(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년09월30일
(11) 등록번호 10-1069502
(24) 등록일자 2011년09월26일

(51) Int. Cl.
A61K 31/35 (2006.01) *A61K 31/14* (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-0106362
(22) 출원일자 2006년10월31일
심사청구일자 2008년01월15일
(65) 공개번호 10-2008-0038870
(43) 공개일자 2008년05월07일
(56) 선행기술조사문헌
논문1:Nutritional Sciences*
EP00511587 A1*
KR1020050067837 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 9 항

(73) 특허권자
(주)아모레퍼시픽
서울특별시 용산구 한강로2가 181
(72) 발명자
박현우
경기 안양시 동안구 비산1동 삼성래미안아파트 131동 1905호
천지영
경기 안양시 동안구 비산2동 롯데낙천대아파트 101동 2002호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤동열

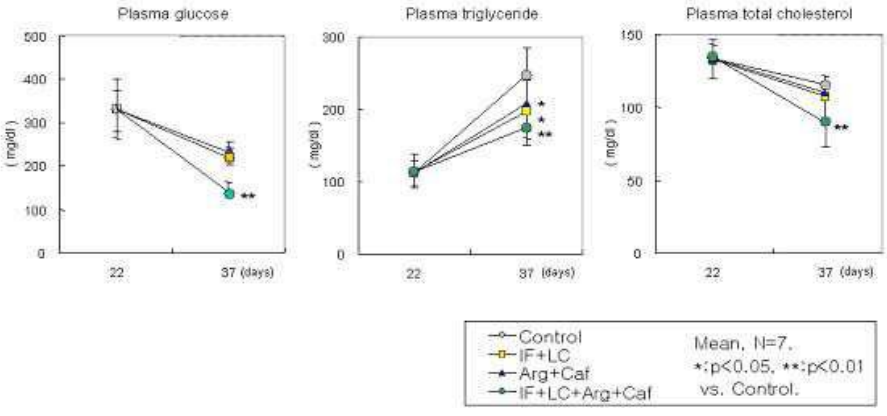
심판번호 **거절결정불복 2010원005504**
심판청구일 **2010년07월19일**
심판관합의체 **심판장** 홍정표, **심판관** 강춘원, **심판관** 김용정

(54) 비만 및 당뇨병 개선용 경구용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 비만 및 당뇨의 치료 및 증상의 개선에 관한 경구용 조성물로서, 보다 상세하게는 이소플라본을 함유하는 대두 추출물, L-카르니틴(L-carnitine), 카페인(caffeine) 및 아르기닌(arginine)을 유효성분으로 함유하는 비만 개선용 경구용 조성물로서, 상기 조성물은 당뇨병 개선용임을 특징으로 하는 비만 및 당뇨병 개선용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 이소플라본을 함유하는 대두추출물과 카르니틴, 카페인 및 아르기닌을 혼합물의 형태로 함유하여 지방분해 및 지방연소 촉진효과와 더불어 아디포넥틴 및 Glut4 유전자 발현을 증가시켜 인슐린 감수성을 회복시킴으로써 혈당 상승을 억제하여 항비만·항당뇨 효과를 나타낸다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

신의석

경기 광주시 실촌읍 건업리 488번지

김 유

경기 성남시 분당구 금곡동 청솔마을 한라아파트 303동 802호

이태룡

경기 용인시 기흥구 동백동 동보아파트 1201동 1602호

이상준

경기 성남시 분당구 정자동 한솔마을 LG아파트 205동702호

특허청구의 범위

청구항 1

이소플라본, L-카르니틴, 카페인 및 아르기닌을 유효성분으로 함유하는 제2형 당뇨 예방 및 개선용 경구 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 이소플라본은 이소플라본을 함유한 대두 추출물임을 특징으로 하는 경구 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 대두 추출물은 조성물 총 중량에 대하여 0.001~30중량%임을 특징으로 하는 경구 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물 총 중량에 대하여 이소플라본은 0.0001~10중량%, L-카르니틴은 0.001~40중량%를 함유시킨 것을 특징으로 하는 경구 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물 총 중량에 대하여 카페인은 0.0001~10중량%, 아르기닌은 0.001~40중량%를 함유시킨 것을 특징으로 하는 경구 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 유효성분은 지방분해 및 지방연소 촉진에 따른 인슐린 저항성 유발을 보완하여, 인슐린 감수성을 회복시킴으로써 혈당 상승을 억제하는 것을 특징으로 하는 경구 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 조성물은 Glu4와 아디포넥틴 유전자의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 경구 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 조성물은 건강식품용임을 특징으로 하는 경구 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 조성물의 제형이 정제, 캡슐제, 연질캡슐제, 환제, 과립제, 드링크제, 다이어트바, 쵸콜렛, 캬라멜 제형 또는 과자류임을 특징으로 하는 경구 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

[0007] 본 발명은 비만 및 당뇨병 개선용 경구용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 이소플라본을 함유하는 대두 추출물, L-카르니틴(L-carnitine), 카페인(caffeine) 및 아르기닌(arginine)을 유효성분으로 함유하는 비만 개선용 경구용 조성물로서, 상기 조성물은 당뇨병 개선용임을 특징으로 하는 비만 및 당뇨병 개선용 경구용 조성물에 관한 것이다.

[0008] 인체 내에는 약 200억 개나 되는 지방세포가 존재하고 있으며, 이는 포유류의 생체 내에서 에너지를 축적하거나 방출하는 역할을 담당하고 있다. 이 세포 내에서는 에너지의 축적과 방출에 대한 복잡한 조절 원리가 존재하며, 에너지의 수요보다 공급이 월등이 많을 경우에는 지방세포 내에 중성지방으로 저장되었다가 에너지가 고갈되었을 때 다시 유리지방산과 포도당으로 분해되어 사용된다. 비만은 이 과정의 불균형으로 인하여 과도한 에너지의 축적이 일어났을 때 발생하는 것으로 지방세포의 크기가 커지거나 그 수가 증가하는 현상에 기인하는 것으로 보고 있다.

[0009] 현대인의 약 30~40% 정도가 가지고 있는 비만은 고혈압, 관상동맥질환, 제 2형 당뇨병 및 여러 형태의 암을 유발할 수 있는 강한 위험 요소로서 알려져 있다. 특히 비만과 당뇨는 유병 기작에 있어서 매우 밀접한 관련을 가지고 있다.

