



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년03월31일
(11) 등록번호 10-1505901
(24) 등록일자 2015년03월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/9064 (2006.01) A61K 31/20 (2006.01)
A61K 31/202 (2006.01) A61P 3/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-0043950(분할)
(22) 출원일자 2012년04월26일
심사청구일자 2014년04월15일
(65) 공개번호 10-2012-0054582
(43) 공개일자 2012년05월30일
(62) 원출원 특허 10-2009-0033971
원출원일자 2009년04월20일
심사청구일자 2009년04월20일
- (56) 선행기술조사문헌
KR100570496 B1*
JP2004168766 A*
JP2005060366 A
KR1020080097036 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
- (72) 발명자
이현선
대전광역시 유성구 과학로 125
이철호
대전광역시 유성구 과학로 125
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 3 항

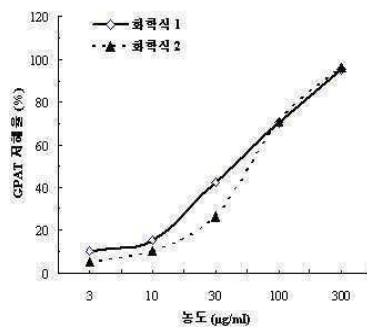
심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 초두구 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 트리테르페노이드계 화합물들을 함유하는 대사성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 초두구 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 트리테르페노이드계 화합물들을 포함하는 대사성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 초두구 추출물, 이의 분획물 및 상기 분획물로부터 분리한 트리테르페노이드계 화합물들은 대사성 질환을 유발하는 GPAT의 활성을 효과적으로 억제하고, 상기 트리테르페노이드계 화합물들은 지방세포 분화 억제 활성, 중성지방의 생합성 저해 활성, 골격근 세포에서의 포도당 섭취 증대 활성을 나타내므로, 본 발명에 따른 트리테르페노이드계 화합물들을 비롯하여 이들을 함유하는 초두구 추출물 및 이의 분획물을 함유하는 본 발명의 조성물은 비만, 제2형 당뇨, 이상지질혈증, 인슐린저항성, 간지방증(hepatic steatosis), 비알콜성 지방간(fatty liver) 등의 대사성 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

박혜란

경기 부천시 원미구 부일로 525, 802호 (심곡동, 동영피렌체아파트)

김일순

대전광역시 유성구 과학로 125

김남예

대전광역시 유성구 과학로 125

이선화

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395018374

부처명 농림수산식품부(농림부)

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 바이오그린21사업

연구과제명 다년생도라지를 활용한 이상지질혈증 또는 기관지염증 개선용 건강기능식품 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한국생명공학연구원

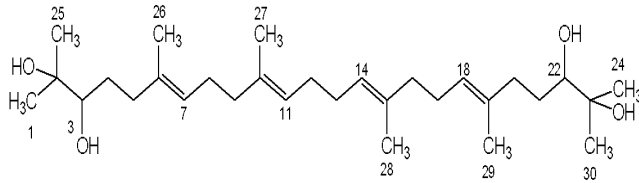
연구기간 2009.01.01 ~ 2009.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1의 트리테르페노이드계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물:

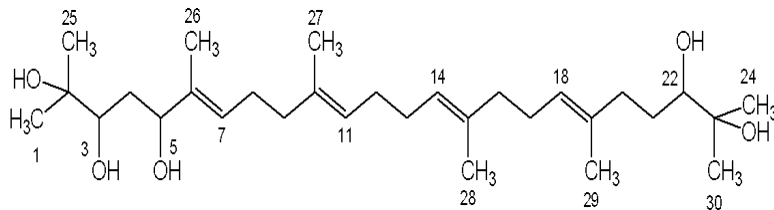
<화학식 1>



청구항 2

하기 화학식 2의 트리테르페노이드계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물:

<화학식 2>



청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 화합물은 초두구(*Alpinia katsumadai*)로부터 추출 및 분리하여 얻은 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 초두구 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 트리테르페노이드계 화합물들을 함유하는 대사성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 중성지방의 생합성은 단단계 반응으로서, 아실-코엔자임 에이(acyl-coenzyme A)의 형태인 지방산이 글리세롤-3-포스페이트(glycerol-3-phosphate)에 부가되는 에스터화 반응으로 시작되고, 마지막 단계는 디아실글리세롤 아실트랜스퍼라제(diacylglycerol acyltransferase; 이하 "DGAT")에 의해 이루어진다.

[0003] 이러한 중성지방 생합성의 첫 단계는 글리세롤-3-포스페이트 경로의 속도를 조절하는 율속단계(rate-limiting step)로서, 글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제(glycerol-3-phosphate acyltransferase; 이하 "GPAT")에 의해 촉매된다.

[0004] GPAT는 글리세롤-3-포스페이트의 sn-1 위치에 지방산 아실-코에이(fatty acyl-CoA)를 전이하여 1-아실글리세롤-3-포스페이트(1-acylglycerol-3-phosphate)를 생성하는 에스터화 반응을 촉매하는 것으로 알려져 있으며(Bell et al, Annu Rev Biochem 49:459-487, 1980), 포유동물에는 2종의 서로 다른 GPAT 동족체(isoform)가 존재한다. 그 중 하나는 N-에틸말레이미드(N-ethylmaleimide)와 설피히드릴시약(sulfhydryl reagents)에 불활성화 되면서 소포체(endoplasmic reticulum)에 존재하는 마이크로솜 GPAT (microsomal GPAT)로서, 세포 내 전체 GPAT 활성의 약 90%를 차지한다. 또 다른 하나는 N-에틸말레이미드에 저항성이 있으면서 미토콘드리아의 외막(outer mitochondrial membrane)에 존재하는 미토콘드리아 GPAT(mitochondrial GPAT; 이하 "mtGPAT")로서, 기질로는 포화 아실-코에이(saturated acyl-CoAs)를 선호한다.

[0005] mtGPAT는 대부분의 조직에 있어서 세포 내 전체 GPAT 활성의 약 10%를 차지하고 있지만, 간 조직에서는 50%까지 차지하고 있다고 알려져 있다(Bell et al, Annu Rev Biochem 49:459-487, 1980).

[0006] 2002년 Coleman 그룹은 mtGPAT 유전자가 결핍된 생쥐를 제작하고 이에 대한 기능을 연구한 결과, 이들 생쥐는 건강하고 생식이 가능하였으며 체중과 부고환 지방(gonadal fat), 간에 축적된 중성지방(hepatic triacylglycerol), 혈중 중성지방의 양, 초저밀도지단백(very low density lipoprotein)-중성지방 분비의 감소를 보였다. 고탄수화물 식이(high-sucrose diet) 투여 시, 야생형 마우스(wild-type mice)는 정상식이 투여군에 비해 간에 축적된 중성지방의 양이 약 4배 높았으나, mtGPAT 유전자가 결핍된 마우스(mtGPAT^{-/-} mice)는 야생형 마우스에 비해 약 50%가 감소하였다(Hammond et al, Mol Cell Biol 22:8024-8214, 2002; Hammond et al, J Biol Chem 280: 25629-25636, 2005).

