화 랫의 뇌에서 증가된 PARP 활성으로 인하여 NAD⁺ 양의 감소와 SIRT1 활성의 감소가 관찰되었다(Braidy, Guillemin et al. 2011). 이러한 결과와 유사하게, Liu 등도 노화 동물의 뇌에서 Nampt 활성과 NAD⁺ 양이 감소함을 보고하였다(Liu, L.-Y., et al. (2012). "Nicotinamide phosphoribosyltransferase may be involved in age-related brain diseases." *PloS one* 7(10):e44933).

- [6] 따라서 이러한 보고된 연구결과들에 의하면, 적절한 세포 NAD⁺ 함량은

정상적인 조직 대사 기능에 있어서 매우 중요하므로, 세포 내 NAD⁺ 양을 증가시키기 위한 여러 치료 전략들이 제안되었다. 첫 번째로, NAD⁺ 전구체인 NR의 보충을 통하여 NAD⁺ 양을 증가시키는 방안이 시도되었는데, 간 및 골격근과 같은 말초 조직(peripheral tissues)에서 NAD⁺ 수준이 증가하였으나, 뇌에서는 증가하지 않았다(CantoHoutkooper et al. 2012). 다른 연구 그룹에서는 Nampt 반응의 산물이며 중요한 NAD⁺ 전구체인 NMN을 사용하였다. 고지방 식이(HFD-fed)를 섭취한 당뇨병 마우스에 대한 복강내(IP) NMN 투여는 간, 지방조직, 및 골격근에서 NAD⁺ 양을 성공적으로 증가시켰다(Yoshino, Mills et al. 2011). 또한, 당뇨병 마우스에서 NMN 투여는 손상된 내당능(glucose tolerance)을 회복시켰다. 이러한 결과들은 고지방식이(HFD)에 의해 유도된 당뇨병에서 NMN 투여가 NAD⁺ 결핍을 개선시킴을 보여주었다(Yoshino, Mills et al. 2011). 그러나, NMN 투여에 의한 시상하부 NAD⁺ 증가 효과는 아직 더 연구될 필요가 있으며, NMN의 세포 내로 운송기작도 아직까지 밝혀져 있지 않고 있다.

- [7] 두 번째로, PARP-1은 세포 안에서 주요한 NAD⁺ 소비자이므로, PARP의 약학적 억제는 생체 외 및 생체 내에서 세포의 NAD⁺ 수준을 증가시키고 SIRT1 활성을 강화시킬 수 있다. 따라서 PARP 억제제 개발은 대사조절장애를 동반한 질환의 한가지 치료법으로 여겨지고 있다.

- [8] 세 번째로, NQO1 (NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1)에 의해 매개되는 산화환원 반응이 NAD(P)H를 NAD(P)⁺로 전환시켜, NAD(P)⁺/NAD(P)H 비율의 증가를 유도하는 방법이 있다. 비만, 당뇨병, 대사증후군, 및 퇴행성 질환과 같은 산화환원 경로의 에너지 과다섭취 또는 변화에 의해 야기되는, NAD(P)⁺/NAD(P)H 비율의 감소와 관련된 질병을 예방 및 치료하기 위하여, NQO1은 이러한 질병 모델들에서 NAD(P)/NAD(P)H 비율을 증가시키는 방법으로 개발될 수 있다(Mazence, 2007.8.21., Method for controlling NAD(P)/NAD(P)H ratio by oxidoreductase., 10-2007-0082557). NQO1 활성인자의 하나인 피라노-1,2-나프토퀴논(Pyran-1,2-naphthoquinone) 화합물(β L)은 NAD⁺, NAD⁺/NADH, 및 NADP⁺/NADPH 비율을 증가시키는 것으로 보고되었다. NQO1 활성을 증가시키는, 이러한 화합물들의 대사적 효과는 더 연구될 필요가 있다.

- [9] 생체 외(in vitro) 실험을 통해서 배양한 뉴런세포, 성상세포, 및 심장근육세포(cardiac myocytes)에 NAD⁺ 처리하면 산화적 스트레스에 의해 유도된 세포사멸을 감소시키는 것으로 알려져 있으며, 설치류를 이용한 생체 내(in vivo) 실험에서 외부로 부터(exogenous) NAD⁺ 투여하면 허혈성 뇌손상과 심장비대증이 개선됨을 보고된 바 있다(Pillai, V. B., et al. (2010). "Exogenous NAD⁺ blocks cardiac hypertrophic response via activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated kinase pathway." *Journal of Biological Chemistry* 285(5):3133-3144; Zheng, C., et al. (2012). "NAD⁺ administration decreases ischemic brain damage partially by blocking autophagy in a mouse model of brain ischemia." *Neuroscience letters* 512(2):67-71). 그러나, 비만 및 제2형 당뇨병의 치료를 위해

동물수준에서 NAD⁺ 자체를 투여하는 방법과 관련된 연구 결과는 아직까지 보고된 바 없다.

- [10] 이에 본 발명자들은 NAD⁺의 직접적인 전신적 투여가 비만 및 내당능을 효과적으로 개선하는 효과가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명의 목적은 NAD (nicotinamide adenine dinucleotide)를 이용한 비만 또는 내당능장애의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 다른 목적은 NAD를 이용한 비만 또는 내당능장애의 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 NAD를 이용한 비만 또는 내당능 장애의 예방 및 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [14] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 비만 또는 내당능장애의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [15] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 NAD는 비만 환자의 음식 섭취 시기 및 주기를 포함하는 음식 섭취 패턴을 조절하여 음식 섭취를 감소시키는 것일 수 있다.
- [16] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 NAD는 비만 환자의 신체활동량을 증가시킬 수 있다.
- [17] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 약학적 조성물은 복강내 투여, 혈관내 투여 또는 경구 투여의 형태로 투여되는 것일 수 있다.
- [18] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 약학적 조성물의 복강내 투여시 NAD의 투여량은 대상 개체의 체중단위인 kg당 0.1 내지 100 mg의 양으로 투여되는 것일 수 있다.
- [19] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 약학적 조성물의 혈관내 투여시 NAD의 투여량은 대상 개체의 체중단위인 kg당 0.1 내지 100 mg의 양으로 투여되는 것일 수 있다.
- [20] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 약학적 조성물의 경구 투여시 NAD의 투여량은 일일 1 내지 1000 mg의 양으로 투여되는 것일 수 있다.
- [21] 또한, 본 발명은 NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 함유하는 비만 또는 내당능장애의 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [22] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 NAD는 음식 섭취 시기 및 주기를 포함하는 음식 섭취 패턴을 조절하여 음식 섭취를 감소시키는 기능을 하는 것일 수 있다.
- [23] 나아가 본 발명은 인간을 제외한 포유동물을 대상으로 NAD를 투여하는

- 단계를 포함하는, 비만 또는 내당능 장애의 예방 및 치료방법을 제공한다.
- [24] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 투여는 복강내 투여, 혈관내 투여 또는 경구투여일 수 있다.
- [25] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 복강내 투여시 NAD의 투여량은 대상 개체 체중단위인 kg당 0.1 내지 100 mg의 양으로 투여할 수 있다.
- [26] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 혈관내 투여시 NAD의 투여량은 대상 개체 체중단위인 kg당 대상 개체의 체중단위인 kg당 0.1 내지 100mg의 양으로 투여할 수 있다.
- [27] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 경구투여 시 NAD의 투여량은 대상 개체 체중단위인 kg당 대상 개체의 체중단위인 kg당 0.1 내지 1000mg의 양으로 투여할 수 있다.
- [28] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 투여는 1일 1회~3회 투여되는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [29] 본 발명의 NAD⁺ 투여는 고지방식이의 섭취에 의해 유도된 비만 동물모델의 비정상적 음식섭취 패턴을 개선하고, 운동성을 증가시킴으로써 고칼로리 섭취에 따른 체중 증가를 억제하는 효과를 나타냈으며, 내당능(glucose tolerance) 또한 개선시키는 효과를 보였다. 또한, 종래 알려져 있던 NAD⁺의 전구체인 NMN 보다 훨씬 적은 양으로도 위와 같은 효과를 지속시킬 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 발명의 NAD를 포함하는 조성물은 비만 또는 내당능장애를 효과적으로 예방 및 치료할 수 있는 약학적 조성물 또는 식품 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [30] 도 1은 고지방식이를 섭취한 마우스에서 혈장 및 시상하부에서 NAD⁺ 양이 감소함을 보여준다. NAD⁺ 양을 측정하기 위하여, 20주 동안 고지방식이(HFD) 또는 일반식이(ND)를 먹인 C57BL/6 마우스를 5시간 금식 후 희생시켜 혈장과 시상하부를 채취하여 HPLC (high performance liquid chromatography)를 이용하여 NAD⁺ 양을 측정하였다. 20주간 HFD를 먹인 마우스는 ND를 먹인 마우스에 비해 혈장 및 시상하부 모두에서 NAD⁺ 양의 상당한 감소를 나타냈다($P < 0.05$).
- [31] 도 2는 NAD⁺ 및 NMN의 일회(single) 혈관내 투여가 음식섭취 및 체중에 미치는 영향을 보여주는 실험 결과이다. (a) 전날 밤 동안 금식 상태인 C57BL/6 마우스에 0.2, 1, 및 2 pmol의 NAD⁺를 혈관내로 일회 투여 후 음식을 자유롭게 섭취하게 하고, 24시간 동안 먹이섭취와 체중 변화를 관찰하였다. NAD⁺를 투여 받은 마우스에서 식염수를 투여 받은 마우스에 비해 음식 섭취가 유의하게 감소하였다. 음식 섭취의 감소 효과는 NAD⁺ 투여 후 2시간째부터 유의하게 나타났으며, 24시간 후에도 유의한 수준으로 유지되었다. (b)는 NAD⁺ 투여 후 24시간 동안 체중 변화를 조사한 결과이다. 식염수를 주사한 마우스에 비해,