[0010] 비만은 일반적으로 체지방이 증가하면 인슐린 감수성이 저하되는 증상을 보이며, 특히 복부지방의 축적은 당불내성(glucose intolerance)과 관련이 있다. 비만은 인슐린 저항성의 여러 원인 중 하나에 해당하며, 고도비만에서 제 2형 당뇨병이 발생하지 않는 경우도 있다. 하지만 제 2형 당뇨병이 발생된 환자에서는 비만과 인슐린 저항성은 밀접한 상관관계가 있어 비만이 심할수록 인슐린 저항성도 심해진다.

[0011] 제 2형 당뇨병에서 이상지질 혈증은 혈당이 조절되면 대체적으로 개선이 되는데, 일부 환자는 개선되지 않는다. 이 같은 경우를 인슐린 저항성 증후군 또는 중심부 비만 증후군(central obesity syndrome)이라고 일컫는다. 인슐린 저항성 증후군의 가장 중요한 특징은 중심부 비만 또는 내장 비만(visceral obesity)이다. 중심부 비만과 내장 비만은 이차적으로 인슐린 저항성을 초래하고, 고인슐린혈증, 고혈압, 내당능 장애(impaired glucose tolerance)를 동반한다.

[0012] 이렇듯 비만에 의한 2차적 당뇨병의 유발은 현재 중요한 이슈로 부각되고 있으며, 이를 동시에 개선하기 위한 목적으로 인슐린 저항성을 감소시킬 수 있는 인슐린 감수성 개선제 즉 치아졸리딘디온(Thiazolidinedione)계 약물과 바이구아나이드(Biguanide)제를 대사증후군이 있는 비만환자에 대해 장기간의 임상시험을 실시하여 그 치료효과를 발표한 비만치료약제로 제니칼(Xenical, Orlistat)과 리덕틸(Reductil, Sibutramine)이 있다. 그러나 이러한 약제들은 지방의 연소 및 분해를 촉진시키기보다는 식욕억제와 지방흡수 억제의 기작에 의한 항비만 효능을 가지고 있어 인슐린 저항성을 해결하기에 필요충분 조건이 되지 못하여 비만과 함께 당뇨병을 완전하게 해결할 수 없을 뿐만 아니라 심각한 부작용들이 보고되고 있어, 아직은 안전성에 대한 명확한 보장이 없는 실정이다. 따라서 종래의 물질과 동등하거나 그 이상의 효능을 나타내면서도 인체에 대해서는 좀 더 안전한 새로운 물질을 개발해야 할 필요성이 대두되고 있다.

[0013] 이에 비만에 의한 당뇨병 유발 원인으로 작용하는 여러 질환들을 고려해볼 때 단순한 체중의 감량보다는 체지방의 감소가 더욱 중요함은 명백하다. 따라서, 섭취된 지방의 축적을 저해하고 연소를 활성화시킬 수 있는 방법의 모색이 바람직하다고 볼 때, 지방산의 베타-산화(beta-oxidation)를 증가시킬 수 있는 방법과 더불어 지방세포에서 분비되는 아디포넥틴(adiponectin)의 발현수준을 유지시키는 것은 항비만·항당뇨 효능의 훌륭한 타겟이 될 수 있다.

[0014] 체지방의 감소를 촉진하기 위한 자사의 비만 관련 선행특허에서 제니스테인(genistein)과 카르니틴(carnitine)

이 지방산 분해경로의 핵심 효소인 카르니틴 팔미토일트랜스퍼라아제-1(CPT-1) 유전자의 발현을 증가시켜 체지방의 연소를 촉진시킨다는 것을 밝힌 바 있으며(출원번호 2003-0018559), 또한 데아닌과 카페인, 제니스테인 및 카르니틴을 단독 또는 혼합물의 형태로 함유하여 우수한 지방 분해효과 및 셀룰라이트의 제거 효과를 나타낸다는 것을 밝힌 바 있다(출원번호 2003-0098859). 그러나, 이러한 조성물이 지방연소 촉진과 더불어 아디포넥틴의 발현수준을 증가시켜 비만에 의한 당뇨를 개선할 수 있는지에 대해서는 알려진 바가 없다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

[0015] 이에 본 발명자들은 상술한 선행기술의 문제점을 해결하기 위해 수많은 연구와 실험을 거듭한 결과 이뇨작용이나 식욕억제 효능이 있는 소재를 이용하지 않고 지방을 분해하고 연소를 촉진하는 소재를 사용하여 과대 형성되어 있는 체지방, 특히 복부지방을 분해 연소하여 제거함으로써 비만을 개선함과 동시에 인슐린 감수성을 조절하는 아디포넥틴의 발현을 증가시켜 혈당을 낮춤으로써 당뇨병을 치료할 수 있는 이상적인 항비만·항당뇨 조성물을 개발하게 되었다.

[0016] 따라서, 본 발명의 목적은 지방세포 내에 축적되어 있는 지방의 분해 및 연소과정을 촉진시킴으로써 체지방을 감소시켜 비만을 개선시키고, 동시에 인슐린 저항성을 극복할 수 있어 당뇨병의 치료 및 개선에 효과적인 비만 및 당뇨 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

[0017] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 이소플라본 및 L-카르니틴을 유효성분으로 함유하는 비만 개선용 경구용 조성물에 있어서, 상기 조성물은 당뇨병 개선용임을 특징으로 하는 비만 및 당뇨병 개선용 경구용 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 상기 조성물은 카페인 및 아르기닌을 유효성분으로 더 함유하는 비만 및 당뇨병 개선용 경구용 조성물을 제공한다.

[0019] 이하 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

[0020] 본 발명에서 사용된 조성물은 체중 및 체지방의 감소뿐 아니라 비만으로 인해 유발될 수 있는 대표적 대사증후군인 당뇨 증상을 개선함으로써 비만과 당뇨병을 예방, 치료할 수 있는 효능을 가진다는 것을 보여준다.

[0021] 이소플라본은 대두에 많이 함유 되어 있는 성분으로 여성호르몬과 유사한 식물성 호르몬으로 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 보고된 바 있으며, 최근 지방세포에서의 지방대사조절, 혈중 콜레스테롤의 감소 등 다양한 연구 결과들이 보고된 바 있다.

[0022] 카르니틴은 정상인의 간이나 신장에서 합성되고 적색류의 고기에 많이 함유되어 있는 성분으로서 지방을 산화하여 에너지를 생성하는데 중요한 성분으로 알려져 있다. L-카르니틴이 결핍되면 미토콘드리아 내의 지방산 농도가 감소하며 그로 인해 에너지 생산도 감소한다. 또한 L-카르니틴을 기질로 사용하는 CPT-1은 지방산 산화작용에 관여하는 여러 효소가운데 지방산 산화의 속도 제한 효소로 작용하고 있음이 밝혀졌다(Eaton, Prog Lipid Res 41(3): 197-269, 2002).