[0007] 최근에 수행된 연구에서는 C57BL/6 마우스 동물모델에서 간에 특이적인 mtGPAT 과발현은 인지질이나 콜레스테롤 에스터에는 영향을 주지 않고 간에서 중성지방과 디아실글리세롤의 양을 각각 12배와 7배로 증가시켰으며, 지방 세포 분화 관련 단백질(adipocyte differentiation-related protein)과 SCD-1(stearoyl-CoA desaturase-1)의 현저한 증가를 나타내었다. 이러한 SCD-1의 발현 증가는 중성지방과 디아실글리세롤 내의 지방산의 불포화도(간 중성지방 분획에서 18:1과 16:1의 증가)를 증가시키므로써, mtGPAT가 간지방증(hepatic steatosis)과 관련되고 간에서 지방산의 포화도의 정도를 조절하는 중요한 효소(regulatory enzyme)라는 것을 증명하고 있다(Linden, et al., FASEB J 20:434442, 2006).

[0008] 또 다른 연구에서는 중국 햄스터 난소 세포(Chinese hamster ovary cell) 또는 랫트의 1차 배양(primary culture)된 간세포에 있어서 mtGPAT의 과발현은 지질의 축적을 현저하게 증가시켰으며, 디아실글리세롤, 중성지방과 인지질로의 지방산의 유입을 증가시켰다(Linen et al, J Lipid Res 45:1279-1288, 2004; Igal et al, J Biol Chem 276:42205-42212, 2001; Lewin et al, Am J Physiol 288:E835-844, 2005). 또한, 랫트의 간세포에서의 mtGPAT의 과발현은 지방산 산화의 급속한 감소를 보였으며, 이는 mtGPAT와 카르니틴 팔미토일트랜스퍼라제-1(carnitine palmitoyltransferase 1, CPT-1)이 아실-코에이에 대한 기질 경쟁적 관계에 있음을 시사하고 있다(van der Leji et al, Biochem J 341:777-784, 1999; Gonzalez-Baro et al, J Biol Chem 276:4182-43188, 2001). 그러므로 mtGPAT는 베타-산화(beta-oxidation)에서 이용되는 아실-코에이를 중성지방 생합성 쪽으로 되

돌리게 할 수 있다는 것을 알 수 있다.

- [0009] 이와 관련된 연구로서, mtGPAT-결핍(mtGPAT^{-/-})된 마우스에 고지방, 고탄수화물 식이를 섭취시킨 결과, 야생형에 비해 간 조직 내 중성지방이 감소하였고, 혈중 베타-히드록시부티레이트(beta-hydroxybutyrate)가 증가되는 현상을 보였다. 이는 mtGPAT의 저해가 베타-산화의 증가(지방산의 이용률을 증대)로 나타날 수도 있다는 것을 시사한다(Hammond et al, J Biol Chem 280:25629-25636, 2005; Hammond et al, Mol Cell Biol 22:8204-8214, 2002). 따라서, 지방산의 산화가 감소되는 현상은 mtGPAT가 비만 및 인슐린 저항성과 연관된 간에서의 지질축적을 증가시키는 것과 관련된다는 점을 확인할 수 있다.
- [0010] 또한, mtGPAT 과발현은 간에서의 중성지방의 분비율을 증가시키며, 이는 혈중 중성지방 및 콜레스테롤의 증가 현상과 연관될 수 있다. 그러므로 동물모델에서 간에 선택적인 mtGPAT의 과발현은 중성지방의 저장과 분비를 증가시켜 간지방증과 이상지질혈증(dyslipidemia)을 유발시킨다. 특히, 지방간(fatty liver)의 발병률은 비만 환자에서 현저히 높기 때문에 mtGPAT는 비알콜성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease)과 관련된 이상지질혈증, 인슐린저항성 치료제 개발의 매력적인 분자 타겟이 될 수 있다(Linden FASEB J 20:434442, 2006).
- [0011] 따라서, 이 효소의 저해는 중성지방의 세포 내 축적을 저해하는 작용점이 될 수 있으며, GPAT의 지방 축적과 에너지 대사 역할을 조절하는 저분자 저해제의 개발은 비만, 제2형 당뇨, 이상지질혈증, 인슐린저항성, 간지방증, 비알콜성 지방간 등의 대사성 질환의 치료제를 개발하는 전략이 될 수 있다. 그러나, 지금까지 알려진 GPAT 저해제는 보고된 바 없는 상황이다.
- [0012] 초두구(*Alpinia katsumadai*)는 중국 남부, 인도, 베트남, 말레이시아 등 열대 지방 원산의 여러해살이풀로 줄기는 곧게 자라고 뿌리줄기는 굵고 짧으며 잎이 2줄로 나온다. 열매를 초두구라고 하는데, 속을 따뜻하게 하고 습을 몰아내는 효능이 있다.
- [0013] 초두구 추출물의 활성으로 항염, 항소양 작용(Jung et al. J. Dermatol. Sci. 53:81-84, 2008), 항산화작용(Lee et al. Phytother. Res. 17:1041-1047, 2003), 콜레스테롤 에스테라제 저해 효과(Kim et al. Kor. J. Fopod Sci. Technol. 32:200-205, 200) 등이 알려져 있으며 유효성분으로는 신경세포 보호작용을 갖는 플라보노이드 화합물(Jeong et al. Nat. Prod. Sci. 13:268-271, 2007), 항구토 작용을 갖는 디아릴헵타노이드(diarylheptanoid), 독특한 세스퀴터펜과 칼콘이 결합된 물질(Hua et al., Tetrahed. Lett. 49:5658-5661, 2008) 등이 보고되어 있다.
- [0014] 본 발명자들은 GPAT를 억제하는 활성물질을 탐색하는 과정에서 초두구 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리한 트리테르페노이드계 화합물들이 GPAT의 효소활성을 효과적으로 억제하고, 세포 내의 중성지방 생합성을 저해하며, 지방세포 분화를 억제하고, 골격근 세포에서의 포도당 섭취를 증대시켜 비만, 제2형 당뇨, 이상지질혈증, 인슐린저항성, 간지방증, 비알콜성 지방간 등의 대사성 질환의 예방 및 치료 효과가 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0015] 본 발명의 목적은 대사성 질환의 예방 및 치료에 효과적인 초두구 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 트리테르페노이드계 화합물들을 함유하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

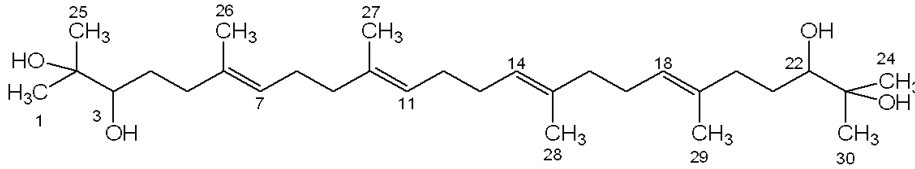
과제의 해결 수단

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 초두구 추출물을 함유하는 대사성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 초두구 추출물로부터 분획된 분획물을 함유하는 대사성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조

성물을 제공한다.

