



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0070664
(43) 공개일자 2010년06월28일

(51) Int. Cl.

A61K 31/404 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0129313

(22) 출원일자 2008년12월18일

심사청구일자 2008년12월18일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

박태선

서울 서대문구 연희동 740번지 성원아파트 104동 1903호

(74) 대리인

양부현

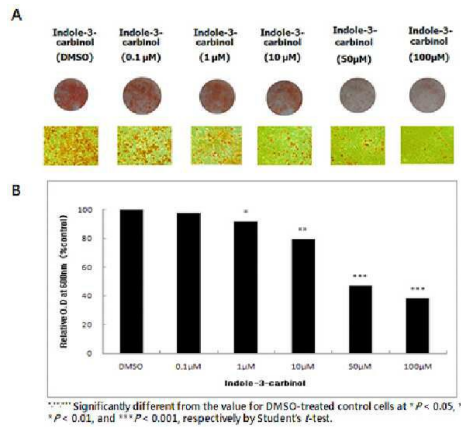
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 인돌-3-카비놀 유도체를 유효성분으로 포함하는 비만, 고지혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 인돌-3-카비놀(indole-3-carbinol) 유도체를 유효성분으로 포함하는 비만, 고지혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 인돌-3-카비놀 유도체는 지방세포 분화의 억제, 체지방량의 감소, 내장 지방량의 감소, 총콜레스테롤 농도의 감소, 혈장 중성지방 및 간조직 중성지방의 감소, 공복 시 혈당 감소 및 혈중 인슐린 농도의 감소를 초래하여, 궁극적으로 비만, 고지혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방 또는 치료 활성을 나타낸다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A080020

부처명 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 건강기능식품소재의 대사질환 개선효능 평가 및 작용기작 규명을 통한 산업화 중개연구

주관기관 연세대학교 산학협력단

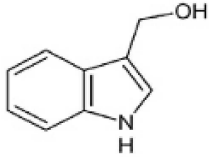
연구기간 2008년 05월 01일 ~ 2010년 03월 31일

특허청구의 범위

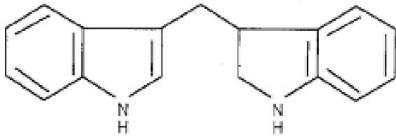
청구항 1

다음의 화학식 1 내지 6 중 어느 하나로 표시되는 인돌-3-카비놀 유도체를 유효성분으로 포함하는 비만, 고지혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방 또는 치료용 조성물:

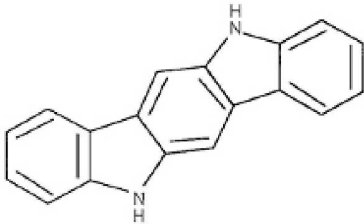
화학식 1



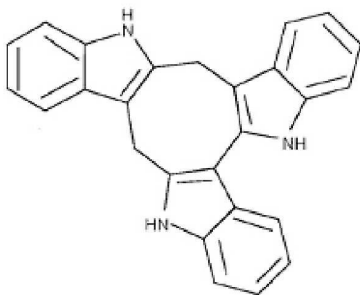
화학식 2



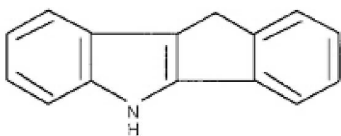
화학식 3



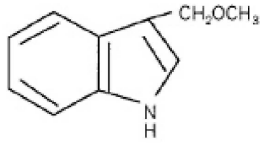
화학식 4



화학식 5



화학식 6



청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 인돌-3-카비놀 유도체는 십자화과(Cruciferae/Brassicaceae) 식물의 추출물 또는 분획물에 포함된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 십자화과 식물은 *브라시카 올레라체아*(*Brassica oleracea*), *브라시카 라파*(*Brassica rapa*), *브라시카 나푸스*(*Brassica napus*), *라파누스 사티부스*(*Raphanus sativus*), *아로마시아 루스티카나*(*Armoracia rusticana*), *마티올라*(*Matthiola*) 및 *아라비도프시스 탈리아나*(*Arabidopsis thaliana*)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

(a) 상기 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 조성물의 치료학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 비만, 고지혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 5

(a) 상기 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 조성물의 식품학적 유효량; 및 (b) 식품학적으로 허용되는 담체를 포함하는 비만, 고지혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 십자화과 식물 추출물 또는 인돌-3-카비놀 유도체를 포함하는 비만, 고지혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 생활환경의 변화에 의해 현대인들의 내장지방형 비만이 증가하면서 당뇨병, 고혈압, 지질대사이상, 인슐린저항성 등을 수반하는 대사증후군(metabolic syndrome)의 발병이 급증하고 있다. 이들 질환은 상호간의 발생위험을 증가시키며, 노화, 스트레스 및 면역기능저하 등의 다원적인 생체대사변화와 관련이 있는 공통 질환이다.

[0003] 2005년 국민건강·영양조사결과에 의하면 20세 이상 한국성인의 32%가 비만으로 나타났다(성인남자의 35.2%, 여자의 28.3%). 한국인의 소아비만 발병률도 최근 급증하고 있으며, 2005년에는 초등학생의 11.3%, 중학생 10.7%, 고등학생 16%가 비만으로 분류되었으며(BMI $\geq 25 \text{ kg/m}^2$), 과체중(BMI $\geq 23 \text{ kg/m}^2$) 또는 비만청소년의 17%가 대사증후군을 나타냈다.