[0023] 카페인(caffenine)은 종래에 지방분해 촉진물질의 양성 대조군으로 알려져 있는 메틸 잔틴계(methylxanthine) 물질로서, 지방세포 내에서 지방분해와 밀접한 관련이 있는 효소인 포스포디에스테라제(phosphodiesterase)의 억제를 통한 세포 내 cAMP의 증가로 지방분해 효능을 나타내고 있다(Astrup, A. et al., *Am J. Clin. Nutr.* 51:759, 1990).

[0024] 아르기닌은 자연계에 널리 존재하며, 특히 어류 등의 정자 단백질 내에 비교적 많이 함유되어 있는 천연형 L-아미노산이다. 아르기닌의 섭취는 인체의 지방조직의 분해를 직접적으로 가속화시키는 글루카곤의 분비를 촉진한다는 것이 보고된 바 있다(Kalkhoff RK, et al., *N Engl J Med* 289: 465-467). 실제 생리학적으로나 물리학적으로도 혈중 글루카곤의 농도가 높으면 혈중 내에 유리지방산과 글리세롤의 함량이 증가된다는 것이 밝혀진 바 있다.

[0025] 본 발명에서 사용되는 유효 성분들의 추출방법은 본 발명 기술분야에 통상적으로 알려져 있는 방법을 적의 선정 및 응용하여 이용할 수 있다.

[0026] 인체의 약 40%를 차지하고 있는 골격근은 탄수화물 대사에 의존하고 있는 주요 조직이며 비만과 제 2형 당뇨에서의 인슐린 저항성을 형성하는 주요 부위이기도 하다(DeFronzo, 1992). 제 2형 당뇨병은 골격근에서의 인슐린 저항성과 당 대사 이상을 특징으로 하는 당뇨병으로서 혈당 유지의 방해는 물론, 혈액 내 순환하는 유리지방산의 증가(Reaven 등, 1988), 몸체에서의 지방 산화의 감소(Kelly, 등, 1999), 골격근을 비롯한 여러 조직에서의 지질 침착의 증가(Pan, 등, 1997) 등으로 인해 지방대사의 손상까지 초래하게 된다.

[0027] 골격근과 지방세포에는 Glut4라는 포도당 운반체가 존재하며, 인슐린에 의해 조절되는 포도당 운반체(Glut4)가 세포표면으로의 이동이 촉진됨으로 인해 포도당이 세포 내로 유입된다. 인슐린은 Glut4의 세포막 쪽으로의 이동을 촉진한다.

[0028] 제 2형 당뇨에서는 이러한 인슐린에 의한 Glut4의 이동(translocation)에 결함이 발생되며, 이것이 제 2형 당뇨의 특징이기도 하다. 인슐린 이외의 다른 자극들에 의해서도 Glut4의 이동을 유도할 수 있는데 이러한 자극들로는 운동(수축)(Lundet 등, 1995), 저산소증(Wojtaszewski 등, 1998), 그리고 다양한 화학물질(Tsakiridis 등, 1995) 등이 있다.

[0029] 아디포넥틴은 지방세포에서 분비되는 대표적인 아디포킨(adipokine)중 하나로서, 항비만작용, 항당뇨작용, 항동맥경화작용 및 활성산소생성의 억제작용 등이 보고되어 있다. 아디포넥틴은 인슐린 감수성을 증가시켜 혈당을 낮춤으로써 당뇨병을 예방하는 역할을 수행할 뿐만 아니라, 간과 근육에 작용하여 AMP 키나아제의 활성을 높임으로써 지방산 산화를 촉진하고 지방합성을 저해하는 항비만 효능도 보인다.

[0030] 아디포넥틴은 지방세포가 분화되면서 발현이 증가하는 단백질로서 PPAR-g와 C/EBP-a, SREBP1c, liver receptor homoog-1, Krupperl-like factor 7(KLF7) 등의 전사인자들에 의해서 조절된다. 특히, KLF7은 징크 핑거 단백질(zinc finger protein)로서 제 2형 당뇨병과 매우 밀접한 관련이 있다고 보고된 단백질이다. KLF7은 거의 모든 조직에서 발현되는 것으로서, 지방세포의 분화를 억제하고 아디포넥틴 등의 분비를 억제하며, 췌장 세포에서 인슐린 분비를 억제하여 당뇨병을 유발하는 것으로 알려져 있다

[0031] 본 발명의 조성물은 경구용 의약품 및 식품의 형태로 적용되어 체지방 및 피하지방을 분해함과 동시에 인슐린 감수성에 관여하는 주요 바이오 마커(bio marker)인 Glut4와 아디포넥틴의 발현을 회복시켜 혈당을 낮추는 효능이 있다. 이는 본 발명의 조성물이 지방세포에서 각각 다른 메커니즘을 통하여 지방분해, 지방연소 촉진, 그리고 인슐린의 저항성 개선을 상승시키고 활발하게 지속되도록 도와주는 효과가 있기 때문이다.

[0032] 본 발명에서는 이소플라본은 이소플라본을 함유한 대두 추출물임을 특징으로 하며, 상기 대두 추출물은 조성물 총 중량에 대하여 0.001~30 중량%임을 특징으로 한다.

[0033] 또한, 본 발명은 조성물 총 중량에 대하여 이소플라본은 0.0001~10 중량%, L-카르니틴을 0.001~40 중량%를 함유시킨 것을 특징으로 한다.

[0034] 또한, 본 발명은 조성물 총 중량에 대하여 카페인은 0.0001~10 중량%, 아르기닌은 0.001~40 중량%로 함유시킨 것을 특징으로 한다.

[0035] 이 성분들의 조성물 중량비 설정은 제품화 되었을 때 인체의 효능에 상승효과를 가져올 수 있을 뿐 아니라 안전성 측면에서도 각 성분의 특징을 반영하여 설정된 것이라 할 수 있다. 또한 제품의 제형에 맞는 주성분의 성형조건도 고려하여 최대 중량의 범위를 제한하였다.

[0036] 따라서, 본 발명에서는 이소플라본, L-카르니틴, 카페인 및 아르기닌을 함유함으로써 지방세포 내 중성지방 분해를 촉진하고 인슐린의 저항성을 극복하는 비만 및 당뇨병 개선용 경구용 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명의 조성물은 상기한 성분들 이외에 당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 적의하게 선정한 후, 정제, 캡슐제, 연질캡슐제, 환제, 과립제, 드링크제, 다이어트바, 쵸콜렛, 카라멜 제형 및 과자류 등으로 제형화하여 건강식품, 의약품 등으로 사용할 수 있다.