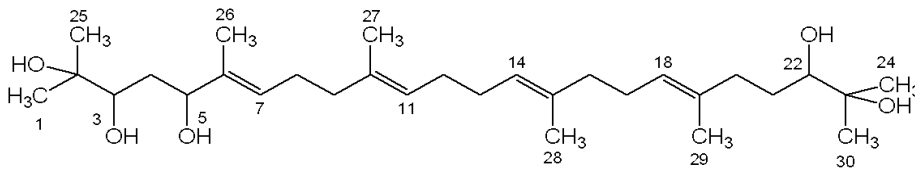
[0018] 또한, 본 발명은 상기 초두구 추출물로부터 분리한 하기 화학식 1 및 화학식 2의 트리테르페노이드계 화합물들 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 대사성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] <화학식 1>



[0020]

[0021] <화학식 2>



[0022]

[0023] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0024] 본 발명은 초두구 추출물, 이로부터 분획된 분획물, 이로부터 분리한 하기 화학식 1 및 화학식 2의 트리테르페노이드계 화합물들 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 대사성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명의 유효성분인 초두구 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 트리테르페노이드계 화합물은 하기의 단계들을 포함하는 분리정제 방법에 의해 제조된다:

- [0026] 1) 초두구를 추출용매로 추출하는 단계;
- [0027] 2) 단계 1)의 초두구 추출물을 여과 및 농축하는 단계;
- [0028] 3) 단계 2)의 농축물을 추가적으로 유기용매로 분획하는 단계;
- [0029] 4) 단계 3)의 분획물로부터 컬럼 크로마토그래피 방법을 통해 활성 분획물을 수득하는 단계; 및
- [0030] 5) 단계 4)의 활성 분획물로부터 HPLC 방법을 통해 활성 화합물을 분리하는 단계.

[0031] 상기 제조방법에 있어서, 단계 1)의 초두구 추출물 및 이로부터 분리된 활성성분은 통상적인 모든 방법에 의해 얻을 수 있고 생약재로부터 추출 및 분리하여 얻을 수 있다.

[0032] 상기 제조방법에 있어서, 단계 1)에서는 초두구를 세척하여 이물질 제거한 후, 그늘에서 건조한 후, 분쇄한다. 분쇄된 초두구에 적당한 양의 용매를 첨가하여 완전히 침지되도록 한다. 추출 용매로는 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매가 바람직하며, 바람직하게는 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜이다. 상기 추출 용매의 양은 바람직하게 3 내지 30배, 바람직하게는 20배이다. 추출 방법은 실온에서 함침하거나, 가온할 수 있으며, 바람직하게는 20 내지 70°C에서 1시간 내지 10일, 초음파 추출 또는 환류 냉각 추출한다. 추출횟수는 1회 내지 5회, 바람직하게는 1회 내지 3회이다. 추출액은 바로 사용하거나 여과, 농축 및/또는 동결건조 등의 과정을 거쳐 사용할 수 있다.

[0033] 상기 제조방법에 있어서, 단계 3)의 유기용매는 클로로포름, 아세트이트, 헥산, 디클로로메탄, 아세톤 또는 아세토니트릴 등이 사용될 수 있다.

[0034] 상기 제조방법에 있어서, 단계 4)의 컬럼 크로마토그래피는 실리카겔, 세파텍스, RP-18, 폴리아미드, 도요펠

(Toyopearl) 및 XAD 수지로 이루어진 균으로부터 선택된 충전제를 이용한 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 분리 및 정제할 수 있다. 컬럼 크로마토그래피는 필요에 따라 적절한 충전제를 선택하여 수차례 실시할 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 컬럼 크로마토그래피에서 충전제로서 실리카겔을 이용하였으며, 클로로포름에 대한 메탄올의 농도가 비율 100:0(부피/부피, v/v)에서 0:100(v/v)의 비율로 증가하는 단계 농도 구배(step gradient) 용매 시스템을 이용하여 활성분획을 1차로 분리한다. 얻어진 분획물 중에서 GPAT 저해활성이 가장 높은 분획들을 모아 물에 대한 메탄올의 농도(v/v)가 70%에서 100%로 10%씩 증가하는 단계 농도 구배 용매 시스템을 이용하여 역상(reverse phase) 컬럼 크로마토그래피로 활성분획을 2차로 분리한다.

[0035] 상기 제조방법에 있어서, 단계 5)에서는 단계 4)에서 분리된 2차 분획물에 대하여 물:메탄올=10:90(v/v) 용매를 사용하여 역상 HPLC로 최종화합물을 분리한다. 최종적으로 분리되어 나오는 물질을 분자량 측정, 분자식 추정 및 핵자기공명(nuclear magnetic resonance, NMR)으로 그 구조를 규명하여, 화학식 1과 화학식 2로 표시되는 트리테르페노이드계 화합물인 것을 확인할 수 있다.

[0036] 본 발명에 따른 초두구 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리된 화학식 1과 화학식 2의 화합물에 대하여 GPAT 저해 활성을 측정한 결과, 상기 추출물, 분획물 및 화합물들은 GPAT 효소 활성을 강력하게 저해하며, 이러한 GPAT 저해 활성은 농도 의존적으로 나타나는 것을 알 수 있었다(표 1, 표 2 및 도 1). 이 때, 화학식 1과 화학식 2의 화합물의 GPAT에 대한 50% 저해 활성을 나타내는 농도인 IC₅₀ 값은 각각 27.0 μ g/ml 및 43.0 μ g/ml로 측정되었다.

[0037] 화학식 1과 화학식 2의 화합물의 중성지방 생합성 저해 활성을 인간 유래 간세포에서 표지된 글리세롤과 표지된 아세테이트를 기질로 하여 DGAT 효소 활성을 저해하는 정도로써 측정한 결과, 대조군에 비하여 우수한 중성지방 생합성 저해 효과를 나타냈다(표 3).

[0038] 또한, 화학식 1과 화학식 2의 화합물의 지방세포 분화에 미치는 효과를 마우스 유래 지방세포에서 오일 레드 O(Oil red O) 염색법으로 알아본 결과, 대조군에 비하여 염색된 부위가 크게 감소함을 알 수 있었고, 이로써 화학식 1과 화학식 2의 화합물에 의해 지방전구세포의 지방세포로의 분화가 억제됨을 확인할 수 있었다(도 2).

[0039] 상기 결과에서 나타난 바와 같이, 화학식 1과 화학식 2의 화합물이 간에서의 중성지방 생합성을 억제하고 지방전구세포에서 지방세포로의 분화를 억제하므로, 이들 화합물과 이들을 포함하는 초두구 추출물 및 이의 분획물이 중성지방 생합성 및 지방세포 분화와 관련된 비만, 제2형 당뇨, 이상지질혈증, 인슐린저항성, 간지방증, 비알콜성 지방간 등의 대사성 질환의 예방 및 치료에 사용될 수 있다는 것을 나타내고 있다.

[0040] 또한, 화학식 1과 화학식 2의 화합물의 골격근 세포에서의 포도당 섭취에 미치는 영향을 알아본 결과, 화학식 1과 화학식 2의 화합물을 처리한 골격근 세포에서는 대조군에 비하여 포도당 섭취가 크게 증가하였으며, 이러한 현상은 인슐린에 비의존적인 것임을 알 수 있었다(도 3).

[0041] 상기의 결과는 화학식 1과 화학식 2의 화합물 및 이들을 포함하는 초두구 추출물 및 이의 분획물이 골격근 세포에서의 포도당 이용을 증가시킴으로써 혈중 포도당을 낮출 수 있음을 시사하며, 이러한 효과는 인슐린에 비의존적인 것이 확인됨으로써 제2형 당뇨 또는 인슐린저항성과 같은 대사질환에 효과적인 예방 및 치료제가 될 수 있음을 나타내고 있다.