- [0004] 이와 같은 과체중 및 비만인구의 증가는 만성질환 유병률 증가로 이어지는데, 그 예로 2005년 30세 이상 한국인의 고혈압(남자 30.2%, 여자 25.6%), 당뇨병(남자 9.0%, 여자 7.2%), 그리고 고콜레스테롤혈증 유병률(남자 7.5%, 여자 8.8%)이 모두 다른 나라에 비해 매우 높게 나타나고 있다. 2005년, 당뇨병으로 인한 사망률은 한국인의 경우 인구 100,000명당 35.5명으로, 일본 (5.9명), 영국 (7.5명), 또는 독일 (16.6명)에 비해 3-7배 이상 높은 것으로 조사되었다. 한국인의 당뇨병 환자수의 증가추이를 살펴보면, 3,000,000명이었고, 2030년에는 5,450,000명으로 증가할 것으로 예측되는데, 이는 곧 한국인의 10%가 당뇨병환자가 된다는 것을 의미한다.
- [0005] 보건사회연구원의 통계에 따르면, 2006년 비만 및 비만합병증으로 인한 사회경제적 손실은 진료비와 치료에 따른 소득손실 등 간접비용까지 합해 총 2조 1천억원으로 추정된다. 이에 따라 정부는 성인비만율을 20% 이하, 그리고 청소년 비만율을 15% 이하로 낮추는 것을 2010년 국민건강증진의 주요 목표로 설정하고, 목표달성을 위한 시행전략으로 비만과 대사질환에 대한 정확한 정의와 측정방법을 모색키로 한 바 있다.
- [0006] 주요 비만치료제로서 효능을 가진 제품들이 수입되어 국내에서 다량으로 판매되고 있는데, 그 중에서도 제니칼, 리덕틸, 엑소리제 같은 항비만제품들이 널리 알려져 있다. 올리스타트(Orlistat)를 주원료로 하는 제니칼은 세계최초의 비만치료제로서 리파아제의 작용을 억제하여 지방흡수를 억제시키고, 총콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤 농도를 감소시키는 효과가 있으며, 혈당 개선효과 및 혈압 저하효과를 보인다. 시부트라민(sibutramine)을 주원료로 하는 리덕틸은 1997년 FDA의 승인을 받아 세계 30여개 국가에서 판매 중인 제품으로 교감신경계의 세로토닌과 노르아드레날린을 고농도로 유지하여 교감신경흥분, 식욕저하 및 포만감을 유도하는 효능이 있다. 마지막으로 엑소리제는 프랑스에서 수입되는 비처방 반제품이며, 열발생을 증가시켜 신체의 기초대사량을 높여 주고, 리파제활성을 억제시켜 장내 지방흡수를 30% 정도 감소시키며, 노르아드레날린 생성을 증가시킴으로써 에너지 소모량을 증가시키는 작용이 있다.
- [0007] 비만은 식사요법, 운동요법과 행동수정요법을 병행해야 최상의 치료효과를 거둘 수 있지만, 이러한 방법은 시간과 노력이 많이 소요되고 실행이 어렵기 때문에 비만치료제 또는 다이어트제품이 많이 이용되고 있다. 그러나 현재 비만 치료제로서 이용되고 있는 올리스타트는 지방변, 장내가스발생, 복부팽만감 등의 부작용이 있고, 시부트라민은 두통, 구갈, 식욕부진, 불면, 변비 등의 부작용이 알려져 있다. 또한 올리스타트는 비타민 E와 비타민 D의 흡수를 억제하고, 펜터민(phentermine)과 시부트라민은 심박수 증가, 심계항진 또는 현기증을 초래하는 부작용이 있다.
- [0008] 이와 같이 합성의약품의 부작용과 만성질환의 극복에 서양의학이 한계를 보임에 따라 천연물 신약에 대한 가치가 새롭게 부각되고 있다. 이에 본 발명자들은 자생식물로부터 비만을 억제하는 활성물질을 탐색하는 과정에서 브로콜리, 양배추 등의 브라시카과(Brassica family) 식물에 다량 함유되어 있는 파이토크에미컬(phytochemical) 화합물인 인돌-3-카비놀(indole-3-carbinol)에 주목하게 되었다.
- [0009] 인돌-3-카비놀은 브로콜리, 양배추 등의 브라시카과 식물에서 추출한 화학적 혼합물로 구조식은 C_9H_9NO 이고 분자량은 147.17이다. 인돌-3-카비놀은 인돌그룹의 부속물로 회색빛이 도는 흰색의 고체이며 절단, 분쇄, 저장과 같은 분해과정 혹은 조리과정 및 생체 내 효소에 의해 생성된다. 효소 미로시나제(myrosinase)에 의해 전구체인 인돌-3-글루코시놀레이트(indole-3-glucosinolate)로부터 만들어진다.
- [0010] 현재까지 알려진 인돌-3-카비놀의 주요 생리기능은 항산화 및 항암작용이다. 인돌-3-카비놀은 자유기(free radical)에 의한 세포손상을 방지하고, 특히, 유방, 전립선 또는 생식기관의 세포손상을 억제함으로써 건강을 유지시켜 준다. 전립선 암세포(Prostate cancer cell)에 인돌-3-카비놀을 25-100 μM 농도로 처리한 결과, G1 체크포인트를 정지시킴으로써 세포주기를 차단하고, 암세포의 증식을 억제하는 효과를 나타냈다. 인돌-3-카비놀 처리는 암세포에서 종양억제 유전자(tumor suppressor gene)인 p21과 p27의 발현을 증가시키는 반면, NF- κ B의 발현은 감소시키는 효과가 있다. 또한 유두종(papilloma)이 나타난 18명의 환자에게 인돌-3-카비놀을 투여한 결과, 12명의 환자들은 수술을 하지 않아도 될 만큼 유두종의 성장이 정지되었다. 기능성식품시장에서 인돌-3-카비놀은 식이보조제(dietary supplement)로 분류되어 있으며 항산화효능으로 사용 판매되고 있다.
- [0011] 미국 특허 제7071195호는 뉴로펩타이드 Y Y5의 리간드 작용을 하는 아민 및 아미드 유도체를 이용하여 비만을 치료하는 방법이 개시되어 있다. 미국 특허 제7022722호는 당뇨, 고지혈 또는 비만을 치료하기 위한 티아졸리딘디온 유사체를 개시하고 있다.
- [0012] 미국 특허 제6987131호는 페닐아세틸글루타민, 페닐아세틸이소글루타민 또는 페닐아세트산을 포함하는 고지혈 치료용 조성물을 개시하고 있다. 미국 특허 제6942967호는 동맥경화증, 고지혈증, 비만 및 당뇨병 치료 타겟으로서의 apobec-1 단백질을 개시하고 있다.