[0038] 이하, 시험예를 들어 본 발명을 상세히 설명하지만 본 발명이 이들 예로만 한정되는 것은 아니다. 이들 시험예

는 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 시험예에 국한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명한 것이다.

[0039] [참고예 1]

[0040] 수컷 KK 쥐의 부고환 지방조직(epididymal adipose tissue)을 분리한 후 가위로 잘게 자르고, 0.1% 콜라게나아제(in DMEM without phenol red)를 가한 후 37℃에서 2시간 동안 배양한 다음 여과하여 지방세포(adipocyte)를 얻었다.

[0041] [시험예 1] 수컷 KK 쥐에서 이소플라본, L-카르니틴, 카페인 및 아르기닌 복합물 처리에 의한 체중 감소 효과

[0042] 본 발명의 조성물이 고지방식으로 유도된 비만동물의 지질대사에 미치는 영향을 조사하고자 수컷 KK 쥐를 모델로 선정하여 실험하였다. 이소플라본을 함유한 대두 추출물, 카르니틴, 아르기닌 및 카페인(이하 ICAC) 복합물이 어떻게 영향을 미치는지 알아보기 위하여 6주령 된 쥐를 일주일간 적응시키고, 3주간 고열량식이를 투여한 후 실험군 당 12마리씩 완전 임의 배치하였다. 실험군은 (1)정상지방식이군, (2)정상식이 + 이소플라본 20mg + L-카르니틴 150mg, (3)정상식이 + 아르기닌 600mg + 카페인 25mg, (4)정상식이 + 이소플라본 20mg + L-카르니틴 150mg + 아르기닌 600mg + 카페인 25mg 첨가 네 군으로 하며, 실험식이를 2주간 급여하였다. 이 때 실험식이는 표 1과 같이 고열량 식이는 총 열량이 4.7 kcal/g으로, 정상식이는 총열량이 3.1 kcal/g이 되도록 조제하였다.

표 1

[0043]

성분(Ingredient)	고열량 식이 (High calorie diet)	정상식이 (Normal diet)
카세인(Casein)	18	18
옥수수 녹말 (Corn starch)	53.4	53.4
옥수수 기름 (Corn Oil)	20.0	2.5
섬유소 분말 (Cellulose powder)	2.5	20.0
무기질 혼합물 (Mineral mixture)	5	5
비타민 혼합물 (Vitamin mixture)	1	1
주석산수소콜린 (Choline bitartrate)	0.1	0.1

[0044] 1) Mineral mixture : AIN-93G mineral mixture(g/kg mix)

[0045] 2) Vitamin mixture : AIN-93G vitamin mixture(g/kg mix)

[0046] 실험식이 급여기간 중 주당 3회씩 식이 섭취량과 체중을 측정하였다. 실험식이 급여 기간 종료 후 최종적으로 체중을 측정하였고, 실험식이에 따른 체중변화의 결과를 표 2에 나타내었다.

표 2

[0047]

	실험 시작 전 체중(g)	실험 종료 후 체중(g)	체중 변화량(%)
정상식이군(n=12)	33.6±0.54	37.9±0.62	12.8
정상식이군 +이소플라본 +L-카르니틴(n=12)	33.8±0.35	35.6±0.41	5.3*
정상식이군 +L-아르기닌+카페인(n=12)	34.0±0.48	35.9±0.26	5.6*
정상식이군+이소플라본 +L-카르니틴 +L-아르기닌+카페인(n=12)	33.8±0.34	32.8±0.42	-3.0*

[0048] * $p<0.05$

[0049] 표 2에 나타난 바와 같이 실험시작 전에는 각군별 체중의 차이는 없었다. 그러나 실험기간동안 이소플라본 + L-카르니틴 투여군과 L-아르기닌 + 카페인 투여군은 정상식이군에 비해 체중 증가율이 각각 5.3%, 5.6%로 정상식이군의 12.8% 보다 유의적으로 적게 증가되었다. 그리고 이소플라본 + L-카르니틴 + L-아르기닌 + 카페인 투여군은 -3.0%로 정상식이군에 비해 체중 증가율이 유의적으로 훨씬 적게 나타나 복합물의 성분간의 상승효과가 있음을 확인할 수 있었다. 식이섭취량은 군간의 유의적인 차이는 없었다.

[0050] [시험예 2] 수컷 KK 쥐에서 이소플라본, L-카르니틴, 카페인 및 아르기닌 복합물 처리에 의한 혈액 생화학 성분 효능 평가

[0051] 본 발명의 조성물이 고지방식으로 유도된 비만 동물의 지질대사에 미치는 영향을 조사하고자 수컷 KK 쥐를 모델로 선정하여 시험예 1과 동일한 농도로 정상식이군, 정상식이 + 이소플라본 + L-카르니틴, 정상식이 + L-아르기닌+카페인, 정상식이군 + 이소플라본 + L-카르니틴 + L-아르기닌 + 카페인 첨가의 4개 군에 대해 2주간 섭취 시켰다. 식이가 끝난 후 희생하여 안와채혈법으로 2ml의 혈액을 채취하였다. 10000rpm에서 10분간 원심분리한 뒤 상층액(혈청)을 분리하여 자동혈액 분석기(H1 system, Technicon, USA)를 사용하여 혈청 내 포도당(glucose), 트리글리세라이드(triglyceride) 및 전체 콜레스테롤(total cholesterol) 양을 분석하였다. 포도당(glucose)와 전체 콜레스테롤(total cholesterol)에서는 이소플라본 + L-카르니틴 투여군과 L-아르기닌 + 카페인 투여군은 정상군에 비해 유의적인 감소가 나타나지 않았으나, 이소플라본 + L-카르니틴 + L-아르기닌 + 카페인 투여군은 유의적으로 감소하였다. 트리글리세라이드(Triglyceride)에서는 이소플라본 + L-카르니틴 투여군과 L-아르기닌 + 카페인 투여군은 정상군에 비해 유의적으로 감소하였고, 이소플라본 + L-카르니틴 + L-아르기닌 + 카페인 투여군은 34% 감소하여 더욱 유의적인 효과를 보였으며, 이는 도 1에 나타내었다. 도 1에서 IF는 이소플라본, LC는 L-카르니틴, Arg는 아르기닌, Caf는 카페인을 나타낸다.