[0042] 본 발명의 초두구 추출물은 마우스에 대한 경구 급성 독성 실험에서 1,000mg/kg, 500mg/kg 농도의 단회 경구투여에 따른 독성을 나타내지 않아서 독성을 나타내지 않는 안전한 추출물인 것을 확인할 수 있었다.

[0043] 상기 화학식 1과 화학식 2의 화합물은 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용될 수 있으며, 통상의 방법에 의해 제조되는 모든 염, 에스터 유도체, 수화물 및 용매화물을 포함할 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성되는 산부자염이 포함되며, 유리산 중 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산 또는 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산(citric acid), 초산, 젖산, 주석산(tartaric acid), 말레인산, 푸마르산(fumaric acid), 포름산, 프로피온산(propionic acid), 옥살산, 트리플루오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메탄술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산 또는 아스파르트산 등을 사용할 수 있다.

[0044] 본 발명의 조성물은 초두구 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 트리테르페노이드계 화합물들에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

- [0045] 본 발명의 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 경구 투여를 위한 산제, 과립제, 정제, 환제, 캡슐제, 액제, 현탁제, 유제(에멀전), 시럽제 및 엘릭시르제; 비경구 투여를 위한 멸균된 수용액, 액제, 비수성용제, 현탁제, 에멀전, 시럽, 동결건조 제제, 좌제, 에어로졸, 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명의 조성물은, 제형화를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 희석제, 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 윤활제, 계면활성제, 감미제, 방향제, 보존제, 비수성 용제, 현탁제 및 좌제의 기재 등을 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0047] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 칼슘 카보네이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0048] 상기 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0049] 상기 좌제의 기재로는 위캡슐, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태, 체중, 연령, 성별, 식이, 배설율, 질환의 중증도, 약물형태, 투여시간, 투여방법, 투여경로 및 투여기간 등에 따라 그 범위가 다양하다. 1일 투여량은 본 발명에 따른 추출물, 분획물 또는 화합물을 동결건조하였을 때의 양으로 1mg/kg 내지 500mg/kg, 바람직하게는 10mg/kg 내지 100mg/kg 이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 조성물은 대사성 질환의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0052] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 조성물을 대사성 질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 대사성 질환 치료 방법을 제공한다.
- [0053] 아울러, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 대사성 질환 예방 방법을 제공한다.
- [0054] 상기 예방 또는 치료 방법의 대상은 포유동물일 수 있다. 포유동물의 예로는 비인간 포유동물(예컨대, 개, 고양이, 말, 돼지, 양, 소, 염소, 설치류; 햄스터, 마우스, 래트, 및 영장류) 및 인간을 들 수 있다.
- [0055] 본 발명이 적용가능한 개체는 척추동물이고 바람직하게는 포유동물이며, 그보다 바람직하게는 쥐, 토끼, 기니아 피그, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다.
- [0056] 본 발명에서, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며 물질의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0057] 또한, 문구 "투여"는 본 발명의 조성물을 체장암 세포로 "전신 전달" 또는 "국소 전달"하여 도입되는 것을 뜻한다. "전신 전달"은 유기체 내에 화합물의 광역 생체분포를 유발하는 전달을 지칭한다. 일부 투여 기술은 특정한 화합물의 전신 전달을 유발하고, 다른 것들에는 그렇지 않을 수 있다. 전신 전달은 유용한, 바람직하게는 치료적으로 유효한 양의 화합물이 신체의 대부분에 노출되는 것을 의미한다. 일반적으로, 광역 생체분포를 얻기 위해, 화합물이 투여 부위와 멀리 떨어진 질환 부위에 도달하기 전에 빠르게 분해되거나 제거되지 않도록(예를

들면, 최초 통과 기관(간, 폐 등)에 의해 또는 빠른 비특이적 세포 결합에 의해) 하는 혈액내 수명이 요구된다. 본 명세서에 사용된 "국소 전달"은 유기체 내에서 표적 부위에 화합물을 직접 전달하는 것을 지칭한다. 예를 들면, 화합물은 질환 부위, 예를 들면 종양 또는 다른 표적 부위, 예를 들면 표적 기관, 예를 들면 췌장에 직접 주사함으로써 국소 전달될 수 있다.

발명의 효과

[0058] 본 발명에 따른 초두구 추출물, 이의 분획물 및 상기 분획물로부터 분리한 트리테르페노이드계 화합물들은 대사성 질환을 유발하는 GPAT의 효소 활성을 효과적으로 억제하고, 상기 트리테르페노이드계 화합물들은 지방세포 분화 억제 활성, 세포 내의 중성지방 생합성의 저해 활성, 골격근 세포에서의 포도당 섭취 증대 활성을 나타내는 것이 확인되었다. 따라서, 본 발명에 따른 트리테르페노이드계 화합물들을 비롯하여 이들을 함유하는 초두구 추출물 및 이의 분획물을 함유하는 본 발명의 조성물은 비만, 제2형 당뇨, 이상지질혈증, 인슐린저항성, 간 지방증, 비알콜성 지방간 등의 대사성 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0059] 도 1은 화학식 1과 화학식 2의 화합물의 GPAT의 저해 활성을 나타낸 도이다.
 도 2는 화학식 1과 화학식 2의 화합물의 지방세포 분화 억제효과를 나타낸 도이다.
 도 3은 화학식 1과 화학식 2의 화합물의 쥐의 골격근세포인 L1 세포에서의 포도당 섭취 활성을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
 [0061] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 초두구 추출물 및 클로로포름 분획물의 제조

[0062] 건조된 초두구 100g을 분쇄하여 메탄올 2ℓ를 가하여 3시간씩 2회 가열 추출하였다. 추출액을 여과하고, 감압 농축하여 메탄올 추출물 약 20.3g을 얻었다. 활성물질을 분리하기 위해 상기 초두구 메탄올 추출물 20g을 증류수 500ml에 현탁시킨 다음 동량의 클로로포름으로 3회 추출하여 클로로포름 분획과 물 분획을 얻었다. 상기 분획들의 GPAT 효소 저해 활성 측정 결과 클로로포름 분획에서 보다 우수한 저해활성을 보였다.

<실시예 2> 초두구 추출물로부터 분획물 및 화합물의 분리

[0064] 상기 클로로포름 분획 (약 10.5g)을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에 적용하고 클로로포름/메탄올의 혼합액을 이동상으로 하여 혼합액의 비를 100:0, 100:1, 90:1, 70:1, 50:1, 30:1, 20:1, 5:1, 0:100으로 순차적으로 용매 극성을 올리면서 각 분획 당 200ml로 용출시켜 총 18개의 분획으로 분리하였다(분획물1 ~ 분획물18).
 [0066] 이들 중 저해활성이 가장 강한 분획물을 모아 70%, 80%, 90%, 100% 메탄올/물 혼합용매로 순차적으로 극성을 증가시키면서 역상 컬럼크로마토그래피 (reverse phase column chromatography)로 활성분획을 분리하였다. 이 중 저해활성이 강한 분획을 모아 용출용매로 90% 메탄올/물 혼합용매를 5 ml/분(min)로 흘려주면서 고속역체크로마토그래피(YMC J'sphere ODS H-80 column, 250x20mm)를 실시하여 최종적으로 순수한 화합물 2종 (화학식 1과 화학식 2)을 얻었다.