NAD⁺ 0.2 pmol을 주사한 마우스에서 24시간 동안 체중 증가가 유의하게 억제되었다. (c) NAD⁺와 효과를 비교하기 위하여 전날 밤 동안 금식 상태에서 C57BL/6 마우스에 10, 100, 1000 pmol의 NMN을 녀실 내로 일회 주사하였다. 식염수를 주사한 마우스에 비해 NMN 10 pmol 주사 마우스에서 음식섭취가 감소하였으나, NMN의 음식 섭취 억제 효과는 NAD⁺ (0.2 pmol)에 비하여 미약하였다. (d) 주사 후 24시간 동안의 체중 변화에 있어 대조군 그룹과 NMN-처리 그룹 사이에 큰 차이가 나타나지 않았다. 이상의 연구 결과는 NAD⁺ 녀실 내 투여가 NMN 대비 1/20의 적은 양으로도 더욱 효과적이고 지속적인 먹이섭취 감소와 체중 감소를 유도함을 보여주었다.

- [32] 도 3은 NAD⁺ 및 NMN의 일회 복강내(IP) 주사가 음식섭취에 미치는 영향을 보여주는 실험결과이다. (a) 전날 밤 동안 금식 상태인 C57BL/6 마우스에 대해 NAD⁺ (투여량: 0.3, 1, 및 3 mg/kg)를 일회 복강으로 투여한 뒤 24시간 동안 먹이섭취 및 체중을 측정하였을 때, NAD⁺ 복강 투여 후 4시간째 식염수를 주사한 마우스에 비해 음식 섭취가 상당히 감소되었다. (b) 1 mg/kg의 NAD⁺를 주사한 마우스는 NAD⁺ 투여 후 24시간째 식염수를 주사한 마우스에 비해 상당히 감소된 음식 섭취를 나타내었다. (c) 밤 동안 금식상태인 C57BL/6 마우스에 30, 100, 및 300 mg/kg의 NMN을 일회 복강으로 주사하였다. 300 mg/kg NMN을 주사한 마우스는 식염수를 주사한 대조군에 비해 투여 후 4시간째 상당히 감소된 음식섭취를 나타냈다. (d) NMN-주사 마우스는 투여 후 24시간 동안 대조군에 비해 음식섭취의 감소를 나타내지 않았다. 이상의 연구 결과는 NAD⁺ 복강 주사가 NMN 양의 1/300 정도 적은 양으로도 더욱 효과적인 먹이섭취 감소와 체중 감소를 유도함을 보여주었다.

- [33] 도 4는 장기간 NAD⁺ IP 주사가 체중에 미치는 효과를 보여주는 실험결과이다. 다음 네 그룹의 마우스(즉 식염수를 IP 주사한 ND 섭취 마우스, NAD⁺ 를 IP 주사한 ND 섭취 마우스, 식염수를 IP 주사한 HFD 섭취 비만 마우스, NAD⁺ 를 IP 주사한 HFD 섭취 비만 마우스)에 NAD⁺ (0.3 mg/kg/day)를 4주간 하루에 한 번 불끄기 직전에 복강으로 투여하였다. ND 섭취한 정상 마우스에서는 NAD⁺ 주사한 군에서 식염수를 주사한 군에 비하여 유의한 체중 차이가 관찰되지 않았다, 반면 HFD를 섭취한 비만 마우스는 NAD⁺ 주사군이 식염수 주사군에 비하여 체중이 유의하게 감소하였다. 이러한 연구 결과는 NAD⁺ 치료가 정상 체중 상태에서는 체중 감소를 유발하지 않으나, 비만 상태에서만 체중 감소를 유도함을 보여준다.

- [34] 도 5는 NAD⁺ 의 장기간 IP 주사가 먹이 섭취의 일중주기 리듬에 미치는 효과를 나타내는 실험결과이다. 이를 위하여 도면 4의 실험군 중 세 실험군 (즉 식염수를 IP 주사한 ND 섭취 마우스, 식염수를 IP 주사한 HFD 섭취 비만 마우스, NAD⁺ 를 IP 주사한 HFD 섭취 비만 마우스)를 CLAMS(continuous lab animal monitoring system, Oxymax사) 케이지에 놓고 24시간 동안 먹이섭취 패턴을 분석하였다. (a) 식염수를 주사한 ND 섭취 마우스는 주로 야간(사람에서는 주간에 해당함)에

먹이를 섭취하고, 주간에는 먹이를 거의 섭취하지 않는 먹이섭취의 현저한 일중주기 리듬을 보여주었다. 한편 HFD를 섭취한 비만 마우스에서는 야간에도 먹이섭취가 증가하지만 주간에 먹이섭취가 더욱 증가하여 먹이섭취 패턴의 일중주기 리듬이 깨어짐을 보여주었다. 이러한 현상은 비만한 사람에서 관찰되는 야간 음식섭취 증가 현상과 유사하다. 비만 마우스에 NAD⁺ 주사는 야간 먹이섭취를 유의하게 감소시키지 않았으나, 주간의 먹이섭취를 유의하게 감소시켰다. 이러한 연구 결과는 NAD⁺ 치료는 비만증에서 먹이섭취의 일중주기 장애를 개선시키는 효과가 있음을 보여주었다. (b) 먹이섭취 빈도를 분석하였을 때 HFD를 섭취한 비만 마우스는 ND를 섭취한 정상 마우스에 비하여 음식을 섭취하는 빈도가 증가하며, 특히 낮 동안 음식 섭취 빈도가 현저하게 증가하였다. 또한 NAD⁺ 치료는 비만 마우스에서 잦은 빈도의 음식 섭취를 정상 마우스 수준으로 억제시켰다. 따라서 NAD⁺ 치료는 비만증에서 증가한 음식섭취 빈도를 감소시키는 효과가 있음을 입증되었다.

- [35] 도 6은 NAD⁺ (0.3mg/kg/day)의 만성적인 IP 주사가 신체활동량에 미치는 영향을 보여주는 실험결과이다. (a) 세 그룹 (즉 ND를 섭취한 IP 식염수 주사군, HFD를 섭취한 IP 식염수 주사군, 및 HFD를 섭취한 IP NAD⁺ 주사군)에 대해 24시간 동안 신체활동량을 CLAMS 케이지에 넣어서 측정하였다. 식염수를 주사한 ND를 섭취 정상 대조군의 신체활동량은 야간(사람에서는 주간에 해당됨.)에 주간에 비하여 현저하게 높아서 신체활동량의 현격한 일중주기 리듬을 관찰할 수 있었다. 반면 식염수를 투여한 HFD 섭취 비만군은 야간의 신체활동량이 대조군에 비하여 유의하게 감소하여 신체활동량의 일중주기 리듬이 깨어짐을 보여주었다. 비만 마우스에서 4주간 NAD⁺의 IP 주사는 야간의 감소된 운동성을 획기적으로 회복시켰다. (b) 마우스가 움직인 신체활동량을 수치화하여 보여준다. 이러한 연구 결과는 NAD⁺ 투여가 비만증에서 신체활동량의 일중주기 장애를 효과적으로 개선시킴을 증명하였다.