[0052] [시험예 3] 수컷 KK 쥐에서 이소플라본, L-카르니틴, 카페인, 아르기닌 복합물 처리에 의한 지방 조직 평가

[0053] 본 발명의 조성물이 고지방식으로 유도된 비만 동물의 지질대사에 미치는 영향을 조사하고자 수컷 KK 쥐를 모델로 선정하여 실험예 1과 동일한 농도로 정상식이군, 정상식이 + 이소플라본 + L-카르니틴, 정상식이 + L-아르기닌 + 카페인, 정상식이군 + 이소플라본 + L-카르니틴 + L-아르기닌 + 카페인 첨가의 4개 군에 대해 2주간 섭취 시켰다. 식이가 끝난 후 희생하여 간, 피하지방, 부고환지방, 복막 및 후방복막 지방, 장간막 지방을 적출하였다. 적출된 조직은 생리식염수로 씻은 후 여과지상에서 가볍게 수분을 제거하고 무게를 측정하였으며, 결과는 표 3에 나타내었다.

표 3

[0054]

	정상식이군	정상식이군 +이소플라본 +L-카르니틴 (n=12)	정상식이군 +L-아르기닌 +카페인(n=12)	정상식이군 +이소플라본 +L-카르니틴 +L-아르기닌 +카페인(n=12)
간 무게 (Liver weight) (g.100g b.w.)	3.30±0.34	2.94±0.12*	2.89±0.24*	2.72±0.32*
간트리글리세리드Liver triglyceride (mg/g liver)	34.0±4.2	27.7±5.3	26.2±3.9	20.7±7.6*
피하지방 (Subcutaneous) (g/100g b.w.)	0.92±0.17	0.84±0.06	0.78±0.05	0.67±0.12*
부고환지방 (Epididymal) (g/100g b.w.)	3.45±0.26	2.81±0.28*	2.94±0.18*	2.21±0.23 *
복막 및 후방복막 지방 Peritoneal & retroperitoneal (g/100g b.w.)	1.43±0.21	1.27±0.32	1.15±0.21	0.82±0.38 *
장간막지방 (Mesenteric) (g/100g b.w.)	1.77±0.28	1.62±0.27	1.56±0.31	1.31±0.36 *

[0055] * $p<0.05$

[0056] 실험기간동안 이소플라본 + L-카르니틴 투여군과 L-아르기닌 + 카페인 투여군은 정상식이군에 비해 지방 조직의 무게가 감소의 변화가 크게 나타나지 않았지만, 이소플라본 + L-카르니틴 + L-아르기닌 + 카페인 첨가 시 지방 조직의 무게는 통계적으로 유의성 있게 더욱 작게 나타났다. 따라서, 고열량식이로 유도된 쥐의 이소플라본 + L-카르니틴 + L-아르기닌 + 카페인 투여군에서는 체지방량의 감소에 상승효과가 있음을 확인하였다.

[0057] [시험예 4] 수컷 KK 쥐에서 이소플라본, L-카르니틴, 카페인 및 아르기닌 복합물 처리에 의한 지방분해 효능 평가

[0058] 20주령 된 수컷 KK 쥐에 정상식이군, 정상식이 + 이소플라본 2mg + L-카르니틴 15mg, 정상식이 + L-아르기닌 60mg+카페인 2.5mg, 정상식이군 + 이소플라본 2mg + L-카르니틴 15mg + L-아르기닌 60mg + 카페인 2.5mg을 섭취 시키고, 60분 후에 지방분해를 유도하기 위해 에피네프린 50㎍/100g b.w.을 투여하였다. 식이 섭취 120분이 되었을 때, 첨가의 4개 군에 대해 KK 쥐의 지방세포 내 중성지방 분해 촉진 효능을 평가하기 위하여 상기 시험예 2의 방법으로 수거한 혈장을 이용하여 실험을 실시하였다. 지방 분해 효능은 지방세포에서 유리되어 혈장 중으로 유리된 글리세롤(glycerol) 농도를 측정함으로써 판단하였다. 글리세롤(glycerol)의 정량은 발색반응법(GPO-trinder kit, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A)으로 하였으며, 분광흡도분석기(ELISA reader)를 이용하여 540㎚에서 흡광도를 측정하였다.

[0059] 글리세롤의 정량 결과는 도 2에서 보여지는 바와 같이, 정상식이+ 이소플라본 + L-카르니틴, 정상식이 + L-아르기닌 + 카페인 처리하였을 때에 지방산 분해효과는 대조군에 비하여 각각 3.2배, 3.7배 정도 증가하였으며, 정상식이군 + 이소플라본 + L-카르니틴 + L-아르기닌 + 카페인을 처리하였을 때는 약 5.6 배 정도 증가하였음을 알 수 있었다. 또한 지방이 분해되어 혈중으로 유출되는 글리세롤의 양이 시간대 별로 증가하며, 4가지 복합물에 가장 효과적임을 확인 할 수 있었다. 도 2에서 IF는 이소플라본, LC는 L-카르니틴, Arg는 아르기닌, Caf는

카페인을 나타낸다.

[0060] [시험예 5] 수컷 KK 쥐에서 이소플라본, L-카르니틴, 카페인 및 아르기닌 복합물 처리에 의한 지방산 산화량 측정

[0061] 시험예 4의 시험 디자인과 동일하게 하여 KK 쥐의 지방세포 내 중성지방 분해 촉진 효능을 평가하기 위하여 근육조직의 동맥과 정맥에 클램프를 설치하여 식이 섭취 120분이 되었을 때부터, 0분, 60분, 90분 경과한 시점에서 실린지(Sarstedt, Leicester, United Kingdom)로 혈액을 200ml씩 채취하여 시험예 2와 같은 방법으로 혈청을 분리하였다. 지방산 산화 효과는 지방조직이 비에스터화 지방산 흡입한 양(Non-esterified fatty acids(NEFA) uptake)으로 계산함으로써 판단하였다. NEFA 양은 발색반응법(Wako NEFA C kit, Wako Chemicals Inc., Richmond, VA)으로 정량하여 분광흡도분석기(ELISA reader)를 이용하여 550nm에서 흡광도를 측정하고, NEFA 흡입량은 유입된 NEFA양과 유출된 NEFA양의 차이로 계산하였다.