<실시예 3> 화합물의 구조 규명

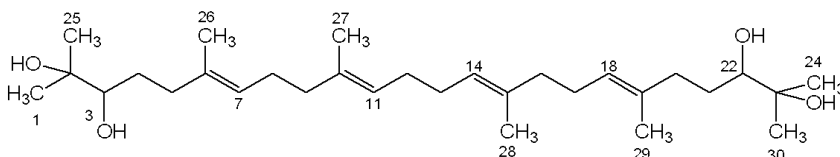
[0067] 상기 화합물은 물질의 성상, 분자량, 분자식, 질량분석, ¹H-NMR 스펙트럼 및 ¹³C-NMR 스펙트럼을 측정된 결과 발표된 문헌(Nishiyama et al. Phytochemistry 42(3):803-807,1996)의 데이터와 일치하였으며, 2,3,22,23-테트라

히드록시-2,6,10,15,19,23-헥사메틸-6,10,14,18-테트라코사테트라센(2,3,22,23-tetrahydroxy-2,6,10,15,19,23-hexamethyl-6,10,14,18-tetracosatetracene)과 2,3,5,22,23-펜타히드록시-2,6,10,15,19,23-헥사메틸-6,10,14,18-테트라코사테트라센(2,3,5,22,23-pentahydroxy-2,6,10,15,19,23-hexamethyl-6,10,14,18-tetracosatetracene)으로 동정하였다.

[0069] 초두구로부터 분리된 화합물의 이화학적 특성과 화학 구조는 하기와 같다.

[0070] <화학식 1>

[0071] 2,3,22,23-tetrahydroxy-2,6,10,15,19,23-hexamethyl-6,10,14,18-tetracosatetracene



[0072]

[0073] 1) 성상 : 황색오일

[0074] 2) 분자량 : 478

[0075] 3) 분자식 : $C_{30}H_{54}O_4$,

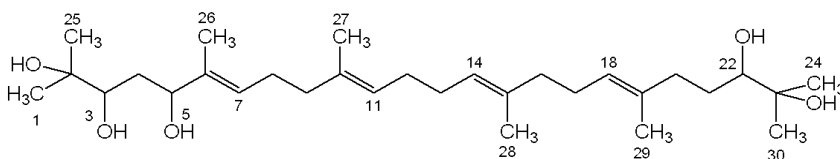
[0076] 4) ESI-질량분석 : $m/z = 501[M+Na]^+$,

[0077] 5) 1H -NMR(400MHz, $CDCl_3$, δ (ppm)) : 1.15 (3H, s, H-25,30), 1.19 (3H, s, H-1,24), 1.40 (1H, m, H4 α , 21 α), 1.58 (1H, m, H-4 β , 21 β), 1.59 (3H, s, H27,28), 1.61 (3H, s, H-28,29), 1.99 (1H, m, H-12,13), 2.01 (1H, m, H-9,16), 2.06 (1H, m, H5 α , 20 α), 2.08 (1H, m, H-8,17), 2.23 (1H, m, 5 β , 20 β), 3.36 (1H, dd, $J=2.0, 10.5$ Hz, H-3,22), 5.13(1H, m, H-11,14), 5.18 (1H, m, H-7,18)

[0078] 6) ^{13}C -NMR(100MHz, $CDCl_3$, δ (ppm)) : 15.9 (C-27,28), 16.0 (C-26,29), 23.2 (C-25,30), 26.4 (C-1,24), 26.5 (C-8,17), 28.2 (C-9,16), 29.6 (C-4,21), 36.8 (C-5,20), 39.6 (C-12,13), 72.9 (C-2), 78.2 (C-3,22), 124.4 (C-11,14), 125.0 (C-7,18), 134.8 (C-10,15), 134.9 (C-6,19).

[0079] <화학식 2>

[0080] 2,3,5,22,23-pentahydroxy-2,6,10,15,19,23-hexamethyl-6,10,14,18-tetracosatetraen



[0081]

[0082] 1) 성상 : 황색오일

[0083] 2) 분자량 : 494

[0084] 3) 분자식 : $C_{30}H_{54}O_5$,

[0085] 4) ESI-질량분석 : $m/z = 517[M+Na]^+$,

[0086] 5) 1H -NMR(400MHz, $CDCl_3$, δ (ppm)) : 1.14 (3H, s, H-30), 1.16 (3H, s, H-25), 1.19 (1H, s, H-24), 1.20 (3H, s, H-1), 1.40 (1H, m, H-21 α), 1.58 (1H, m, H-2 β), 1.61 (3H, s, H-28), 1.63 (3H, s, H-27), 1.64 (3H, s, H-26), 1.65 (2H, m, H-4 α β), 2.03 (2H, m, H-16 α β), 2.10 (2H, m, H-8 α β), 2.13(2H, m, H-13 α β), 2.13(2H, m, H-17 α β), 2.14 (5H, m, H-9 α β , 12 α β , 20 α), 2.26 (1H, m, H-20 β), 3.33 (1H, d, $J=1.8, 10.6$ Hz, H-22), 3.60 (1H, m, H-3), 4.25 (1H, m, H-5), 5.15 (1H, m, H-14), 5.19 (1H, m, H-

11), 5.20 (1H, m, H-18), 5.42 (1H, t, J=6.6 Hz, H-7)

[0087] 6) ¹³C-NMR(100MHz, CDCl₃, δ(ppm)) : 11.83 (C-26), 16.09 (C-29), 16.18 (C-28), 16.19 (C-27), 23.42 (C-30), 23.95 (C-25), 26.21 (C-8), 26.40 (C-1), 26.56 (C-24), 26.59 (C-13, C-17), 28.35 (C-16), 29.85 (C-21), 36.03 (C-4), 37.02 (C-20), 39.42 (C-9), 39.80 (C-12), 72.80 (C-23), 73.27 (C-2), 78.43 (C-5), 78.55 (C-22), 78.87 (C-3), 124.63 (C-14), 124.83 (C-18), 125.22 (C-11), 126.52 (C-7), 134.85 (C-15), 135.03 (C-19), 135.20 (C-10), 137.27 (C-6)

[0088] <실시예 4> 화학식 1 및 화학식 2의 화합물의 글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제(glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT)의 활성 저해 효과 측정

[0089] 상기에서 얻어진 초두구 추출물 및 이로부터 분리된 비환식 트리테르페노이드계 화합물의 GPAT 활성을 측정하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0090] 흰쥐, SD(SpragueDawley)계 랫트의 간 조직을 적출하여 미토콘드리아 분획 (mitochondrial fraction)과 마이크로솜 분획(microsomal fraction)을 효소원으로 사용하였다. 간 조직은 수크로오스 완충액[sucrose buffer: 250 mM sucrose, 10 mM Tris (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1 mM DTT]으로 균질화한 후 원심분리(600g, 15분)하여 상등액만을 취하고, 이를 다시 8,000g에서 15분 동안 원심분리 하였다.