- [36] 도 7은 NAD⁺ 투여가 내당능에 미치는 효과를 보여주는 실험결과이다. 이를 위하여 정상 C57BL/6 마우스를 밤 동안 금식을 시킨 상태에서 NAD⁺ (0.3, 1, 3 mg/kg)를 복강으로 1회 투여하고, 30분 뒤 포도당(2 g/kg)를 경구로 투여하였다. 포도당 투여 직전과 투여 후 15, 30, 60, 및 120분에 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 혈당을 혈당측정기로 측정하였다. NAD⁺를 주사한 마우스는 식염수를 주사한 마우스에 비해 포도당 투여 후 15 및 30분에 혈당이 유의하게 감소하였다. 이러한 연구 결과는 NAD⁺ 복강 투여가 내당능을 개선시킬 수 있음을 보여주었다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [37] 비만은 노화 및 에너지 섭취의 증가와 관련이 있으며, 칼로리 제한은 다양한 생물체에서 건강과 수명을 개선시켰다(Colman, R. J., et al. (2009). "Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys." Science

325(5937):201-204). NAD⁺는 대사, 스트레스 저항성 및 수명의 주요 조절인자로 최근 주목받고 있다. 과도한 에너지 섭취와 노화에 따른 시상하부의 NAD⁺ 감소는 비만 및 노화에 동반된 대사 장애 발생에 기여할 것으로 생각된다. 그러나 지금까지 NAD⁺ 그 자체를 투여함으로써 음식 섭취, 체중, 및 당대사에 미치는 치료적 효과에 대해서는 연구된 바가 없기에 본 발명자들은 NAD⁺의 직접적인 투여에 따른 효과를 실험하였다.

[38] 우선, 본 발명자들은 고지방식이(HFD)를 먹인 마우스의 혈장 및 시상하부의 NAD⁺ 수준을 측정하고, 정상식이(ND)를 먹인 마우스의 것과 비교하였다. 그 결과 20주간 고지방 식이를 먹인 비만 마우스는 정상 마우스에 비하여 혈액과 식욕 및 체중 조절 중추인 뇌의 시상하부에서 NAD⁺ 양이 유의하게 감소됨을 관찰하였다(도 1). 따라서 고지방 식이를 섭취하여 유발된 비만증에서는 NAD⁺ 결핍이 수반됨이 증명되었다.

[39] 본 발명자들은 NAD⁺의 혈관내 혹은 복강내 일회 투여가 음식 섭취 및 체중에 미치는 효과를 조사하였다. NAD⁺의 혈관내 주사는, 식염수를 주사한 경우에 비해, 주사 후 24시간 동안 음식 섭취 및 체중 증가를 상당히 감소시켰다(도 2). 복강내 주사에 의한 전신적인 NAD⁺ 투여는 혈관내 주사 만큼이나 음식섭취를 감소시키는데 효과적이었다(도 3). 흥미롭게도, 매우 적은 양 (전구체인 NMN의 유효 투여량보다 적어도 100배 낮은)의 NAD⁺가 음식 섭취와 체중을 상당히 억제시킬 수 있었다. 또한, NAD⁺의 효과는 복강 주사 후 24시간 동안 유지되었으나, NMN의 경우는 그렇지 않았다. 즉 NAD⁺의 혈관내 투여(0.2 pmol)는 주사 후 24시간 쯤 체중을 감소시킨 반면, ICV NMN 투여는 체중에 변화를 일으키지 않았다. 특히, 더 낮은 투여량의 NMN (10 pmol) 및 NAD⁺ (0.2 pmol)가 식욕억제 작용의 측면에서 더 높은 투여량의 NMN (100 및 1000 pmol) 및 NAD⁺ (1 및 2 pmol) 보다 더 효과적이었다. 대부분의 독성 효과는 투여량에 비례하기 때문에, 위와 같은 결과들은 NAD⁺ 및 NMN에 의해 유도된 음식섭취의 억제가 비특이적 독성에 기인한 것이 아님을 나타낸다. 따라서 치료적 목적에 있어서 NAD⁺ 및 NMN의 가장 효과적인 투여량을 결정하는 것이 중요하다.

[40] 다음으로, 본 발명자들은 일반식이(chow-diet) 및 고지방식이(high fat diet)를 먹인 마우스를 대상으로 NAD⁺의 장기간(chronic) 투여 (NAD⁺ 0.3 mg/kg, 4주간 1일 1회 복강 주사)가 체중에 미치는 효과를 조사하였다. 그 결과 고지방식이에 의해 유도된 비만 마우스에서는 NAD⁺의 체중 감소 효과가 현저히 나타났으나, 정상적인 식이를 먹인 정상 마우스에서는 그러한 효과가 나타나지 않았다(도 4). 이는 NAD⁺ 섭취가 특히 비만인 대상에 대해 체중 감소를 유도할 수 있다는 것을 보여준다.

[41] 식이에 의해 유도된 비만 마우스는 음식 섭취 패턴에 있어서 일중주기 리듬의 소실, 즉 (사람의 야식에 대응되는) 주간 음식 섭취 증가와 주간 음식섭취 빈도의 증가를 나타냈다. 특히, 비만 마우스에 대한 NAD⁺ 치료는 주간의 음식 섭취량과 빈도를 상당히 감소시켰으며(도 5), 이는 NAD⁺ 처리가 비만인의 손상된

음식섭취 의 일중주기 리듬을 바로잡을 수 있음을 보여준다.

- [42] 추가로, 4주 동안 NAD⁺ 투여는 식이에 의해 유도된 비만 쥐의 야간에 감소된 신체활동량도 회복시켰다(도 6). 따라서, 증가된 신체활동은 NAD⁺ 섭취의 항-비만 효과의 또 다른 기작이 될 수 있다. 또한, NAD⁺의 장기간 주사는 별다른 부작용을 나타내지 않았으며, 이는 만성적인 전신적 NAD⁺ 처리가 안전하다는 것을 보여준다. 이러한 결과들로부터, 전신적 NAD⁺ 투여가 음식 섭취를 감소시키고 운동성을 증가시킴으로써 고칼로리의 섭취에 따른 체중 증가를 예방할 수 있음을 알 수 있다.
- [43] 또한, 본 발명자들은 NAD⁺ 일회 투여가 당부하검사(glucose challenge) 동안 혈당에 미치는 효과를 조사하였다. 포도당 투여 전 복강으로 NAD⁺ 투여를 투여하면 포도당 투여 후 15분 및 30분째 혈당을 상당히 감소시켰으며, 이러한 연구 결과는 NAD⁺ 투여가 내당능(glucose tolerance)을 개선시킬 수 있음을 시사한다.
- [44]
- [45] 따라서 본 발명은 NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 비만 또는 내당능장애의 예방 및 치료용 약학적 조성물 제공할 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 "예방"은 요법제(예를 들면, 예방제 또는 치료제) 또는 요법제의 조합물을 투여하여 대상체에서 비만 또는 내당능장애의 징후가 나타나거나 재발 또는 발전되는 것을 막는 것을 의미한다. 본 명세서에 사용된 용어 "치료"는 비만 또는 내당능장애 환자의 증상이나 어느 하나 이상의 신체적 파라미터를 개선시키거나 조절하거나 그 발생이나 진전을 지연시키는 것을 의미하며, 환자의 인식 여부는 불문한다. 본 명세서에 사용된 용어 "약학적으로 허용 가능한"이란 생리학적으로 허용되고 동물에게 투여될 때, 통상적으로 위장장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 본 발명의 약학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 사용하기에 적합한 담체로는 식염수, 인산염 완충 식염수, 최소 필수 배지(MEM) 또는 HEPES 완충액의 MEM을 포함하는 수성 매질을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [46] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는

경질 젤라틴 캡셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말 등의 형태일 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 근육, 피하, 경피, 정맥, 비강내, 복강내 또는 경구 경로로 투여될 수 있고 바람직하게는 근육내 또는 피하 경로로 투여될 수 있다. 조성물의 투여량은 투여 경로, 동물의 연령, 성별, 체중 및 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있다.

- [47] 본 발명의 약학적 조성물은 하기의 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 우선, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 경질 또는 연질 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제를 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 있는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제가 포함될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 비경구 투여도 가능하며, 비경구 투여는 피하주사제, 정맥주사제, 근육 내 주사제 또는 흉부 내 주사제를 주입하는 방법 등에 의한다. 이 경우 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여 본 발명의 유효성분을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 또는 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름 또는 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

- [48] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 마우스, 랫, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 그 예로는 경구, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사 등이 있다. 본 발명의 NAD는 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 적절한 방법을 선택하여 투여될 수 있다.