[0062] NEFA 흡입량(Non-esterified fatty acids uptake)의 정량 결과는 도 3에서 보여지는 바와 같이, 정상식이 + 이소플라본 + L-카르니틴, 정상식이 + L-아르기닌 + 카페인 처리하였을 때에 지방산 분해된 지방산이 미토콘드리아에서 일어나는 지방산 대사에 재사용되는 효과는 대조군에 비하여 각각 2.7배, 4.2배 정도 증가하였으며, 정상식이군 + 이소플라본 + L-카르니틴 + L-아르기닌 + 카페인을 처리하였을 때는 약 5.2 배 정도 증가하였음을 확인 할 수 있었다. 도 3에서 IF는 이소플라본, LC는 L-카르니틴, Arg는 아르기닌, Caf는 카페인을 나타낸다.

[0063]

[0064] [시험예 6] 3T3-L1 지방세포에서 이소플라본, L-카르니틴, 카페인 및 아르기닌 복합물 처리에 의한 분화 억제 효능

[0065] [1 단계] 지방세포주와 세포 분화

[0066] 쥐의 미분화지방세포 3T3-L1 지방세포(adipocyte)(ATCC로부터 구매)를 10% 우혈청(calf serum)이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's Medium, Gibco 1210-0038) 배지에서 이틀에 한번씩 배지를 교환하면서 70% 융합(confluent) 할 때까지 10% CO_2 배양기에서 배양하였다. 지방세포로의 분화는 10% 우태혈청(fetal bovine serum), 0.5 mM 3-이소부틸-1-메틸산틴(3-isobutyl-1-methyxanthine (Sigma)), 1 μM 덱사메타손(dexamethasone (Sigma)) 및 167 nM 인슐린(insulin (Novo-Nordisk))을 포함한 배지에서 48시간 배양 후, 그 배지를 10% 우태혈청(fetal bovine serum)과 167 nM 인슐린(insulin)을 포함한 DMEM 배지로 교환하여 다시 48시간을 배양하였다. 마지막으로, 10% 우태혈청(fetal bovine serum)만을 포함한 배지에서 48시간을 더 배양하여 분화된 지방세포를 얻었다.

[0067] [2 단계] 3T3-L1 지방세포에서 이소플라본, L-카르니틴, 카페인 및 아르기닌 복합물 처리에 의한 분화 억제 효능

[0068] 1 단계에서 분화된 지방세포를 5% 무지방산 우혈청이 포함된 배지에서 16시간 배양한 후, 다음날 PBS로 3회 세척한 후 이소플라본 1μM, L-카르니틴 1mM, L-아르기닌 1mM, 카페인 10ppm, 이소플라본 1μM + L-카르니틴 1mM + L-아르기닌 1mM + 카페인 10ppm 혼합물을 각각 처리하였다. 각 실험 물질은 48 시간 마다 배지 교환과 함께 처리하여 8일 후에 수단(Sudan) 2 염색을 통해 중성지방의 양을 측정하였으며, 측정한 결과는 도 4에 나타내었다. 도 4에서 P10은 이소플라본을 나타낸다.

[0069] 단독으로는 효능을 보이지 않거나 미미한 효능을 보이는 저 농도의 네 가지 약물을 혼합하여 처리했을 때, 지방세포의 분화가 약 40% 정도 억제된 것으로 보아 네 가지 소재는 지방세포분화를 효과적으로 억제하고 있음을 확인 할 수 있었다.

[0070] [시험예 7] 3T3-L1 지방세포에서 이소플라본, L-카르니틴, 카페인 및 아르기닌 복합물 처리에 의한 지방분해 촉진

[0071] [1 단계] 지방세포주와 세포 분화

[0072] 시험예 6의 1 단계와 동일하다.

[0073] [2 단계] 3T3-L1 지방세포에서 이소플라본, L-카르니틴, 카페인 및 아르기닌 복합물 처리에 의한 지방분해(lipolysis) 촉진

[0074] 1 단계에서 분화된 지방세포를 5% 무지방산 우혈청이 포함된 배지에서 8일 동안 분화 시킨 지방세포를 PBS로 3회 세척한 후 이소플라본 10μM, L-카르니틴 0.5mM, L-아르기닌 1mM, 카페인 10ppm 과 이소플라본 10μM + L-카르니틴 0.5mM + L-아르기닌 1mM + 카페인 10ppm 혼합물을 6시간 처리한 후 배지를 수거하여 GPO-Trinder kit(Sigma diagnostics, St. Louis, MO)를 이용하여 배지 내 글리세롤(glycerol) 농도를 측정하였으며, 측정한 결과는 도 5에 나타내었다. 도 5에서 P10은 이소플라본을 나타낸다.

[0075] 단독으로는 효능을 보이지 않거나 미미한 효능을 보이는 저 농도의 네 가지 약물을 혼합하여 처리하였을 때, 대조구인 세포에 비해 약 2배의 중성지방분해 효능을 나타내었다. 이것을 통하여 네 가지 소재는 혼합하였을 때 중성지방분해 효능에 대한 시너지 효과가 나타남을 확인하였다.

[0076] [시험예 8] 3T3-L1 지방세포에서 이소플라본, L-카르니틴, 카페인 및 아르기닌 복합물 처리에 의한 아디포넥틴의 발현 증진

[0077] [1 단계] 지방세포주와 세포 분화

[0078] 시험예 6의 1 단계와 동일하다

[0079] [2 단계] 3T3-L1 지방세포에서 이소플라본, L-카르니틴, 카페인 및 아르기닌 복합물 처리에 의한 아디포넥틴의 발현 증진 효과

[0080] 1 단계에서 분화된 지방세포를 5% 무지방산 우혈청이 포함된 배지에서 16시간 배양한 후, 다음날 PBS로 3회 세척한 후 이소플라본 100μM, L-카르니틴 1mM, L-아르기닌 1mM, 카페인 100ppm와 이소플라본 100μM + L-카르니틴 1mM + L-아르기닌 1mM + 카페인 100ppm 혼합물을 각각 처리하였다. 24시간 동안 반응시킨 후, 단백질을 분리하여 아디포넥틴(adiponectin)에 대한 웨스턴 블럿(western blot)을 수행하여 그의 발현 변화를 확인하였으며, 이를 나타낸 것이 도 6이다. 지방세포는 분화되면서 아디포넥틴의 발현이 증가하였다. 따라서 지방세포의 분화를 억제하게 되면 아디포넥틴의 발현은 감소하였다. 카페인은 지방세포의 분화를 억제하기 때문에 카페인을 처리한 세포는 아디포넥틴의 발현이 감소하였다. 그러나 이소플라본 + L-카르니틴 + L-아르기닌 + 카페인 혼합물을 처리했을 때에는 지방세포의 분화는 억제되었으나, 아디포넥틴의 발현은 유지되었다. 도 6에서 P10은 이소플라본을 나타낸다.