[0091] 얻어진 침전물은 수크로오스 완충액에 현탁하여 미토콘드리아 GPAT(mitochondrial GPAT)의 효소원으로 사용하였다. 또한, 침전물을 제거한 상등액은 100,000g에서 60분 동안 원심분리하여 얻은 침전물을 수크로오스 완충액에 현탁하여 마이크로솜 GPAT 효소원으로 사용하였다. 미토콘드리아 GPAT와 마이크로솜 GPAT 효소원은 BSA(bovine serum albumin)를 사용하여 브래드포드 방법(Bradford Method)으로 단백질의 농도를 결정하였고, -70℃에 보관한 후 실험에 사용하였다.

[0092] 마이크로솜 GPAT 효소의 활성은 N-에틸말레이미드(N-ethylmaleimide; NEM)에 의해 그 활성이 소실되며, 미토콘드리아 GPAT 활성만을 측정할 때에는 실험 전에 N-에틸말레이미드를 전처리함으로써 마이크로솜 GPAT 활성을 소실시킨 후 실험을 진행하였다.

[0093] 미토콘드리아 GPAT 효소의 활성은 랫트의 미토콘드리아 GPAT 효소원에 의해 생성된 반응물인 [¹⁴C]리소포스파티드산([¹⁴C]Lysophosphatidic acid)의 방사선 양으로 측정하였다. 미토콘드리아 GPAT의 활성은 실험 전 미토콘드리아 GPAT 효소원에 2 mM N-에틸말레이미드를 15분 동안 얼음 욕조(ice bath)에서 전처리하여 마이크로솜 GPAT의 활성을 실험시킨 후 측정하였으며, 마이크로솜 GPAT의 활성은 N-에틸말레이미드(2 mM)를 마이크로솜 GPAT 효소원에 전처리하여 전체 GPAT 활성과 마이크로솜 GPAT의 효소 활성 비율을 측정하여 마이크로솜 GPAT 효소원의 활성 결과를 보정하여 효소 활성을 측정하였다.

[0094] 효소 반응에 사용된 기질은 [¹⁴C]글리세롤-3-포스페이트(500 mM)와 팔미토일-코에이(palmitoyl-CoA) (100 mM)이며, 이들 기질은 반응액(75 mM Tris (pH 7.5), 4 mM MgCl₂, 8 mM NaF, 2 mg/ml BSA)과 함께 26℃에서 20분 동안 반응 후, 수포화 부탄올과 물에 의해 반응이 정지되었다. 반응물은 원심분리를 통하여 물 층과 부탄올 층으로 분리되었고, 반응 생성물인 [¹⁴C]리소포스파티드산이 포함된 상층액(부탄올 층) 800μl를 취하였다. 상층액은 동량의 물과 진탕하여 원심분리를 통해 물 층과 부탄올 층으로 다시 분리하였고 상층액 600μl를 취하여 액체섬광계측기 (liquid scintillation counter; LSC)로 방사능의 양(Disintegrations per minute, DPM)을 측정하였다. 상기 실시예 1 및 2에서 제조한 초두구 추출물 및 분획물의 최종농도를 50, 100 μg/ml의 농도로 처리하고, 상기 실시예 2에서 제조한 화학식 1과 화학식 2의 화합물의 최종농도를 300, 100, 30, 10, 3μg/ml의 농도로 처리하여 GPAT 효소 활성을 측정하였다.

[0095] 시료에 의한 GPAT 효소 활성의 저해율은 하기 수학적 1로 계산하였다.

[0096] [수학적 1]

[0097] 저해 활성(%) = {1-[(T-B)/(C-B)]} x 100

- [0098] ※ T : 효소 반응액에 시료를 넣은 시험 구의 DPM 값,
- [0099] C : 효소 반응액에 시료를 넣지 않은 대조 구의 DPM 값,
- [0100] B : 효소원을 넣지 않고 시료를 넣은 대조 구의 DPM 값.

[0101] 본 발명의 초두구 추출물 및 분획의 GPAT 저해 활성은 표 1에 나타냈으며, 화학식 1과 화학식 2의 화합물의 GPAT 저해 활성은 표 2와 도 1에 나타냈다.

표 1

[0102] 초두구 추출물 및 각 분획물의 GPAT 저해 활성

	최종농도($\mu\text{g}/\text{ml}$)	GPAT 저해율(%)
메탄올 추출물	50	42.5
	100	64.9
클로로포름 분획	50	48.0
	100	70.0
물 분획	50	10.0
	100	12.0

표 2

[0103] 화학식 1과 화학식 2의 화합물의 GPAT 저해 활성

	최종농도($\mu\text{g}/\text{ml}$)	GPAT 저해율(%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
화학식 1	300	95.5	27.0
	100	70.3	
	30	42.3	
	10	15.2	
	3	10.1	
화학식 2	300	96.2	43.0
	100	70.9	
	30	26.5	
	10	10.0	
	3	5.1	

[0104] 표 1, 표 2 및 도 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 초두구 추출물 및 이로부터 분리된 비환식 트리테르페노이드계 화합물은 GPAT 저해 활성이 우수하며, 농도의존적으로 GPAT 저해 활성을 나타내었다. 또한, 화학식 1과 화학식 2의 화합물의 GPAT에 대한 50% 저해 활성을 나타내는 농도인 IC₅₀ 값은 각각 27.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 43.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다.

[0105] 상기 결과에 의하여, 본 발명의 초두구 메탄올 추출물은 GPAT 효소를 강력하게 저해하였으며, 이러한 GPAT의 저해 활성이 클로로포름으로 분획한 분획물에서 강하게 나타남을 알 수 있었다.

[0106] <실시에 5> 화학식 1 및 화학식 2의 화합물의 HepG2 세포 내에서의 중성지방 생합성저해 효과 측정

[0107] 본 발명의 화합물에 의한 세포 내에서의 중성지방 합성에 미치는 영향을 알아보기 위해, 인간 유래 간세포인 HepG2 세포를 이용하여 2종의 기질에 대한 세포 내에서의 중성지방 생합성 저해 활성을 측정하였다.

[0108] HepG2 세포는 ATCC에서 분양 받았으며, MEM(Minimum essential medium, 2 mM L-글루타민; 및 1.5g/L 탄산수소나트륨(sodium bicarbonate), 0.1 mM 불필수 아미노산(nonessential amino acids) 및 1mM 피루브산 나트륨(sodium pyruvate)을 함유하도록 조제된 earle`s BSS) 배지에 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum; FBS)과 1%

항생제(100 U/ml penicillin 및 100 g/ml streptomycin)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양시켰다.

[0109] 세포 내에서의 GPAT 효소 활성은 배양된 HepG2 세포에서 생성된 중성지방의 양으로 측정하였으며 효소활성 저해 물질로 화학식 1과 화학식 2의 화합물을 각각 첨가한 후 중성지방의 생성의 감소율에 따라 효소 저해제의 효과를 결정하였다.

[0110] 24 well 배양접시에 well 당 1×10⁶ cell/ml의 세포수로 분주하여 24 시간 동안 배양한 후 FBS가 존재하지 않는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지로 교환하고 기질로서 0.2mCi의 [¹⁴C]아세테이트(Amersham사)를 첨가시키고 6 시간 동안 반응시켰다. 또 다른 기질로 사용된 [¹⁴C]글리세롤의 경우 18시간 동안 반응시켰다. 시료는 디메틸설폭사이드에 녹여 사용하였으며, 중성지방 생성반응에서의 대조구는 시료를 넣지 않고 디메틸설폭사이드만으로 반응을 시켰으며, 이로써 생성된 중성지방의 생성율을 100으로 하였다.