- [49] 다른 양태로서, 본 발명의 NAD는 기능성 식품 조성물로 이용될 수 있다. 본 발명에 따른 식품 조성물은 NAD의 항비만 또는 내당능 개선 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 기능성 식품 조성물은 상기 효과를 배가시키기 위하여 다른 생리적 활성 성분, 즉 안전성이 검증된 천연의 항산화 물질 등을 추가적으로 배합하여 제조할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은, 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 정제, 과립, 분말, 캡셀, 액상의 용액 및 환으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 제형으로 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 그 형태에 있어서 특별히 제한은 없으며, 예를 들어 통상의 형태 이외에, 유동식품, 경장영양식품, 건강식품, 유소아 식품 등의 형태로 제조될 수 있다. 계속적 섭취의 측면에서는 쌀밥이나 각종 조미료, 조합 유지나 마가린, 쇼트닝, 마요네즈, 드레싱 등의 유지 가공품이 가능하다. 또한, 형태는 고체 형상, 반고체 형상, 겔 형상, 액체 형상, 분말 형상 등 당업계에서 통상 사용되는 어떠한 형태도

이용가능하다. 또한, 본 발명의 식품 조성물은 과자, 가공식품, 조합 유지, 유제품, 음료, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등의 형태로 상품화할 수 있다. 추가로, 본 발명의 식품 조성물은 본 발명의 당단백질 이외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제 및 중진제, 펙트산, 알긴산, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

- [50] 나아가 본 발명은 비만 또는 내당증 치료를 위한 새로운 방법으로서 NAD 자체를 직접 투여함으로써 치료 효과를 종래 방법 대비 월등히 우수하게 치료할 수 있음을 확인한 점에 특징이 있으며, NAD를 투여하는 경로에 따른 최적의 투여량을 규명한 점에 특징이 있다.
- [51] 투여 경로에 따른 최적의 투여량은 앞서 기술한 바와 같이, 복강내 투여, 혈관내 투여 또는 경구투여를 사용할 수 있으며, 복강내 투여 및 혈관내 투여는 대상 개체 체중단위인 kg당 0.1 내지 100 mg의 양으로 투여하는 것이 바람직하며 경구투여 시 NAD의 투여량은 대상 개체 체중단위인 kg당 대상 개체의 체중단위인 kg당 0.1 내지 1000mg의 양으로 투여하는 것이 바람직하다.
- [52] 특히 본 발명의 일실시예에 의하면, 마우스를 대상으로 NAD를 투여하여 비만 또는 내당증 치료 효과를 규명하였는데, 이러한 효과를 도출할 수 있는 NAD의 투여량은 0.03 내지 1000mg/kg임을 확인하였는데, 이렇게 동물실험을 통해 확인한 약리물질의 처리농도는 당업계에 알려져 있는 하기 계산식을 통해 인간에게 적용할 수 있는 약리물질의 처리농도를 예상할 수 있다.
- [53]
- [54] **Human 적용농도(mg/kg) = animal 적용농도(mg/kg) x animal 적용 Km지수**
- [55]
- [56] 여기서, Km지수는 개체의 바디(body)에 대한 체표면적으로 환산되어진 정해진 수치로서, 성인 인간(human adult)은 37, 아이 인간(human child)은 25, mice는 3, rat는 6으로 정해져 있다. 따라서 이러한 수식을 통해 계산하면, 본 발명에서 mice를 대상으로 수행한 NAD의 처리 농도를 인간(성인) 적용 농도로 환산해 보면 0.1mg/kg ~ 3000mg/kg의 양으로 처리할 수 있음을 알 수 있는데, 인간(성인) 적용 시 복강 또는 혈관내 투여의 경우에는 0.1mg/kg ~ 300mg/kg의 양으로 처리하는 것이 바람직하고, 경구 투여의 경우에는 0.1mg/kg ~ 3000mg/kg의 양으로 처리하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 인간(성인) 적용 시 복강 또는 혈관내 투여의 경우에는 0.1mg/kg ~ 100mg/kg의 양으로 처리할 수 있고, 경구 투여의 경우에는 0.1mg/kg ~ 1000mg/kg의 양으로 처리할 수 있다.
- [57] 상기와 같이 각 투여 경로에 따른 NAD의 투여량은 상기 기술된 범위를 초과하게 되면 치료 효과가 미비할 뿐만 아니라 체내 다른 부작용을 초래할 수 있으므로 상기 기술된 범위 내에서 투여하는 것이 좋다.
- [58] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 단지

본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[59] <실시예 1>

[60] 실험재료 및 방법

[61]

[62] <1-1> 실험동물

[63] 성숙한 수컷 C57BL/6 마우스를 오리엔트 바이오(대한민국, 경기도)에서 구입하였다. 마우스에게 표준식이(아그리퓨리나, 대한민국, 서울)를, 달리 지시되지 않는 한, 자유롭게 섭취하도록 하였다. 식이-유도 비만(diet-induced obesity, DIO) 모델을 만들기 위하여, 마우스에게 HFD (60% 지방, Research Diet Co., New Brunswick, NJ)를 20주간 먹였다. 동물들은 조절된 온도($22 \pm 1^\circ\text{C}$)와 12시간 명암주기(08:00 a.m 부터 8:00 p.m 까지 빛 조건) 하에서 사육하였다.

[64] NAD⁺ 와 NMN 의 일회 투여 실험을 위하여 8주령의 마우스에 NAD⁺ (Sigma 구입, 0.3, 1 및 3 mg/kg) 혹은 NMN (Sigma 구입, 30, 100, 및 300 mg/kg)를 밤 사이 금식 후 아침 9-10시 사이에 복강으로 투여하였다. 장기간 NAD⁺ 치료를 위하여 4주간 매일 불 켜기 직전에 NAD⁺ (0.3 mg/kg 체중/일(day))를 1회 복강 내로 주사하였다.

[65]

[66] <1-2> 혈관 내 삽관(cannulation) 및 NAD⁺ 투여

[67] 마우스의 제3뇌실로 26-게이지 캐놀라(permanent 26-gauge stainless steel cannulae)를 수술을 통하여 삽입하였다 (캐놀라 삽입 위치: 브레그마(bregma)로부터 뒤로 1.8 mm, 정맥동(sagittal sinus)로부터 아래로 5.0 mm). 수술을 위하여 마우스를 Zoletil 및 Rumpun 혼합물(2:1 v/v, 10 $\mu\text{l/g}$ 체중)로 마취시켰다. 캐놀라의 정확한 삽관위치는 안지오텐신(angiotensin) II (50 ng) 투여 후 음수반응(positive dipsogenic response)으로 확인하였다. 캐놀라가 정확하게 위치한 마우스들만을 데이터 분석에 사용하였다. 수술 후 7일 동안 회복 기간 거친 후, 1주일간 마우스를 매일 일정시간 만져 주어서 실험에 대한 스트레스 반응을 최소화하였다. NAD⁺과 NMN은 투여 직전에 0.9% 식염수에 녹여서 사용하였다. NAD⁺와 NMN은 2 μl 의 식염수에 녹여서 혈관내로 투여하였다.

[68]

[69] <1-3> 섭식 연구

[70] 초기 명 단계(light phase) (09:00-11:00)에서 밤 동안 금식한 C57BL/6 마우스에게 정해진 투여량의 NAD⁺ 또는 NMN을 지시된 방법으로 투여하였다. 대조군 마우스는 같은 양의 운반체(vehicle, 이 경우 생리식염수)를 투여받았다. 주사 후에 24 시간 동안 음식 섭취 및 체중을 관찰하였다.

[71]

[72] <1-4> 먹이섭취 및 신체활동량 일중 주기 패턴 평가

[73] Comprehensive Laboratory Animal Monitoring system (CLAMS, Columbus Instruments)를 이용하여 먹이섭취량 및 신체활동량을 측정하였다 (n = 4~5). 빛과 먹이 조건을 원래 사육 상태(home cage)에서와 동일하게 유지하였다. 관찰 과정 동안, 물은 언제든지 마실 수 있게 하였다.

[74]

[75] <1-5> 경구 당부하 검사(Oral glucose tolerance test)

[76] 경구 당부하 검사를 위하여, 마우스를 오버나잇으로 금식시키고, 2 g/kg(체중)의 포도당을 경구 투여(oral gavage)하고, 경구 투여 직전 (0 분)과 투여 후 15, 30, 60, 및 120분째 혈당을 측정하였다. 포도당 투여 30분 전에 NAD⁺ (0.3, 1 및 3 mg/kg)를 복강으로 투여하였다.