[0081] 이것은 네 가지 소재의 혼합효과로 보이며, 이것은 네 가지 소재를 혼합처리하면 지방세포의 지방축적은 억제하며, 다른 조직에서의 에너지 소비는 계속적으로 촉진하여, 카페인과 같은 기작을 갖는 물질을 단독으로 처리했을 때 발생할 수 있는 인슐린 저항성으로 인한 제 2형 당뇨를 극복하는 데 효과적임을 확인하였다.

[0082] [시험예 9] 3T3-L1 지방세포에서 이소플라본, L-카르니틴, 카페인 및 아르기닌 복합물 처리에 의한 Gult4 의 발현 증진

[0083] [1 단계] 지방세포주와 세포 분화

[0084] 시험예 6의 1 단계와 동일하다

[0085] [2 단계] 3T3-L1 지방세포에서 이소플라본, L-카르니틴, 카페인 및 아르기닌 복합물 처리에 의한 Glut4의 발현 증진

[0086] 1 단계에서 분화된 지방세포를 5% 무지방산 우혈청이 포함된 배지에서 16시간 배양한 후, 다음날 PBS로 3회 세척한 후 이소플라본 100μM, L-카르니틴 1mM, L-아르기닌 1mM, 카페인 100ppm와 이소플라본 100μM + L-카르니틴 1mM + L-아르기닌 1mM + 카페인 100ppm 혼합물을 각각 처리하였다. 24시간 동안 반응시킨 후, 단백질을 분리하여 Glut4에 대한 웨스턴 블럿(western blot)을 수행하여 그의 발현 변화를 확인하였으며, 이를 나타낸 것이 도 6이다.

[0087] 단독으로는 효능을 보이지 않거나 미미한 효능을 보이는 저 농도의 이소플라본 + L-카르니틴 + L-아르기닌 + 카페인 혼합물을 처리하였을 때, 대조구인 세포에 비해 유의적으로 Glut4의 발현량이 증가하였고, 하우스 키핑 단백질(House keeping protein)인 베타-액틴(β-actin) 양을 고려하였을 때, 이것을 통하여 비만치료로 인해 발생할 수 있는 인슐린 저항성을 극복하는데 네 가지 소재를 혼합한 이소플라본 + L-카르니틴 + L-아르기닌 + 카페인 혼합물이 효과적임을 확인하였다.

발명의 효과

[0088] 이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명의 비만 및 당뇨병 개선용 조성물은 이소플라본, 카르니틴, 카페인 및 아르기닌을 함유하여 지방세포내에 축적되어 있는 중성지방을 유리지방산과 글리세롤로 분해하는 과정을 촉진시키고 또한 지방산을 연소시키는 과정을 촉진시키는데 효과가 있고 체지방을 감소시킴과 동시에 지방세포의 분화를 억제하는 기능을 가진 카페인의 인슐린 저항성 유발을 보완하여 체중 및 체지방의 감소와 더불어 제 2형 당뇨병의 치료 및 개선에 효과적인 조성물로 사용할 수 있으므로 식품 및 의약품 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

[0001] 도 1은 수컷 KK 쥐에서 이소플라본, L-카르니틴, 카페인 및 아르기닌 복합물 처리에 의한 혈액 생화학 성분의 변화를 확인한 것이다.

[0002] 도 2는 수컷 KK 쥐에서 이소플라본, L-카르니틴, 카페인 및 아르기닌 복합물 처리에 의한 지방 분해 효능을 평가한 것이다.

[0003] 도 3은 수컷 KK 쥐에서 이소플라본, L-카르니틴, 카페인 및 아르기닌 복합물 처리에 의한 지방산 산화량 측정한 것이다.

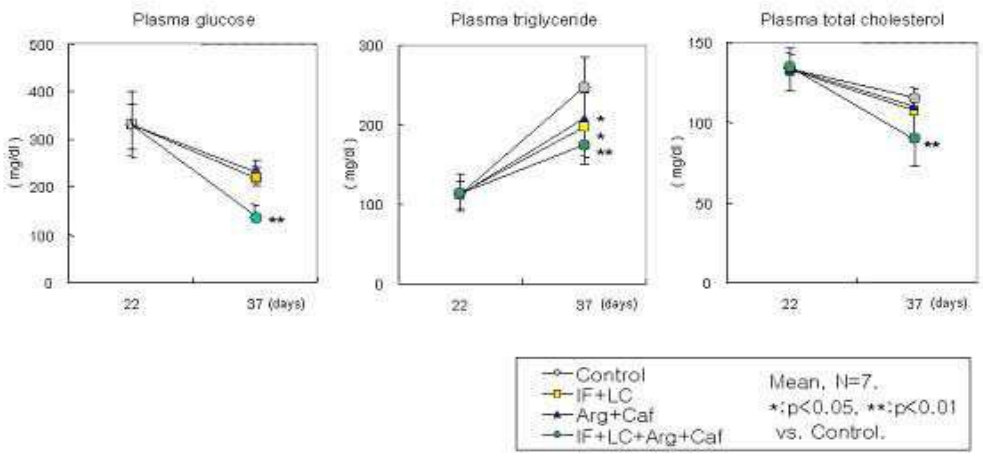
[0004] 도 4는 지방 전구세포 3T3-L1에서 이소플라본, L-카르니틴, 카페인 및 아르기닌 복합물 처리에 의한 분화 억제 효능을 확인한 것이다.

[0005] 도 5는 지방 전구세포 3T3-L1에서 이소플라본, L-카르니틴, 카페인 및 아르기닌 복합물 처리에 의한 지방분해(lipolysis) 촉진 효능을 평가한 것이다.

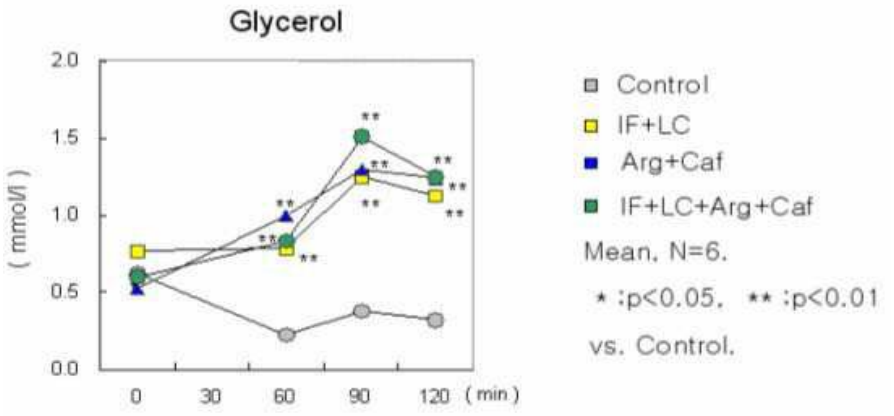
[0006] 도 6은 지방 전구세포 3T3-L1에서 이소플라본, L-카르니틴, 카페인 및 아르기닌 복합물 처리에 의한 아디포넥틴과 Glut4의 발현 증진을 확인한 것이다.