[0111] 반응이 끝난 세포 내에서 중성지방의 생성량을 측정하기 위해 세포로 흡수되지 않고 남아있는 기질인 [¹⁴C]아세테이트 또는 [¹⁴C]글리세롤을 제거하고, PBS(phosphate-buffer-saline)로 1회 세척한 후, 추출용매(헥산:아이소프로판올 = 3:2, v:v) 0.5 ml을 첨가하여 중성지방을 포함한 전체 지방을 추출하였다. 0.5 ml 추출 용매로 30분씩 2회 추출 후 얻어진 추출액 1 ml은 질소가스를 통해 농축하였으며, 추출용매를 제거한 후 전체 지방을 유기용매(클로로포름:메탄올 = 2:1)에 녹여 박층 크로마토그래피(TLC: silica gel 60F₂₅₄, thickness: 0.5mm, Merck)에 점적하여 전개용매(헥산:디에틸에테르:아세트산 = 80:20:1, v:v:v)상에서 전개하였다. TLC 상에서 중성지방(Rf 값: 0.4)을 분리한 후 TLC 판을 방사능 에너지를 감광할 수 있는 필름에 3시간 동안 감광한 후 이미지 분석(BAS-1500, Fuji Photo Film Co. Ltd.)을 통해 중성지방의 [¹⁴C] 방사능 양을 측정하였다. 추출 후 남아 있는 세포는 0.1 N 수산화나트륨 0.3 ml 에 녹여 반응에 이용된 세포의 단백질 농도 측정에 이용하였다.

[0112] 중성지방의 방사능 양을 측정하여 단백질 농도로 나눈 값을 실험값으로 하여 각 시험군 사이의 실험 오차를 보정하여 본 발명의 화학식 1과 화학식 2의 화합물에 의한 중성지방의 생성율을 표 3에 나타내었다.

표 3

[0113] 화학식 1과 화학식 2의 화합물의 HepG2 세포 내에서의 중성지방 생합성 저해 정도

화합물(ug/ml)	사용된 기질	중성지방 생성율(대조군의 백분율)		
		대조군(DMSO)	5 μg/ml	10 μg/ml
화학식 1	[¹⁴ C]glycerol	100 ± 17.3	53.3 ± 11.2	25.1 ± 6.1
	[¹⁴ C]acetate	100 ± 10.8	66.5 ± 7.5	49.3 ± 10.6
화학식 2	[¹⁴ C]glycerol	100 ± 17.3	41.3 ± 3.1	11.6 ± 2.7
	[¹⁴ C]acetate	100 ± 10.8	50.5 ± 2.8	30.2 ± 5.5

[0114] 표 3에 나타난 바와 같이 화학식 1과 화학식 2의 화합물을 각각 5 μg/ml의 농도로 처리하고 [¹⁴C]글리세롤을 기질로 사용했을 때 세포 내의 중성지방 생성을 각각 46.7%, 58.7% 저해했으며, [¹⁴C]아세테이트를 기질로 사용했을 때, 대조군에 비해 33.5%, 49.5%의 우수한 지방생합성 저해 활성을 나타냈다.

[0115] 즉, 이 화합물들은 세포 내에 들어가 DGAT 효소활성을 저해함으로써 세포 내의 중성지방 생합성을 억제함을 보여주고 있다.

[0116] <실시예 6> 화학식 1과 화학식 2의 화합물의 마우스 유래 지방세포인 3T3-L1 세포에서의 지방세포 분화 저해 효과 측정

[0117] 3T3-L1 지방전구세포를 9X10⁴ cells/well로 48웰 플레이트(well plate)에 분주하고 3일 뒤 배지 전면에서 증식한 상태(confluent)가 된 후 분화용 배지로 교환했다. 이때 분화용 배지는 10% FBS, 5 ug/ml의 인슐린, 1uM의 덱사메타손(dexamethsone), 0.5 mM의 3-이소부틸-1-메틸잔틴(3-isobutyl-1-methylzanthine)이 함유된 DMEM 배지

를 사용했다. 48시간 뒤 분화용 배지로 교환하고, 또 48시간 뒤 분화용 배지로 교환하고 여기에 0.2 nM 올레산 (oleic acid)을 첨가하여 오일 입자(oil droplet)가 많이 생성된 지방세포를 만들었다. 시료는 배지 교환 시마다 농도별로 처리했으며 분화 유무는 Oil red O 염색법으로 염색하여 현미경으로 관찰했다.

[0118] 분화시킨 플레이트를 PBS로 세척한 후 10% 글루타르알데히드 (glutaraldehyde)로 20분간 고정하고 증류수로 1회 세척 후, 10% 이소프로판올 (isopropanol)로 세척한 뒤 Oil red 용액으로 30분간 염색하여 지방세포 내에 생성된 지방이 붉은색으로 염색되게 하였다. 이 때 화학식 1과 화학식 2의 화합물을 10 µg/ml의 농도로 처리했을 때 대조군(DMSO)에 비하여 붉은색으로 염색된 부위가 크게 감소함을 볼 수 있으며(도 2), 이로써 화학식 1과 화학식 2의 화합물에 의해 지방전구세포에서 지방세포로의 분화가 억제됨을 알 수 있었다.

[0119] <실시예 7> 화학식 1과 화학식 2의 화합물의 L6 세포(rat skeletal myoblast cell line)에서의 포도당 섭취 증가 효과 측정

[0120] L6 근아세포(myoblasts)주는 FBS 10%를 포함하는 DMEM(4mM L-글루타민, 1.5g/L 탄산수소 나트륨, 4.5g/L 포도당) 배지에 배양했다. 24웰 플레이트에서 배양된 세포주는 80%가 배지 전면에서 증식한 상태에서 PBS로 세포를 두 번 세척한 후 0.2% FBS DMEM (4mM L-글루타민, 1.5g/L 탄산수소 나트륨, 1g/L 포도당) 배지로 교환하여 24시간 배양했다.

[0121] 이 조건하에서 근아세포(myoblastes) 상태의 세포는 근관세포(myotubes)로 분화하게 된다. 분화된 L6 세포에 인슐린을 비롯한 화학식 1과 화학식 2의 화합물을 5 µg/ml의 농도로 일정시간 처리한 후 KRB(Krebs-Ringer Buffer) 완충액에서 30분간 배양했다. KRB에서 배양된 세포에 0.1mM의 2-데옥시-2-글루코오스 (2-deoxy-D-glucose)와 표지된 2-데옥시-2-글루코오스 (2-deoxy-D-[¹⁴C]glucose, 0.2uCi/ml)를 처리한 후 10분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 세포에서 KRB 완충액을 제거하고 KRB 완충액으로 3번 세척한 후 1M 수산화나트륨(NaOH)으로 세포를 용해시켰다. 1M 수산화나트륨에 용해된 세포는 방사성 측정기 (scintillation counter)로 측정하여 포도당 섭취 정도를 판단했다. 대조양성군으로는 알파-리포산(alpha-lipoic acid)을 1 mM의 농도로 사용하였다.