[77]

[78] <1-6> NAD⁺ 측정

[79] 혈장(plasma) 100 μ l 및 시상하부 조직으로부터 100 μ l의 1 M HClO₄를 사용하여 NAD⁺를 추출하고, 66 μ l의 3 M K₂CO₃를 첨가하여 중성화시켰다. 15분간의 원심분리(4°C, 13,000 g) 후에 20 ml의 상층액을 HPLC 컬럼(AHima HPC 18AQ 5 mM, 15 x 4.6 cm)에 로딩시켰다.

[80]

HPLC는 1 ml/min의 속도로 작동시키면 NAD⁺는 10분째 날카로운 피크로 추출되었다. NAD⁺ 양은 피크 면적에 기초하여 표준곡선과 비교하여 정량화하였고, 조직의 습윤 중량(wet weight)로 보정하였다. 이것은 Imai Shin의 이전 논문에서 제시된 방법을 참조하였다(Ramsey, Mills et al. 2008, Yoshino, Mills et al. 2011).

[81]

[82] <1-7> 통계처리

[83] 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었다. 통계분석은 IBM SPSS (Chicago, Illinois)을 사용하여 수행하였다. 그룹간의 통계적 유의성은 일방향 ANOVA (one-way analysis of variance)와 post hoc LSD 테스트, 또는 unpaired Student's t-test로 검증하였다. 유의성은 P < 0.05으로 정의하였다.

[84]

[85] <실시예 2>[86] NAD⁺의 투여가 비만 동물모델에서 음식섭취 및 체중에 미치는 영향

[87]

[88]식이섭취에 의한 비만이 유도된 동물의 NAD⁺ 양을 측정하기 위하여, 고지방식이(HFD) 또는 일반식이(ND)를 먹인 C57BL/6 마우스에 대해 먹이를 먹인지 20주째 혈장과 시상하부를 채취하여 NAD⁺를 측정하기 위한 HPLC (high performance liquid chromatography)를 수행하였다(도 1). 20주간 HFD를 먹인 마우스는 ND를 먹인 마우스에 비해 혈장 및 시상하부 모두에서 NAD⁺ 양의

유의한 감소를 나타냈다($P < 0.05$).

- [89] NAD⁺의 투여가 비만 동물모델의 음식섭취에 미치는 영향을 알아보기 위하여, NAD⁺를 ICV 또는 IP 투여하였으며, 종래 알려져 있던 NAD⁺의 전구체인 NMN을 비교실험 대상으로 하였다. 우선, ICV 주사에 의한 NAD⁺의 투여가 비만 동물모델의 음식섭취에 미치는 영향을 알아보기 위해, 밤 사이 금식 상태인 ND 섭취 C57BL/6 마우스에 0.2, 1, 및 2 pmol의 NAD⁺를 혈관내로 단회 투여하였다. NAD⁺를 주사한 마우스는 대조군인 식염수를 주사한 마우스에 비해 감소된 음식 섭취를 나타내었으며(도 2a), 음식섭취의 감소는 NAD⁺투여 후 2시간째부터 시작되어 24시간 동안 유지되었다. 반면에, 밤 동안 금식 상태인 ND 섭취 C57BL/6 마우스에 10, 100, 및 1000 pmol의 NMN을 단일 ICV 주사한 결과, 주사 후 24시간째 식염수를 주사한 마우스에 비해 NMN 10 pmol 주사 마우스에서 음식섭취가 훨씬 더 낮게 나타났다(도 2c).
- [90] 또한, IP 주사에 통한 NAD⁺의 투여가 음식섭취에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 밤 사이 금식 상태인 ND 섭취 C57BL/6 마우스에 대해 0.3, 1, 및 3 mg/kg의 NAD⁺를 복강내로 단회 투여하였다. 그 결과 1 mg/kg의 NAD⁺를 주사한 마우스는 NAD⁺투여 후 4시간째 및 24시간째 모두 식염수를 주사한 마우스에 비해 음식섭취가 상당히 감소된 것을 확인하였다(도 3a,b). 반면에, 밤 사이 금식상태인 C57BL/6 마우스에 30, 100, 및 300 mg/kg의 NMN을 단일 IP 주사한 결과, 300 mg/kg NMN을 주사한 마우스는 식염수를 주사한 대조군에 비해 투여 후 4시간째 상당히 감소된 음식섭취를 나타내었으나, 24시간 후에는 대조군에 비해 음식섭취의 감소를 나타내지 않았다(도 3c,d).
- [91] 또한, NAD⁺의 투여가 비만 동물모델의 체중변화에 미치는 영향을 알아보았다. 식염수를 ICV 주사한 마우스에 비해, NAD⁺ 0.2 pmol을 주사한 마우스는 NAD⁺투여 후 24시간째 상당히 감소된 체중 증가를 나타냈다(도 2b). 반면에 주사 후 24시간 동안의 체중 변화에 있어 대조군 그룹과 NMN-처리 그룹 사이에는 큰 차이가 나타나지 않았다(도 2d).
- [92] 나아가 NAD⁺의 장기간 IP 주사가 체중에 미치는 효과도 확인하였다(도 4). 마우스를 네 그룹(식염수를 IP 주사한 ND 섭취 마우스, NAD⁺를 IP 주사한 ND 섭취 마우스, 식염수를 IP 주사한 HFD 섭취 마우스, NAD⁺를 IP 주사한 HFD 섭취 마우스)로 나누고, 이에 대해 복강 투여량(0.3mg/kg/day)의 NAD⁺를 4주간 하루에 한 번 투여하였다. ND 섭취 비비만 마우스에서는 NAD⁺투여 기간 동안 체중이 식염수 투여군과 비교하여 유의한 차이가 없었으나, HFD 섭취한 비만 마우스는 NAD⁺투여에 의하여 현저한 체중 감소가 유도되었다.
- [93] 또한, NAD⁺의 장기간 IP 주사가 먹이 섭취에 미치는 효과를 다음과 같이 확인하였다. NAD⁺복강 주사가 먹이섭취에 대해 나타내는 만성적 효과를 조사하기 위해, 다음 세 그룹의 마우스에 대해 NAD⁺(0.3mg/kg)혹은 식염수를 4주간 하루에 한 번씩 투여하였다: ND를 섭취한 IP 식염수 주사 그룹, HFD를 섭취한 IP 식염수 주사 그룹, 및 HFD를 섭취한 IP NAD⁺ 주사 그룹.

[94] 식염수를 주사한 ND 섭취 마우스는 주로 야간(사람에서는 주간에 해당함)에 먹이를 섭취하고, 주간에는 먹이를 거의 섭취하지 않는 먹이섭취의 현저한 일중주기 리듬을 보여주었다. 한편 HFD를 섭취한 비만 마우스에서는 야간에도 먹이섭취가 증가하지만 주간에 먹이섭취가 더욱 증가하여 먹이섭취 패턴의 일중주기 리듬이 깨어짐을 보여주었다. 비만 마우스에 NAD⁺ 주사는 야간 먹이섭취를 유의하게 감소시키지 않았으나, 주간의 먹이섭취를 유의하게 감소시켰다. 이러한 연구 결과는 NAD⁺ 치료는 비만증에서 먹이섭취의 일중주기 장애를 개선시키는 효과가 있음을 보여주었다(도 5b).

[95]

[96] <실시예 3>

[97] NAD⁺의 투여가 비만 동물모델의 신체활동성에 미치는 영향

[98] NAD⁺ (0.3mg/kg/day)의 만성적인 IP 주사가 비만 동물모델의 운동성에 미치는 영향을 실험하기 위해, 마우스들을 ND를 섭취한 IP 식염수 주사 그룹, HFD를 섭취한 IP 식염수 주사 그룹, 및 HFD를 섭취한 IP NAD⁺ 주사 그룹의 세 그룹으로 나눠 운동성을 평가하였다. 식염수를 주사한 ND를 섭취 정상 대조군의 신체활동량은 야간(사람에서는 주간에 해당됨.)에 주간에 비하여 현저하게 높아서 신체활동량의 현격한 일중주기 리듬을 관찰할 수 있었다. 반면 식염수를 투여한 HFD 섭취 비만군은 야간의 신체활동량이 대조군에 비하여 유의하게 감소하여 신체활동량의 일중주기 리듬이 깨어짐을 보여주었다. 비만 마우스에서 4주간 NAD⁺의 IP 주사는 야간의 감소된 운동성을 획기적으로 회복시켰다(도 6a 및 6b 참조).