[0013] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허 문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0014] 본 발명자들은, 항비만, 항고지혈 및/또는 항당뇨 등의 활성을 갖는 천연물질을 개발하고자 노력하였다. 그 결과 십자화과(Cruciferae/Brassicaceae) 식물의 추출물에 포함된 인돌-3-카비놀(indole-3-carbinol)이 상기의 활성을 갖는다는 사실을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

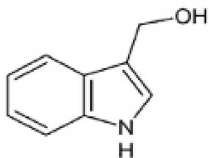
[0015] 따라서 본 발명의 목적은 인돌-3-카비놀 유도체를 유효성분으로 포함하는 비만, 고지혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

[0016] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결수단

[0017] 본 발명의 일 양태에 따르면, 인돌-3-카비놀을 유효성분으로 포함하는 비만, 고지혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 인돌-3-카비놀 유도체는 하기 화학식 1의 구조를 갖는다:

[0018] **화학식 1**



[0019]

[0020] 본 발명자들은, 항비만, 항고지혈 및/또는 항당뇨 등의 활성을 갖는 천연물질을 개발하고자 노력하였다. 그 결과 십자화과 식물에 포함된 인돌-3-카비놀이 상기의 활성을 갖는다는 사실을 발견하였다.

[0021] 상기 인돌-3-카비놀은 고지혈증, 지방간 또는 비만의 예방 또는 치료 활성을 나타낸다. 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 인돌-3-카비놀은 지방세포 분화 억제, 체지방량의 감소, 내장 지방량의 감소, 총 콜레스테롤 농도의 감소, 혈장 중성지방 및 간조직 중성지방의 감소를 초래하여 고지방 식이로 유도된 비만 현상을 현저히 완화하는 효능을 발휘한다. 또한, 인돌-3-카비놀은 공복시 혈당 및 혈중 인슐린 농도의 유의한 감소를 초래하여 제 2형 당뇨 또는 인슐린 저항성을 개선하는 효과 및 이와 밀접하게 관련된 대사성 염증반응을 개선하는 효능도 발휘한다.

[0022] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 인돌-3-카비놀은 상기 고지혈증, 지방간 또는 비만의 예방 또는 치료 활성을 갖는 화학적 유도체 및 생물학적으로 전환된 유도체를 포함한다. 예를 들어, 인돌-3-카비놀은 산성용액 하에서 극히 불안정하여 위산에 노출될 경우 생물학적 활성에 의해 다른 유도체로 변화되며(de Kruif, C. A., et al. (1991)*Chem.-Biol. Interact.* 80: 303-315.), 이러한 유도체들은 기초식이와 인돌-3-카비놀을 경구투여한 래트의 장내 성분에서 발견되었다(Grose, K. R., and Bjeldanes, L. F. (1992) *Chem. Res. Toxicol* 5: 188-193.; Bradfield, C. A. and Bjeldanes, L. F. (1987). *J. Toxicol. Environ. Health* 21: 311-323.; Bjeldanes, L. F., et al. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88: 9543-9547.; Kwon, C.-S., et al. (1994)*J. Agr. Food Chem.* 42: 2536-2540.). 인돌-3-카비놀은 위장의 낮은 pH 환경 하에서 산 촉매 반응을 통하여 3,3'-다이인돌

릴메탄(3,3'-diindolylmethane, DIM) 및 인돌로[3,2-b]카바졸(indolo[3,2-b]carbazole, ICZ)과 같은 생물학적 활성분자인 다이머로 전환된다(Bjeldanes, L. F., et al. (1991).*Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88: 9543-9547.).

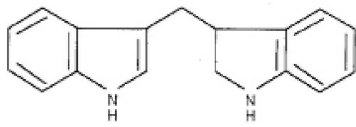
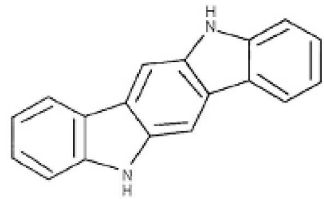
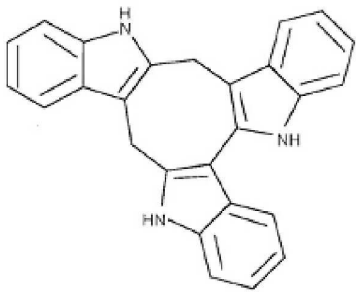
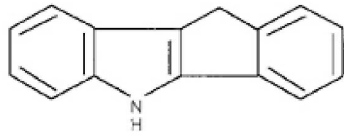
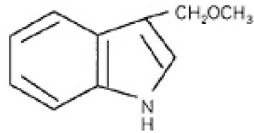
한편, ICZ는 장내 박테리아의 대사 산물로 인돌, 트립토판 등으로부터 생성될 수도 있다(Kwon, C.-S., et al. (1994).*J. Agr. Food Chem.*42: 2536-2540.).

[0023] 상기 유도체 이외에도, 십자화과 식물의 절단, 분쇄 혹은 저작과 같은 분해과정 또는 조리과정이나 생체내 효소로 인한 반응을 통하여 다양한 인돌-3-카비놀유도체가 생성되며, 대표적인 것으로 5,6,11,12,17,18-헥사하이드로사이클론[1,2-b:4,5-b':7,8-b"]트리인돌 (5,6,11,12,17,18-hexahydrocyclon[1,2-b:4, 5-b':7,8-b"] triindole, CTr), 5,10-디하이드로인덴노[1,2-b]인돌 (5,10-Dihydroindeno[1,2-b]indole), 3-(메톡시메틸)인돌 (3-(Methoxymethyl)indole) 등이 있다(Jin Seok Kang et al. (2000)*Journal of Korean Association of Cancer Prevention*.5(4): 199-208.).

[0024] 상기와 같이 수용액 상에서 불안정한 인돌-3-카비놀은 비닐위치 헤미아미날(vinylogous hemiaminal) 형성으로 유도체를 형성하며, 손쉽게 탈수 반응을 일으켜 3-메틸렌인돌니움 양이온(3-methyleneindolenium cation)이 된다(Grose, K. R., and Bjeldanes, L. F. (1992) *Chem. Res. Toxicol* 5: 188-193.; Bjeldanes, L. F., et al. (1991).*Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88: 9543-9547.). 상기 양이온은 곧바로 인돌-3-카비놀을 포함하는 다양한 친핵체(nucleophile)와 반응하여 인돌-3-카비놀과 생물학적으로 동등 또는 유사한 활성을 갖는 여러 가지 다양한 유도체를 합성 또는 제조할 수 있다. 상기 유도체들 중 대표적인 예들을 나타내면 표 1과 같다.