[0122] 도 3에서 알 수 있듯이 화학식 1과 화학식 2의 화합물을 5 µg/ml의 농도로 처리하였을 때 대조군 (DMSO)에 비해 포도당 섭취를 크게 증가시켰으며 인슐린에 비의존적인 것으로 나타났다.

[0123] <실시예 8> 초두구 추출물의 급성 독성 실험

[0124] 본 발명의 초두구 추출물의 경구 급성 독성을 알아보기 위하여 마우스를 사용하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0125] 실험동물은 SPF(specific pathogen free) 동물로서 7 주령의 수컷 ICR 마우스(대한바이오링크, 충북 음성)를 도입하여 1주일간 순화기간을 거쳐 8 주령이 되었을 때 각 군당 5마리씩 배정하여 실험에 사용하였다. 대조군에는 0.5% 카복시메틸 셀룰로오스 (carboxymethyl cellulose, CMC) 용액만을 투여하였고, 시험군에는 상기 실시예 1에서 제조한 본 발명의 초두구 추출물을 각각 1,000mg/kg, 500mg/kg의 용량으로 경구 투여한 후 2주간 독성 여부를 관찰하였다.

[0126] 실험 결과, 모든 군에서 사망한 동물은 없었으며, 특이한 행동이나 독성증상의 소견을 보이는 동물은 발견되지 않았다. 또한, 모든 군에서 체중이 증가하였으며 부검 시 관찰한 흉강 및 복강 내 모든 장기에서 특이한 병변이나 이상 소견은 발견되지 않았다.

[0127] 따라서, 본 발명의 초두구 추출물은 마우스에 대하여 각각 1,000mg/kg, 500mg/kg 농도의 단회 경구투여에 따른 독성을 나타내지 않는 것을 알 수 있었다.

[0128] **제제예 1 : 산제의 제조**

[0129] 초두구 추출물(분획물, 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물) 0.1 g

[0130] 유당 1.5 g

[0131] 탈크 0.5 g

[0132] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0133] **제제예 2 : 정제의 제조**

[0134] 초두구 추출물(분획물, 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물) 0.1 g

[0135] 락토오스 7.9 g

[0136] 결정성 셀룰로오스 1.5 g

[0137] 마그네슘 스테아레이트 0.5 g

[0138] 상기의 성분들을 혼합한 후 직타법(direct tableting method)으로 정제를 제조하였다.

[0139] **제제예 3 : 캡슐제의 제조**

[0140] 초두구 추출물(분획물, 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물) 0.1 g

[0141] 옥수수전분 5 g

[0142] 카르복시 셀룰로오스 4.9 g

[0143] 상기의 성분들을 혼합하여 분말을 제조한 후, 상기 분말을 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라 경질 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0144] **제제예 4 : 주사제의 제조**

[0145] 초두구 추출물(분획물, 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물) 0.1 g

[0146] 주사용 멸균 증류수 적량

[0147] pH 조절제 적량

[0148] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플 당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조하였다.

[0149] **제제예 5 : 액제의 제조**

[0150] 초두구 추출물(분획물, 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물) 0.1 g

[0151] 이성화당 10 g

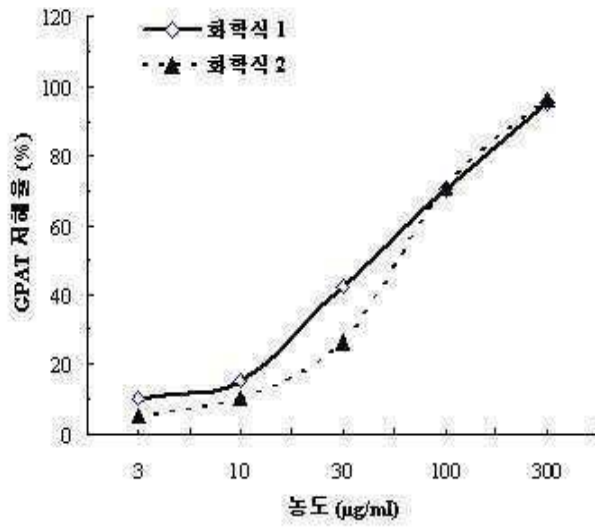
[0152] 만니톨 5 g

[0153] 정제수 적량

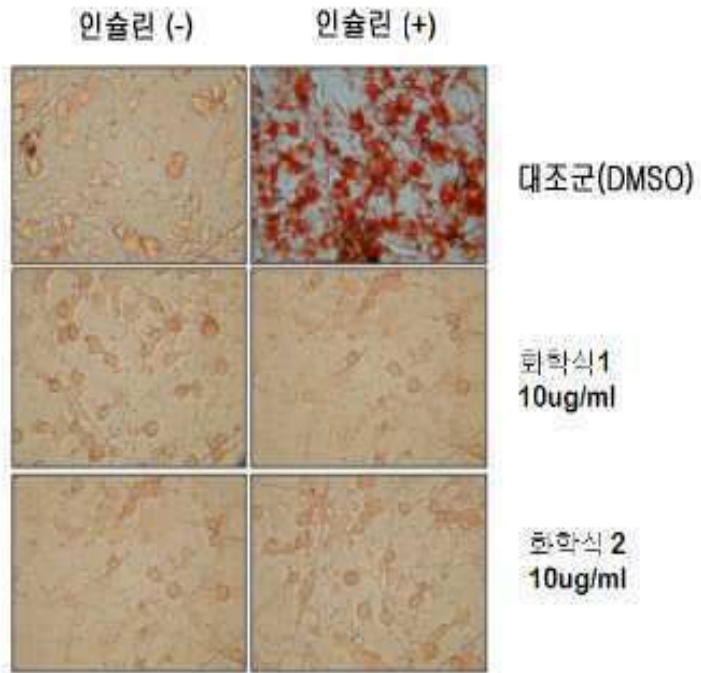
[0154] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고, 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합하였다. 그 다음 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조하였다.

도면

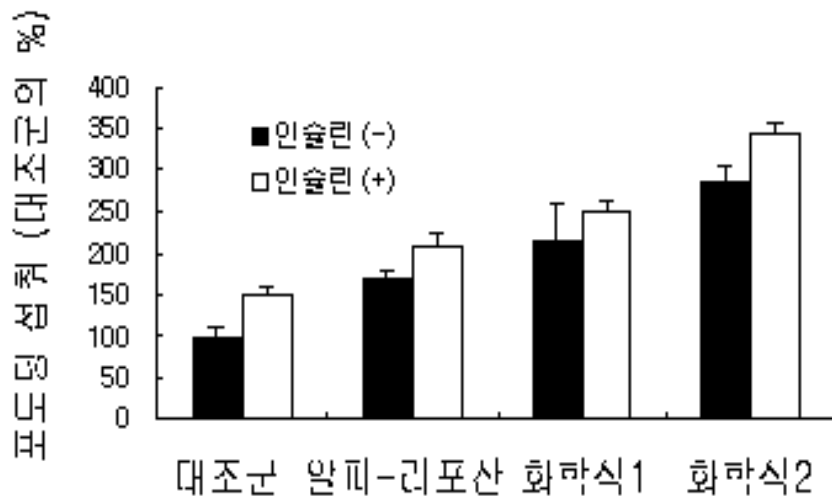
도면1



도면2



도면3



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 제2항

【변경전】

화학식 1 및 <화학식 1>

【변경후】

화학식 2 및 <화학식 2>