[99]

[100] <실시예 4>

[101] NAD⁺의 투여가 내당능에 미치는 영향

[102] 도 7은 NAD⁺의 단일한 IP 주사가 내당능에 미치는 효과를 보여주는 실험결과이다. NAD⁺의 단일한 IP 주사가 내당능에 미치는 영향을 조사하기 위해, 밤 사이 금식 상태에 있는 ND를 섭취한 C57BL/6 마우스에 대해 경구 당부하 검사를 수행하였다. 단위 IP 투여량의 NAD⁺ (0.3, 1 및 3 mg/kg)를 투여하고, 30분 뒤 경구로 포도당(2 g/kg)을 투여한 뒤 15, 30, 60, 및 120분에 혈당량을 측정하였다. NAD⁺를 주사한 마우스는 식염수를 주사한 마우스에 비해 글루코오스 로딩 후 15 및 30분에 훨씬 더 낮은 혈당량을 나타냈다.

[103]

[104] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본

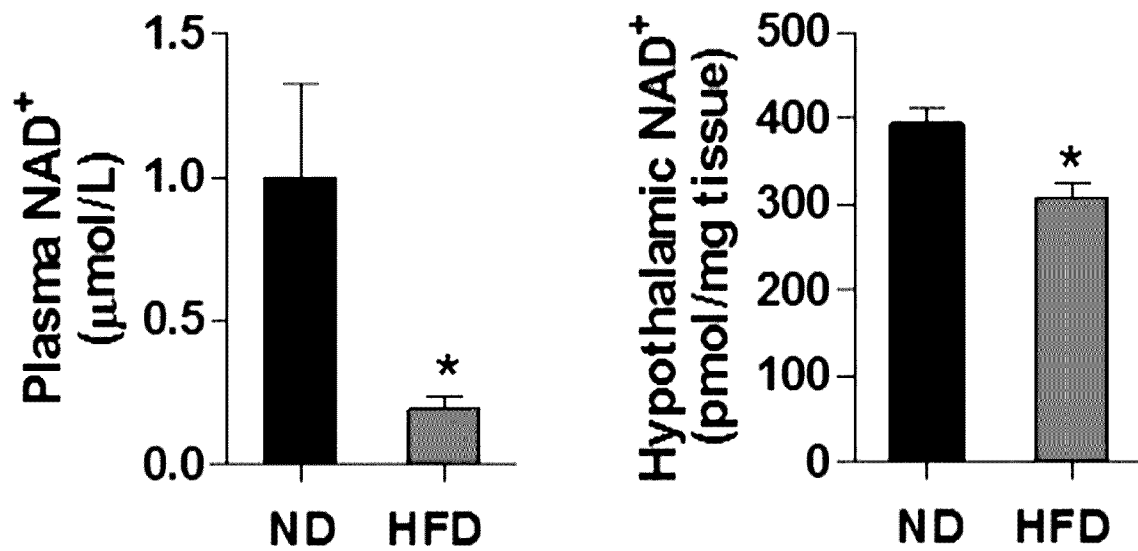
발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

청구범위

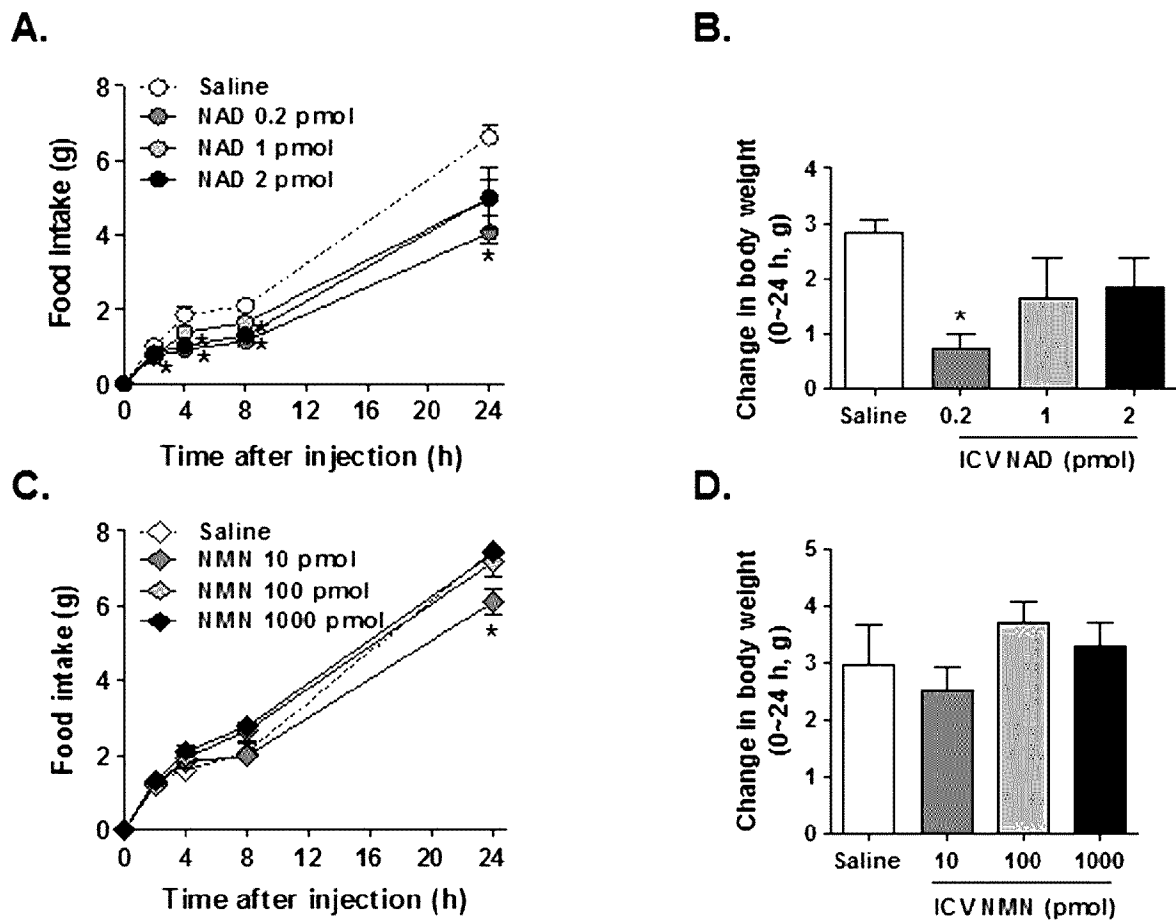
- [청구항 1] NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 비만 또는 내당능장애의 예방 및 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 NAD는 비만 환자의 음식 섭취 시기 및 주기를 포함하는 음식 섭취 패턴을 조절하여 음식 섭취를 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 NAD는 비만 환자의 신체활동량을 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 복강내 투여, 혈관내 투여 또는 경구 투여의 형태로 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 약학적 조성물의 복강내 투여시 NAD의 투여량은 대상 개체의 체중단위인 kg당 0.1 내지 100 mg의 양으로 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 6] 제4항에 있어서,
상기 약학적 조성물의 혈관내 투여시 NAD의 투여량은 대상 개체의 체중단위인 kg당 0.1 내지 100 mg의 양으로 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 7] 제4항에 있어서,
상기 약학적 조성물의 경구 투여시 NAD의 투여량은 대상 개체의 체중단위인 kg당 일일 1 내지 1000 mg의 양으로 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 8] NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 함유하는 비만 또는 내당능장애의 예방 및 개선용 식품 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 NAD는 음식 섭취 시기 및 주기를 포함하는 음식 섭취 패턴을 조절하여 음식 섭취를 감소시키는 기능을 하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 10] 인간을 제외한 포유동물을 대상으로 NAD를 투여하는 단계를 포함하는, 비만 또는 내당능 장애의 예방 및 치료방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 투여는 복강내 투여, 혈관내 투여 또는 경구투여인 것을

- 특징으로 하는 방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 복강내 투여시 NAD의 투여량은 대상 개체 체중단위인 kg당 0.1 내지 100 mg의 양으로 투여하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 13] 제11항에 있어서,
상기 혈관내 투여시 NAD의 투여량은 대상 개체 체중단위인 kg당 대상 개체의 체중단위인 kg당 0.1 내지 100mg의 양으로 투여하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 14] 제11항에 있어서,
상기 경구투여 시 NAD의 투여량은 대상 개체 체중단위인 kg당 대상 개체의 체중단위인 kg당 0.1 내지 1000mg의 양으로 투여하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 15] 제10항에 있어서,
상기 투여는 1일 1회~3회 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