표 1

[0025] 인돌-3-카비놀의 대표적인 화학적 유도체 및 생물학적으로 전환된 유도체

인돌-3-카비놀 유도체의 이름	화학식
3,3' -다이인돌릴메탄(DIM)	
인돌로[3,2-b]카바졸(ICZ)	
5,6,11,12,17,18-헥사하이드로사이클론[1,2-b:4,5-b':7,8-b"] 트리인돌(CTr)	
5,10-디하이드로인덴노[1,2-b]인돌	
3-(메톡시메틸)인돌	

- [0026] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 인돌-3-카비놀 또는 그의 유도체는 십자화과 식물의 추출물 또는 분획물에 포함된 것이다.
- [0027] 십자화과 식물은 브라시카세아(Brassicaceae) 또는 크루시페라(Cruciferae)라고 불리는 쌍자엽 식물(Angiospermae)로 브라시카세아라는 이름은 브라시카 속(genus Brassica)으로부터 유래된 것이다. 크루시페라는 그 보다 오래된 이름으로 4개의 꽃잎이 십자가를 암시할 수 있도록 교차되어 있기 때문에 “십자가의 의미(cross-bearing)”를 갖는다. 파이토키미컬 화합물인 인돌-3-카비놀을 다량 함유하는 상기 십자화과 식물은 영국의 Royal Botanic Gardens, Kew에 따르면, 330 속의 약 3,700 여종 이상을 포함하고 있는 것으로 알려져 있다. 본 발명에서 이용되는 십자화과 식물은 인돌-3-카비놀 유도체를 포함하는 한 특별하게 제한되지 않으며, 바람직하게는 *브라시카 올레라체아(Brassica oleracea)*에 속하는 양배추(cabbage), 브로콜리(broccoli), 콜리플라워(cauliflower), 브뤼셀 스프라우츠(brussels sprouts), 콜라드(collards), 케일(kale) 등, *브라시카 라파(Brassica rapa)*에 속하는 순무(turnip), 배추(Chinese cabbage) 등, *브라시카 나푸스(Brassica napus)*에 속하는 평지씨(rapeseed) 등, *라파누스 사티부스(Raphanus sativus)*에 속하는 일반 무(radish) 등, *아로마시아 루스티카나(Armoracia rusticana)*에 속하는 서양고추냉이(horseradish), *마티올라(Matthiola)*에 속하는 스톡(stock), *아라비도프시스 탈리아나(Arabidopsis thaliana)* 등이다(Hall, J. C., K. J. Sytsma and H. H. Iltis. 2002. Phylogeny of Capparaceae and Brassicaceae based on chloroplast sequence data. *American Journal of Botany* 89: 1826-1842; Walter S. Judd, Christopher S. Campbell, Elizabeth A. Kellogg, Peter F. Stevens, Michael J. Donoghue: *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*, Sinauer Associates Inc. 2007; Stevens, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 7, May 2006; Strasburger, Noll, Schenck, Schimper: *Lehrbuch der Botanik fHochschulen*. 4. Auflage, Gustav Fischer, Jena 1900, p. 459).
- [0028] 인돌-3-카비놀 유도체를 포함하는 십자화과 식물 추출물은 십자화과 식물(바람직하게는, 십자화과 식물의 목부에 통상적인 추출용매를 이용하여 얻을 수 있으며, 바람직하게는 (a) 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올(예: 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올 및 노말-부탄올 등), (b) 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, (c) 아세톤, (d) 에틸 아세테이트, (e) 클로로포름, (f) 1,3-부틸렌글리콜, (g) 헥산, (h) 디에틸에테르, (i) 부틸아세테이트 또는 (j) 물을 추출용매로 하여 얻을 수 있다.
- [0029] 인돌-3-카비놀 유도체를 포함하는 십자화과 식물 분획물은 십자화과 식물 추출물을 추가적으로 분리/정제하여 얻은 보다 단리/정제된 형태(form)를 의미한다. 예컨대, 십자화과 식물 추출물을 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 얻은 분획, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 분획도 십자화과 식물 분획물에 포함되는 것이다.
- [0030] 또한, 상기의 인돌-3-카비놀 유도체는 화학적으로 합성할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 인돌-3-카비놀 유도체는 상기 십자화과 식물에서 분리한 것 이외에 합성하여 제조된 인돌-3-카비놀 유도체를 포함한다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 인돌-3-카비놀 유도체를 포함하는 비만, 고지혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 또는 식품 조성물을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

- [0034] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여 방식으로 적용된다.
- [0035] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 mg/kg 범위 내이다.
- [0036] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로서 인돌-3-카비놀 유도체뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.
- [0038] 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 인돌-3-카비놀 유도체 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.
- [0039] 인돌-3-카비놀 유도체를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 지방세포 분화의 억제, 체지방량의 감소, 내장 지방량의 감소, 총콜레스테롤 농도의 감소, 혈장 중성지방 및 간조직 중성지방의 감소, 공복시 혈당 감소 및 혈중 인슐린 농도의 감소를 초래하여, 궁극적으로 비만, 고지혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방 또는 치료 활성을 나타낸다.
- [0040] 본 명세서에서 사용되는 용어 “고지혈증”은 중성 지방과 콜레스테롤 등의 지방대사가 제대로 이루어지지 않아 혈액 중에 지방량이 많아 유발되는 질환을 말한다. 보다 구체적으로 고지혈증이란 혈액내의 중성지방, LDL 콜레스테롤, 인지질 및 유리 지방산 등의 지질 성분이 증가된 상태로 발생빈도가 높은 고콜레스테롤지혈증을 말한다.
- [0041] 본 명세서에서 사용되는 용어 “지방간”은 간의 지방대사 장애로 지방이 간세포에 과도한 양으로 축적된 상태를 말하며, 이는 협심증, 심근경색, 뇌졸중, 동맥경화, 지방간 및 췌장염 등과 같은 다양한 질병의 원인이 된다.
- [0042] 본 명세서에서 사용되는 용어 “당뇨병”은 포도당-비관용(intolerance)을 초래하는 인슐린의 상대적 또는 절대적 부족으로 특징되는 만성질환을 의미한다. 용어 당뇨병은 모든 종류의 당뇨병을 포함하며, 예를 들어, 제1형 당뇨, 제2형 당뇨 및 유전성 당뇨병을 포함한다. 제1형 당뇨는 인슐린 의존성 당뇨병으로서, β -세포의 파괴에 의해 주로 초래된다. 제2형 당뇨는 인슐린 비의존성 당뇨병으로서, 식사 후 불충분한 인슐린 분비에 의해 초래되거나 또는 인슐린 내성에 의해 초래된다.
- [0043] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 제2형 당뇨, 보다 바람직하게는 인슐린 내성에 의한 제2형 당뇨의 예방 또는 치료에 적용된다.