도면

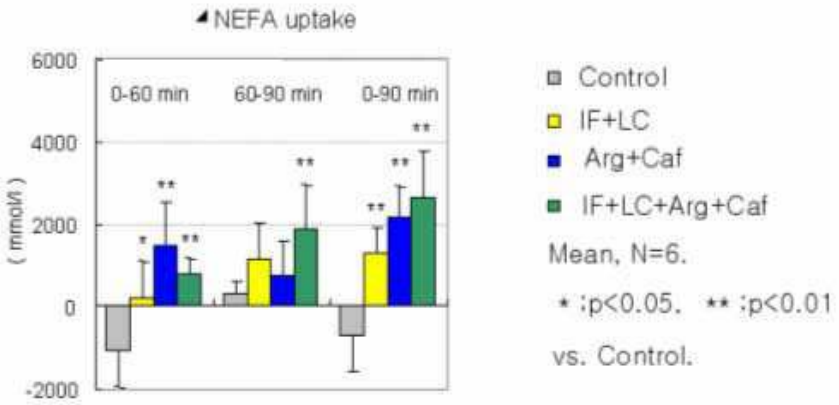
도면1



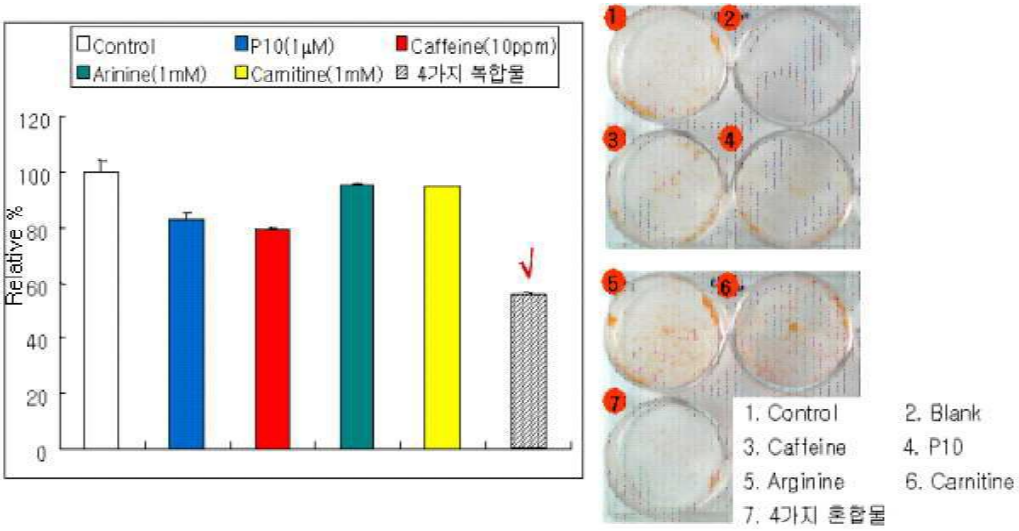
도면2


Glycerol
(mmol/l)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
30
60
90
120
(min)
Control
IF+LC
Arg+Caf
IF+LC+Arg+Caf
Mean, N=6.
* :p<0.05, ** :p<0.01
vs. Control.

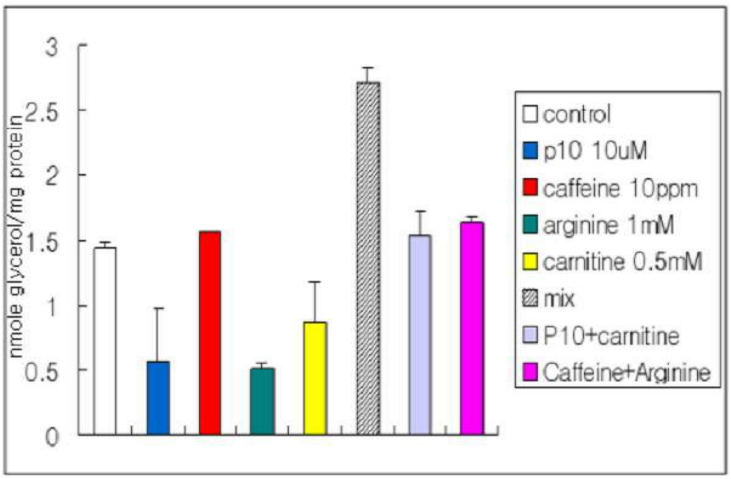
도면3


NEFA uptake
(mmol/l)
6000
4000
2000
0
-2000
0-60 min
60-90 min
0-90 min
Control
IF+LC
Arg+Caf
IF+LC+Arg+Caf
Mean, N=6.
* :p<0.05, ** :p<0.01
vs. Control.

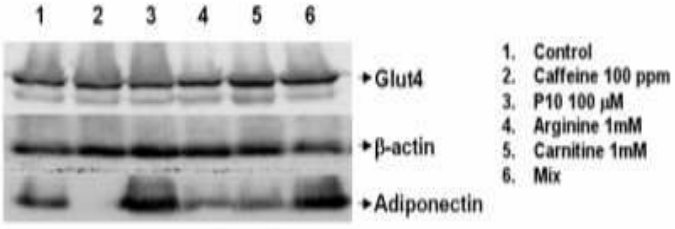
도면4


Control
P10(1μM)
Caffeine(10ppm)
Arinine(1mM)
Carnitine(1mM)
4가지 복합물
Relative %
120
100
80
60
40
20
0
1. Control
2. Blank
3. Caffeine
4. P10
5. Arginine
6. Carnitine
7. 4가지 혼합물

도면5


nmole glycerol/mg protein
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
control
p10 10uM
caffeine 10ppm
arginine 1mM
carnitine 0.5mM
mix
P10+carnitine
Caffeine+Arginine

도면6


1 2 3 4 5 6
Glut4
β-actin
Adiponectin
1. Control
2. Caffeine 100 ppm
3. P10 100 μM
4. Arginine 1mM
5. Carnitine 1mM
6. Mix