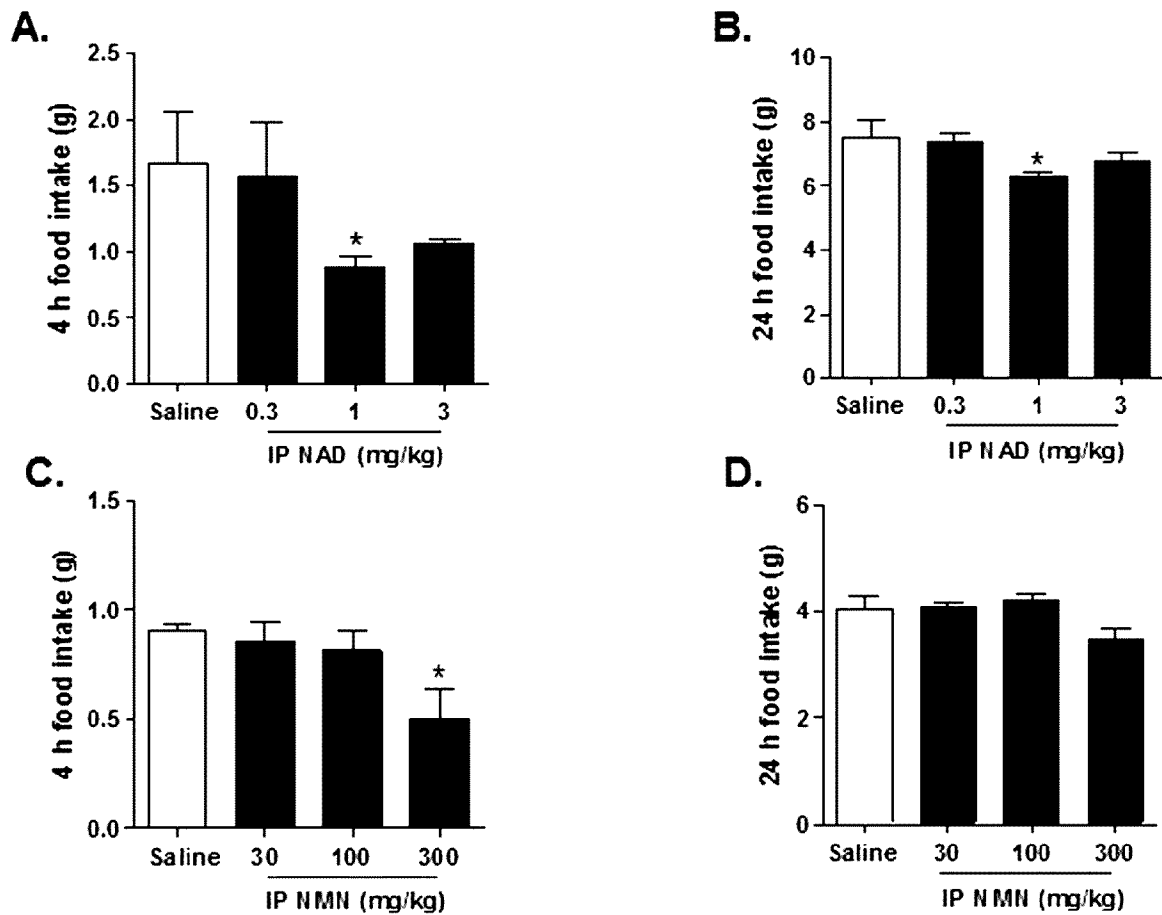
[Fig. 1]



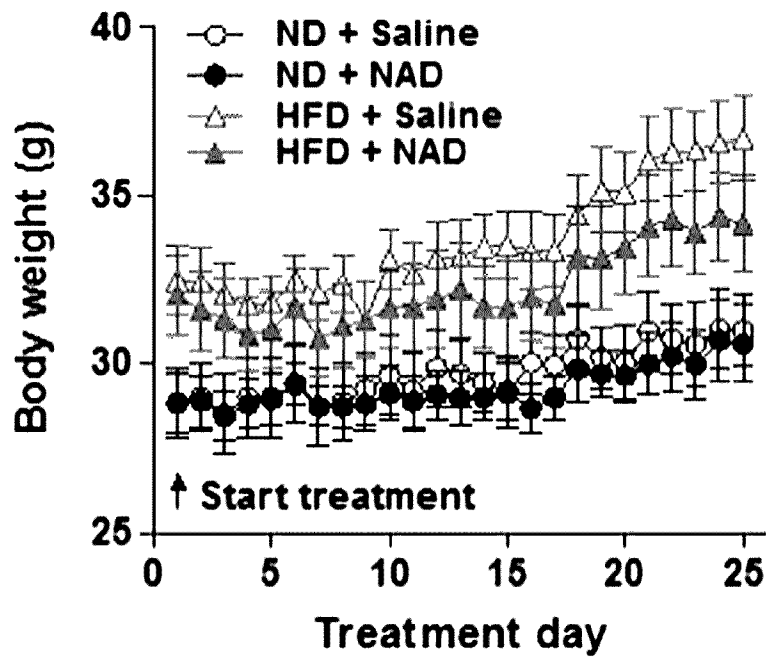
[Fig. 2]



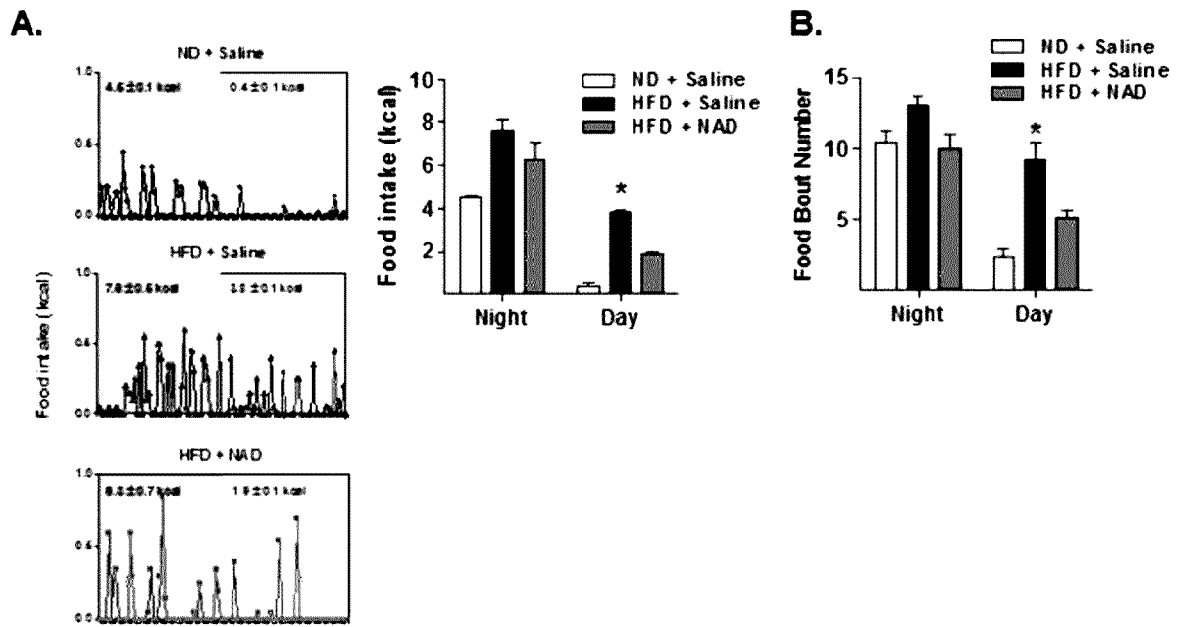
[Fig. 3]