효 과

- [0044] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다.
- [0045] (i) 본 발명은 인돌-3-카비놀 유도체를 유효성분으로 포함하는 비만, 고지혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0046] (ii) 본 발명의 조성물은 십자화과 식물을 이용하여 분리할 수 있으며, 화학적 방법을 통하여도 합성 가능하다.
- [0047] (iii) 십자화과 식물 추출물 또는 인돌-3-카비놀 유도체를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 지방세포

분화의 억제, 체지방량의 감소, 내장 지방량의 감소, 총콜레스테롤 농도의 감소, 혈장 중성지방 및 간조직 중성지방의 감소, 공복시 혈당 감소 및 혈중 인슐린 농도의 감소를 초래하여, 궁극적으로 비만, 고지혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방 또는 치료 활성을 나타낸다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0048] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0049] **실시예**

[0050] **실시예 1: 마우스 지방세포주(3T3-L1)를 이용한 인돌-3-카비놀의 지방세포분화 억제효능**

[0051] **세포배양 및 오일 레드 O 염색법(oil red O staining)**

[0052] 인돌-3-카비놀(Sigma, USA)이 지방세포의 분화 및 성장에 미치는 영향을 평가하기 위해 마우스지방세포주(3T3-L1, ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 사용하였다. 지방전구세포인 3T3-L1 세포를 12-웰 플레이트에 분주하고 1% 페니실린-스트렙토마이신, 1% 비 필수 아미노산, 10% 우태아 혈청(FBS, fatal bovine serum)이 첨가된 DMEM(Dulbecco-modified Eagle medium) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 컨플루언트(confluent)한 상태로 자랄 때 까지 배양시켰다. 컨플루언트한 상태로 자란 3T3-L1 세포를 MDI(0.5 mM 이소부틸-메틸산틴(isobutyl-methylxanthine), 1 μM 덱사메타손(dexamethason) 및 1 μg/ml 인슐린)이 첨가된 배양액에서 이틀간 배양하여 분화된 지방세포(differentiation adipocyte)로 만든 후, 1 μg/ml 인슐린을 포함하는 DMEM 배양액에서 이틀간 더 배양시키면서 성숙한 지방세포(mature adipocyte)로 분화시켰다. 그 후에는 이를 간격으로 DMEM 배양액을 교체하면서 10일간 더 배양하여 완전히 분화된 지방세포를 형성시켰다.

[0053] 3T3-L1세포에 MDI를 첨가하여 분화시키는 첫 날부터 이를 간격으로 인돌-3-카비놀을 0.1, 1, 10, 50 및 100 μM 농도로 배양액에 처리하였다. 인돌-3-카비놀은 DMSO에 녹여서 사용하였으며, DMSO만 첨가한 음성대조군(negative control)을 실험에 포함시켰다. 총 14일간 배양하여 분화가 완성된 시점에 배양액을 제거하고 분화된 지방세포에 함유된 지방구를 염색하였다. 이를 위해 PBS(phosphate buffered saline)로 세포를 2회 세척한 후 10% BNF(Buffered Neutral Formalin)로 세포를 1시간 고정하고 다시 PBS로 1회 세척한 후, 지방을 특이적으로 붉게 염색시키는 오일 레드 O 염색약 1 ml를 12-웰 플레이트에 가하여 1시간 동안 지방구를 염색하고 증류수로 2회 세척하였다.

[0054] 분화된 3T3-L1 세포에 함유된 중성지방농도를 측정하기 위해 염색된 지방구를 1 ml의 이소부탄올에 녹인 후, 600 nm에서 O.D 값을 측정하였다.

[0055] **인돌-3-카비놀의 지방세포분화 억제능**

[0056] 도 1의 패널 A에서 제시된 바와 같이 인돌-3-카비놀을 3T3-L1 세포에 처리한 결과, 농도 의존적으로 지방전구세포의 분화를 유의하게 감소시켰다. 오일 레드 O 로 염색된 세포내 지방의 양을 분광광도법(spectrophotometry)에 의해 정량한 결과, 역시 농도 의존적으로 O.D 값이 감소하였다(도 1, 패널 B).

[0057] **실시예 2: 마우스를 이용한 인돌-3-카비놀의 체중 및 내장지방 감소효능**

[0058] **실험식이 제조 및 실험동물의 사육**

[0059] 본 실험에서 사용한 비만유도식은 고지방식이(high fat diet, HFD: 40% 지방 칼로리, 17 g 라아드 + 3% 옥수수 오일/ 100 g 다이어트)이며, 인돌-3-카비놀이 포함된 식이는 HFD와 조성이 동일하되 인돌-3-카비놀이 0.1% 수준으로 포함되었다. 정상식이(ND)는 AIN-76 rodent 다이어트(American Institute of Nutrition, Report of

the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. J. Nutr. 107: 1340-1348, 1977) 조성에 준하여 조제하였다(표 2).