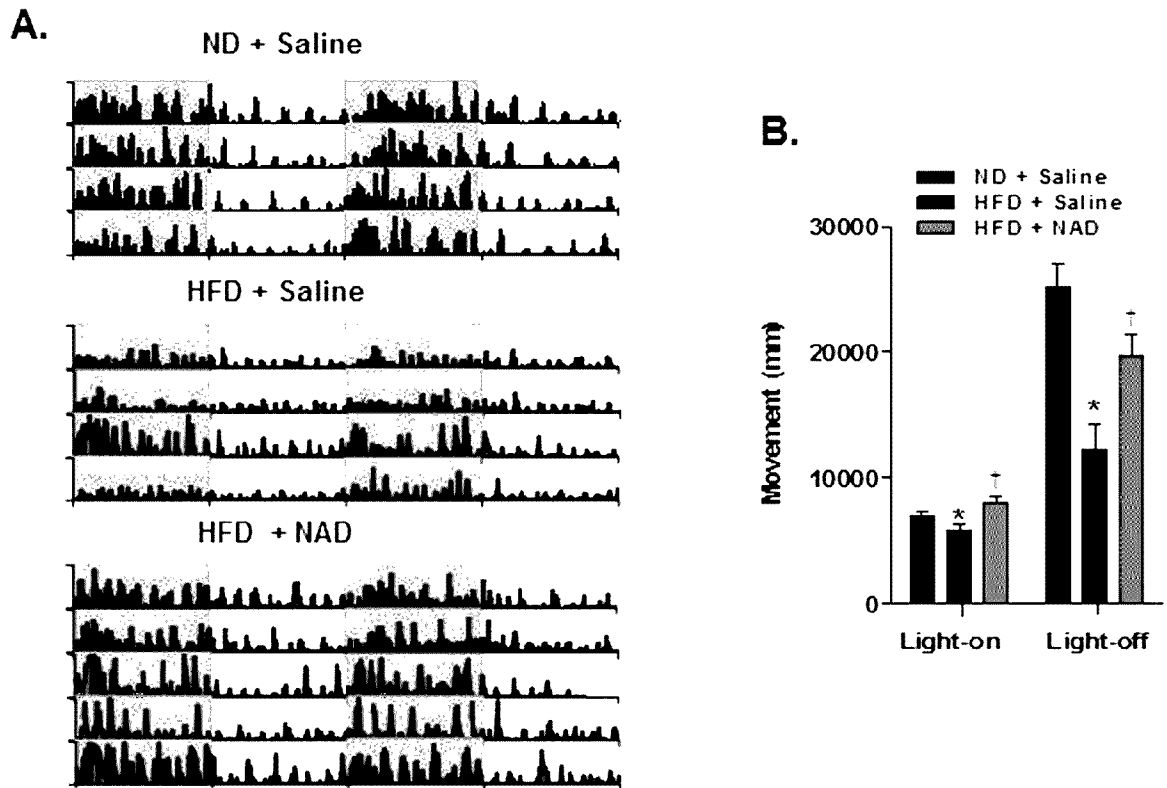
[Fig. 4]



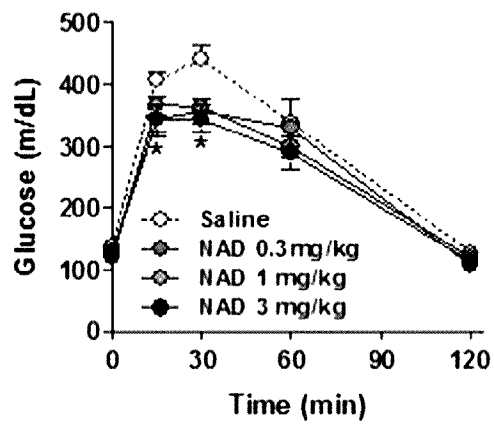
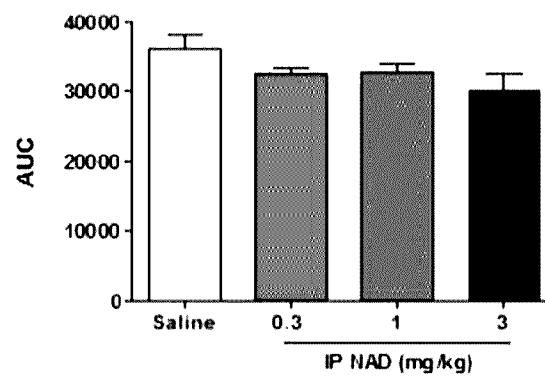
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]

A.**B.**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/007491**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 31/7084(2006.01)i, A61K 9/00(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)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 31/7084; A61P 11/06; A61P 3/10; C12Q 1/54; A61K 7/00; A61K 7/48; A61K 38/22; A61K 9/00; A23L 33/10

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: nicotinamide adenine dinucleotide, obesity, impaired glucose tolerance

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007-0082373 A1 (WASHINGTON UNIVERSITY) 12 April 2007 See paragraphs [0057]-[0060], [0069], [0070], claims 1, 5 etc..	1-15
A	US 2012-0329860 A1 (SIDDARAMAPPA, Umapathy N. et al.) 27 December 2012 See abstract, claims 1 to 20.	1-15
A	JP 2000-507248 A (MAINSTAR ONE INVEST PTY. LTD.) 13 June 2000 See abstract, claims 1 to 9.	1-15
A	KR 10-2008-0110852 A (AMYLIN PHARMACEUTICALS, LLC.) 19 December 2008 See abstract, claims 1 to 74.	1-15
A	LIN, Su - Ju et al., Current Opinion in Cell Biology, 15, 241-246, 2003. See pages 241 to 246.	1-15



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

06 APRIL 2016 (06.04.2016)

Date of mailing of the international search report

07 APRIL 2016 (07.04.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/007491

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2007-0082373 A1	12/04/2007	US 7737158 B2	15/06/2010
US 2012-0329860 A1	27/12/2012	WO 2011-109113 A2	09/09/2011
		WO 2011-109113 A9	16/02/2012
JP 2000-507248 A	13/06/2000	AU 1997-21430 B2	30/09/1999
		CA 2250383 A1	02/10/1997
		CN 1219880 A	16/06/1999
		EP 0901377 A1	17/03/1999
		JP 2000-507248 T	13/06/2000
		NZ 332353 A	28/02/2000
		PL 328964 A1	01/03/1999
		WO 97-35597 A1	02/10/1997
		ZA 9702515 A	26/01/1998
KR 10-2008-0110852 A	19/12/2008	AU 2007-230887 A1	04/10/2007
		CA 2646704 A1	04/10/2007
		CN 101405020 A	08/04/2009
		EP 1996222 A2	03/12/2008
		JP 2009-530407 A	27/08/2009
		US 2010-0004166 A1	07/01/2010
		WO 2007-112069 A2	04/10/2007
		WO 2007-112069 A3	28/08/2008

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/7084(2006.01)i, A61K 9/00(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/7084; A61P 11/06; A61P 3/10; C12Q 1/54; A61K 7/00; A61K 7/48; A61K 38/22; A61K 9/00; A23L 33/10

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: nicotinamide adenine dinucleotide, obesity, impaired glucose tolerance

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2007-0082373 A1 (Washington University) 2007.04.12 식별번호 [0057]-[0060], [0069], [0070], 제1항, 제5항 등 참조.	1-15
A	US 2012-0329860 A1 (UMAPATHY N. SIDDARAMAPPA 등) 2012.12.27 요약, 청구항 제1항 내지 제20항 참조.	1-15
A	JP 2000-507248 A (마인스타원인베스트먼트피티와이.에르티디) 2000.06.13 요약, 청구항 제1항 내지 제9항 참조.	1-15
A	KR 10-2008-0110852 A (아밀린 파마슈티칼스, 인크.) 2008.12.19 요약, 청구항 제1항 내지 제74항 참조.	1-15
A	Su-Ju Lin 외 1명, Current Opinion in Cell Biology, 15, 241-246, 2003. 제241쪽 내지 제246쪽 참조.	1-15

☐ 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

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 04월 06일 (06.04.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 04월 07일 (07.04.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

박수진

전화번호 +82-42-481-8466



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2007-0082373 A1	2007/04/12	US 7737158 B2	2010/06/15
US 2012-0329860 A1	2012/12/27	WO 2011-109113 A2	2011/09/09
		WO 2011-109113 A9	2012/02/16
JP 2000-507248 A	2000/06/13	AU 1997-21430 B2	1999/09/30
		CA 2250383 A1	1997/10/02
		CN 1219880 A	1999/06/16
		EP 0901377 A1	1999/03/17
		JP 2000-507248 T	2000/06/13
		NZ 332353 A	2000/02/28
		PL 328964 A1	1999/03/01
		WO 97-35597 A1	1997/10/02
		ZA 9702515 A	1998/01/26
KR 10-2008-0110852 A	2008/12/19	AU 2007-230887 A1	2007/10/04
		CA 2646704 A1	2007/10/04
		CN 101405020 A	2009/04/08
		EP 1996222 A2	2008/12/03
		JP 2009-530407 A	2009/08/27
		US 2010-0004166 A1	2010/01/07
		WO 2007-112069 A2	2007/10/04
		WO 2007-112069 A3	2008/08/28