표 2

[0060] 실험식이조성표

성분	정상식이 (g/kg diet)	대조식이 (g/kg diet)	인돌-3-카비놀식이 (g/kg diet)
카제인	200	200	200
DL-메티오닌	3	3	3
옥수수 전분	149.99	110.96	109.96
수크로오스	500	370	370
셀룰로오스	50	50	50
옥수수유	50	30	30
라아드	-	170	170
비타민 복합물	10	12	12
미네랄 복합물	35	42	42
콜린 비타르테이트	2	2	2
콜레스테롤	-	10	10
tert-부티하이드로퀴논	0.01	0.04	0.04
인돌-3-카비놀	-	-	1.00
총합(g)	1,000	1,000	1,000
지방(% 칼로리)	11.5	39.0	39.0
총 열량, kJ/kg diet	16,439	19,315	19,315

[0061] 5주령의 수컷 C57BL/6J 마우스(오리엔트, 한국)를 고형사료로 1 주일 간 실험실환경에 적응시킨 후, 난피법에 따라 고지방식이대조군과 실험군으로 임의 배치하여, 총 10주간 사육하였다. 식이는 매일 오전 10-11시 사이에 물과 함께 공급하였으며, 식이 섭취량은 매일, 그리고 체중은 3일에 한 번씩 측정하였다. 사료섭취에 따른 갑작스런 체중변화를 막기 위해 사료통을 제거하고 2시간 후에 체중을 측정하였으며, 식이효율은 실험식이 공급일로부터 희생일까지를 총 실험기간으로 하여, 실험기간 동안의 누적체중증가량을 총 식이섭취량으로 나누어 산출하였다. 실험동물을 12시간 이상 금식시킨 후, 디에틸에테르로 마취한 상태에서 혈액, 간 및 내장지방조직(부고환지방, 신장주변지방, 장간막지방 및 후복강지방)을 채취하여 0.1 M 인산완충용액(pH 7.4)으로 세척한 후, 무게를 측정하였다. 복부대동맥으로부터 채혈한 혈액은 1000 x g에서 15분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다.

[0062] **체중 및 내장지방 무게**

[0063] 실험식이를 10주간 섭취시킨 후 최종체중 및 10주간의 체중증가량을 살펴보면, 고지방식이대조군 (HFD)에 비해 실험물질인 인돌-3-카비놀을 섭취시킨 군에서 최종체중이 36%, 그리고 누적체중증가량이 59% 유의하게 감소하였다(도 2).

[0064] 실험식이를 10주간 섭취시킨 후 체중 대 부고환지방, 신장주변지방, 장간막지방 및 후복강지방 무게를 측정한 결과, 대조군(HFD)에 비해 인돌-3-카비놀 섭취군에서 단위체중으로 환산한 부고환지방무게가 44%, 신장주변지방무게가 74%, 장간막지방무게가 57%, 후복강지방무게가 46%, 그리고 총내장지방무게가 49% 유의하게 감소하였다 ($P < 0.001$). 따라서 인돌-3-카비놀은 매우 탁월한 체중감소 및 내장지방량 감소효과가 있음이 확인되었다(도 3).

[0065] **실시예 3: 인돌-3-카비놀의 비만성 고지혈증, 지방간과 2형 당뇨의 예방 및 치료 효능**

[0066] 혈장 총콜레스테롤, 중성지방 및 포도당농도는 상업용 측정키트(Bio Clinical system)를 이용하여 각각 2회 반복 측정하였고, 인슐린농도는 마우스 인슐린 키트(Shibayaki, Japan)를 이용하여 ELISA로 측정하였다. 간조직

의 지질성분을 Folch 등의 방법에 준하여 추출하였다. 0.25 g의 간조직에 1 mL의 증류수를 가한 후 polytron 균질기(IKA-WERKE GmbH & Co., Ultra-Turrax, Staufen, Germany)를 사용하여 균질화시켰다. 균질액에 클로로포름:메탄올 용액(2:1, v/v) 5 mL을 가하여 잘 혼합한 후, 1000 x g에서 10분간 원심분리하여 하층액을 분리하였고, 상층액에 다시 클로로포름:메탄올 용액(2: 1, v/v) 2 mL을 첨가한 후, 동일 과정을 반복하여 간의 지질성분을 완전히 분리하였다. 이렇게 얻은 하층액에 클로로포름:메탄올:0.05% CaCl₂(3:48:47, v/v/v) 용액 3 mL을 가하여 1분간 혼합한 후 1000 x g에서 10분간 원심분리하였고, 최종 하층액을 취하여 질소가스로 완전히 건조시킨 후, 건조된 지질을 1 mL의 메탄올에 용해하여 지질성분 분석에 사용하였다. 간조직 지질추출액의 중성지방 농도는 혈장의 분석을 위해 사용된 것과 동일한 상업용 지질분석 키트(Bio Clinical system)를 사용하여 측정하였다.

[0067] 표 2에 제시된 실험식이를 10주간 섭취시킨 마우스의 혈장 지질농도를 살펴보면, 인돌-3-카비놀 섭취군에서 고지방식이대조군(HFD)에 비해 중성지방농도가 72%, 총콜레스테롤농도가 54%, LDL+VLDL 콜레스테롤농도가 63%, 유리지방산농도가 48% 유의하게 감소하였다(표 3).

[0068] 식이성비만 동물모델 또는 인체비만에서는 혈중 인슐린 농도가 증가하면서 동시에 공복시 혈당이 증가되는 2형 당뇨병상이 수반되는 것은 잘 알려진 사실이다. 아울러 영양소 또는 대사물질 공급과잉에 의해 발생하는 염증 반응에 대하여 최근 ‘metaflammation’이라는 용어가 등장하고, 비만을 ‘만성적으로 진행되는 저수준의 염증 반응(chronic and low-level inflammation)’으로 해석하는 등, 비만과 면역체계와의 상관관계에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다. 즉, 다양한 비만합병증들(2형 당뇨, 인슐린저항성, 동맥경화, 암 및 천식 등)은 비만이 진행되는 과정에서 면역체계와의 상호작용에 의해 발생하는 것이라는 새로운 시각이 제기되고 있다. 그 예로, 선천성 면역반응에 관여하는 TLR4(toll-like receptor 4)의 경우 식이성지방(특히, 포화지방산)을 리간드로 사용하여 염증반응 및 인슐린저항성 경로에서 중요한 요소로 작용하는 한편, 중추신경계에서는 식욕조절에도 관여하는 것으로 제시된다. 따라서 혈액 및 조직의 유리지방산 농도는 비만으로 인한 인슐린저항성 및 대사질환 발병의 주요한 지표로 최근 인식되고 있다.

[0069] 본 실험에서는 고지방식이를 섭취한 마우스를 대상으로 10주간 인돌-3-카비놀을 섭취시킨 결과, 고지방식이대조군에 비해 공복시 혈당이 22% 저하되었을 뿐 아니라 혈중 인슐린농도 또한 36% 유의하게 감소되었고, 인슐린저항성지표(insulin resistance index, IRI) 또한 50% 현저히 감소하였다(표 3). 따라서 인돌-3-카비놀은 2형 당뇨 또는 인슐린저항성을 개선하는 효과가 있으며, 이와 밀접하게 연관된 대사성 염증반응을 개선하는 효과 또한 기대된다.

표 3

[0070] 인돌-3-카비놀을 섭취시킨 마우스 혈액의 비만 관련 생화학지표

	정상식이군 (ND)	고지방식이대조군 (HFD)	인돌-3-카비놀군
중성지방(mmol/L)	0.60 ± 0.09	1.41 ± 0.12	0.39 ± 0.09*
총콜레스테롤(mmol/L)	3.07 ± 0.09	6.20 ± 0.54	2.84 ± 0.19*
HDL 콜레스테롤(mmol/L)	1.33 ± 0.09	2.33 ± 0.27	1.42 ± 0.08*
LDL+VLDL 콜레스테롤(mmol/L)	1.74 ± 0.06	3.87 ± 0.57	1.42 ± 0.22*
유리지방산(uEq/L)	357 ± 26	534 ± 8*	280 ± 40*
포도당(mmol/L)	6.16 ± 0.95	8.49 ± 0.53	6.63 ± 0.31*
인슐린(ng/mL)	0.51 ± 0.06	0.76 ± 0.10	0.48 ± 0.06*
IRI ^a	0.54 ± 0.07	1.10 ± 0.10	0.55 ± 0.08*

[0071] *Significantly different from the value for HFD group by Student's t-test at P < 0.001.

[0072] ^aIRI(Insulin resistance index) = 10⁻³ pmol 인슐린 x mmol 포도당 x L⁻²

[0073] 실험식이를 10주간 섭취시킨 마우스의 체중대 간무게를 살펴보면 인돌-3-카비놀 섭취군에서 고지방식이대조군에 비해 24% 유의하게 감소하였다. 간조직의 지질농도를 살펴보면, 인돌-3-카비놀 섭취군에서 고지방식이대조군에 비해 중성지방농도가 89%, 콜레스테롤농도가 87%, 그리고 유리지방산농도가 65% 유의하게 감소하였다(표 4). 따라서 인돌-3-카비놀은 고지방식으로 유도된 비만에서 나타나는 지방간 현상을 현저히 완화시키고, 간조직에서 진행되는 비만성 염증 및 인슐린저항성을 현저히 개선하는 효과가 있음을 알 수 있다.

표 4

[0074] 인돌-3-카비놀을 섭취시킨 마우스 간조직의 비만 관련 생화학지표

	정상식이군 (ND)	고지방식이대조군 (HFD)	인돌-3-카비놀군
간무게(g/100 g body wt)	3.6 ± 0.1	5.5 ± 0.3	4.2 ± 0.3*
중성지방(μmol/g)	20.4 ± 0.30	35.1 ± 0.32	3.78 ± 0.20*
콜레스테롤(μmol/g)	21.6 ± 0.58	74.8 ± 0.68	9.4 ± 0.10*
유리지방산(μEq/g)	8.56 ± 0.35	24.3 ± 0.22*	8.47 ± 0.13*

[0075] *Significantly different from the value for HFD group by Student's t-test at $P < 0.001$.

[0076] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0077] 도 1은 3T3-L1 세포에서 인돌-3-카비놀의 지방분화 억제 효능을 나타낸 도면이다.

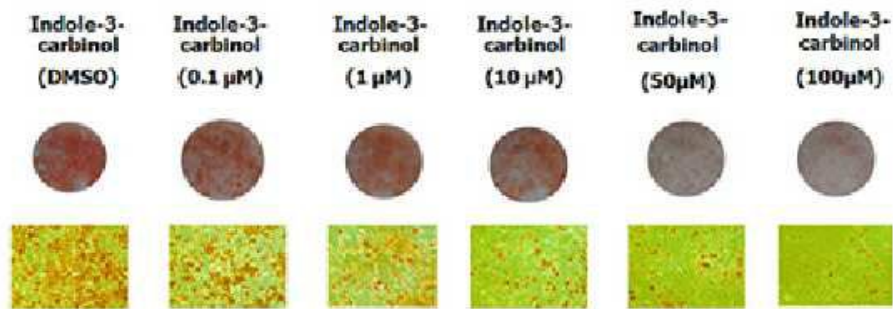
[0078] 도 2는 실험식이를 섭취한 마우스의 체중 및 체중 증가량을 나타낸 도면이다. 파란색 실선은 정상식이군(ND), 빨간색 실선은 고지방식이 대조군(HFD) 및 하늘색 실선은 인돌-3-카비놀 투여군을 나타낸다.

[0079] 도 3은 실험식이를 섭취한 마우스의 체중 대 부고환지방, 신장주변지방, 장간막지방, 후복강지방 및 총내장지방량 무게를 나타낸 도면이다. 파란색 막대그래프는 정상식이군(ND), 빨간색 막대그래프는 고지방식이 대조군(HFD) 및 하늘색 막대그래프는 인돌-3-카비놀 투여군을 나타낸다.

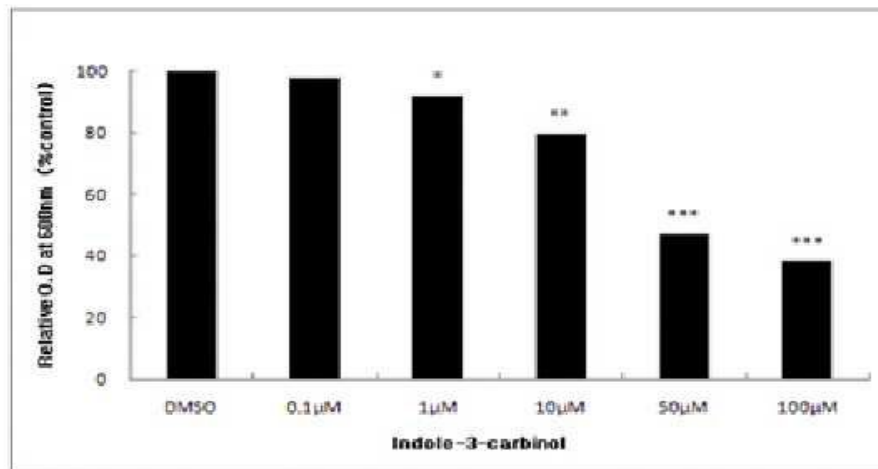
도면

도면1

A

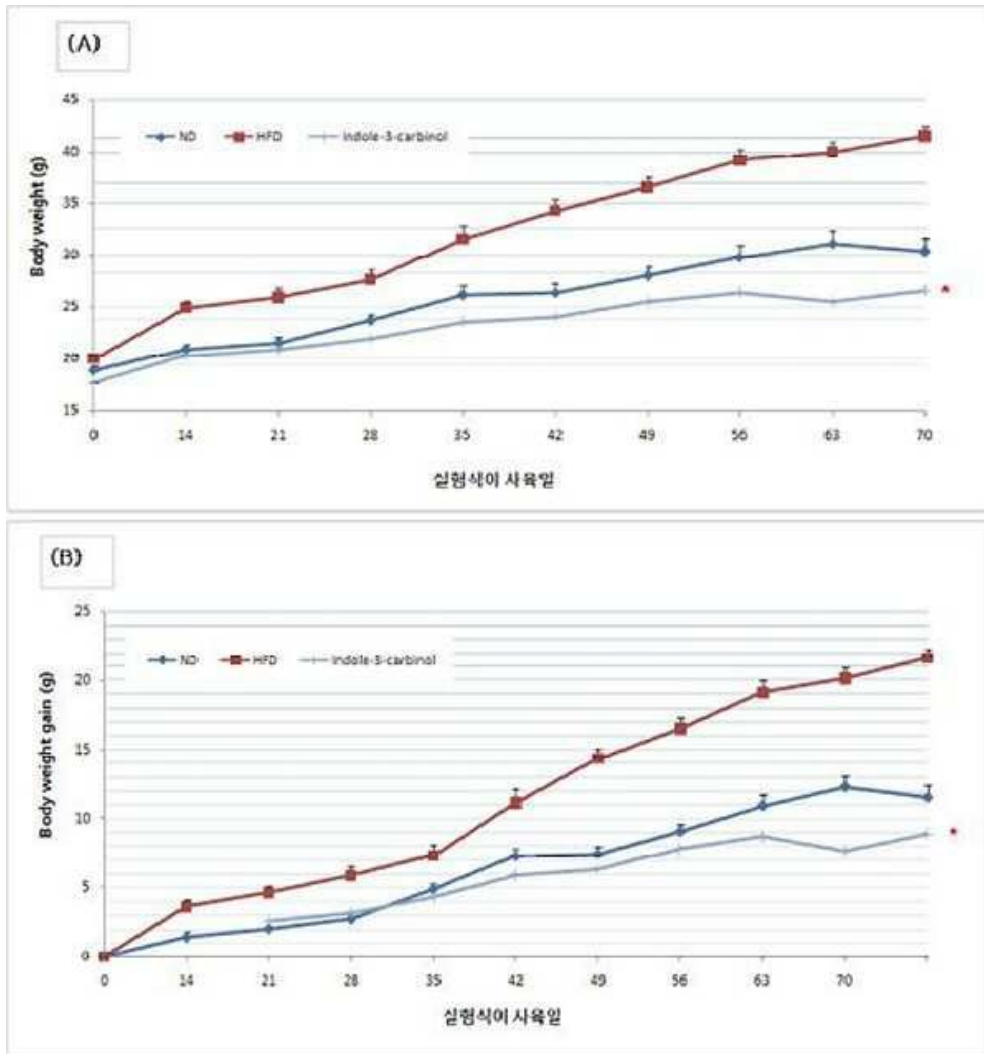


B



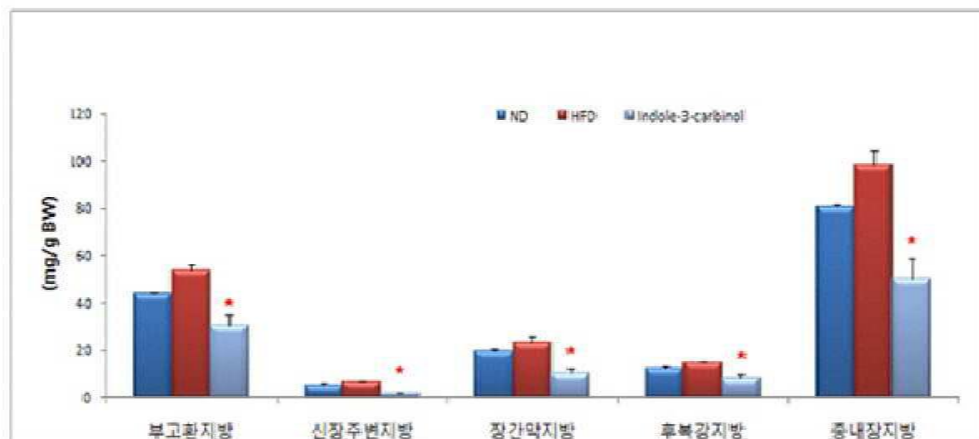
**** Significant difference from the value for DMSO-treated control cells at * $P < 0.05$, * $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$, respectively by Student's *t*-test.

도면2



*Significantly different from the value for HFD mouse at $P < 0.001$ by Student's *t*-test.

도면3



*Significantly different from the value for HFD mouse at $P < 0.001$ by Student's *t*-test.