

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 4월 26일 (26.04.2018) WIPO | PCT

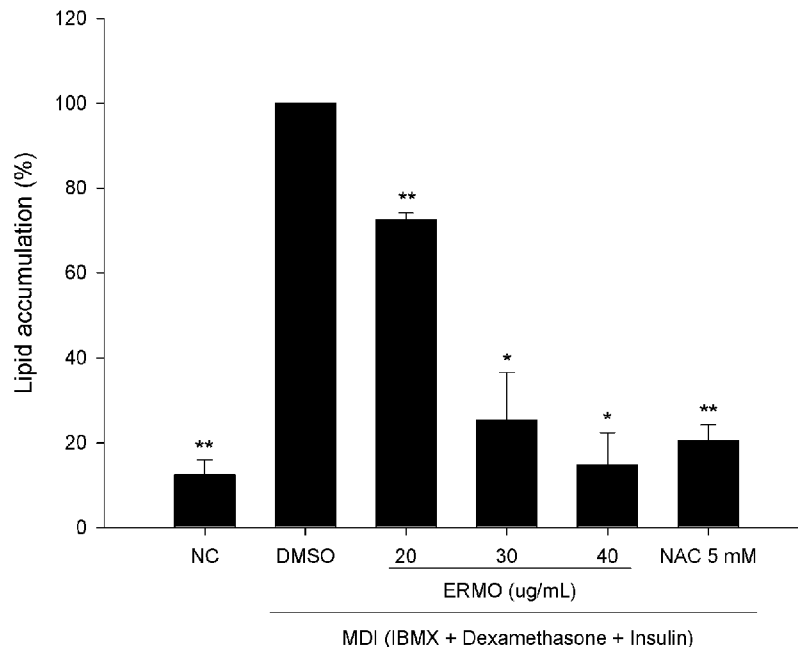


(10) 국제공개번호
WO 2018/074831 A1

- (51) 국제특허분류: A61K 36/605 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/011501
- (22) 국제출원일: 2017년 10월 18일 (18.10.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2016-0135251 2016년 10월 18일 (18.10.2016) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 임영희 (LIM, Young Hee); 03730 서울시 서대문구 통일로25길 30, 108동 208호 (홍제동), Seoul (KR). 황선욱 (HWANG, Seon Wook); 12141 경기도 남양주시 천마산로14번길 10, 101동 1303호 (호평동), Gyeonggi-do (KR). 김정근 (KIM, Jeung Keun); 08734 서울시 관악구 관악로30길 27, 118동 802호 (봉천동), Seoul (KR). 김준호 (KIM, Jun Ho); 02443 서울시 동대문구 회기로 29길 63-5 (회경동), Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 남앤드남 (NAM & NAM WORLD PATENT & LAW); 04515 서울시 중구 서소문로 117, 3층 (서소문동, 대한항공빌딩), 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, 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 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING OBESITY CONTAINING ETHANOLIC EXTRACT OF *RAMULUS MORI*

(54) 발명의 명칭: 상지 주정 추출물을 함유하는 비만을 예방 또는 치료하기 위한 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing or treating obesity containing an ethanolic extract of *Ramulus mori* as an active ingredient. As the present invention contains an ethanolic extract of *Ramulus mori*, extracted from natural substance *Ramulus mori*, as an active ingredient, the present invention may prevent or treat obesity by inhibiting lipid accumulation in adipocytes without any side effects to a human body and inhibiting preadipocytes from being differentiated into adipocytes.

(57) 요약서: 본 발명은, 상지(*Ramulus mori*) 주정추출물을 유효성분으로 포함하는, 비만 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 천연물인 상지로부터 추출된 상지 주정 추출물을 유효성분으로 포함하므로, 인체에 부작용 없이 지방세포 내 지방축적을 억제하거나, 지방전구세포가 지방세포로 분화하는 것을 억제하여, 비만을 예방하거나 치료할 수 있다.

[다음 쪽 계속]



WO 2018/074831 A1



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 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 상지 주정 추출물을 함유하는 비만을 예방 또는 치료하기 위한 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 상지(*Ramulus mori*) 주정 추출물을 포함하는, 비만을 예방 또는 치료하기 위한 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 체지방 축적은 지방세포에 의해 생성되는 과량의 지방에 의해 유발된다. 지방세포 분화 촉진에 의한 지방 축적은 비만의 원인이 되며 이는 제2형 당뇨병, 고혈압 및 심혈관 질환과 같은 다양한 질병의 원인이 되는 것으로 알려져 있다(HAJER, G.R., Van Haeften, T.W., Visseren, F.L., 2008. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European heart journal*, **29**(24), 2959-2971). 전세계적으로 비만 인구는 2012년도에 21억 명으로 2030년에는 33억 명으로 증가 할 것으로 예상되고 있다. 현재 다양한 항비만 제품이 개발 되어 시판되고 있으며 항비만 제품 시장의 규모는 지속적으로 증가하는 추세이다. 그러나 현재 시판되고 있는 많은 항비만 의약품의 경우 부작용(예 정신질환 유발 위험을 증가시킴, 심근경색, 뇌졸중, 위장관계 부작용)을 나타낸다는 보고에 따라 제품허가가 취소되고 있는 실정이다(Kang, J.G. and Park, C., 2012. Anti-obesity drugs: a review about their effects and safety. *Diabetes & metabolism journal*, **36**(1), 13-25). 따라서 현재 안전성 등을 고려한 천연물 유래의 비만 억제 효과를 보이는 대체 치료법에 대한 연구가 활발히 진행 중이다(Lai, C., Wu, J., Pan, M., 2015. Molecular mechanism on functional food bioactives for anti-obesity. *Current Opinion in Food Science*, **2**, 9-13). 현재 식품의약품안전처로부터 체지방 감소에 대한 효과를 인정받아 시판되고 있는 천연 기능성 원료는 가르시니아카보지아껍질 추출물, 콜레우스포스콜리 추출물, 갯잎 추출물, 그린마테 추출물, 대두배아 추출물 등 복합물, 녹차 추출물, 레몬밤 추출물 혼합분말, 마테 열수추출물, 동외잎주정 추출 분말, 핑거루트 추출 분말, 락토페린, 미역 등 복합추출물, 보이차 추출물, 와일드망고종자 추출물, 그린커피빈 추출물, 발효식초 식료 복합물, 키토산, 키토올리고당, 서목태왁타이드 복합물, L-카르니틴타르트레이트, 공액 리놀레산, 히비스커스 등 복합추출물 등이 있다(건강기능식품의 기능성원료인정현황, 식품의약품안전처, 2015).
- [3] 지방세포(adipocyte)는 지방 조직에서 지방을 축적하는 세포로 신체 에너지 대사의 항상성을 유지시키는 역할을 한다. 지방세포로 구성된 지방 조직이 과도로 축적된 결과로 비만이 유발된다. 따라서 지방세포 분화는 지방 축적의 원인이 되며 이는 비만과 밀접한 관련이 있다(Ristow, M., Muller-Wieland, D.,

Pfeiffer, A., Krone, W., Kahn, C.R., 1998. Obesity associated with a mutation in a genetic regulator of adipocyte differentiation. *New England Journal of Medicine*, **339** (14), 953-959). 지방세포(adipocyte)는 mesenchymal precursor에서 지방전구세포(pre-adipocyte) 단계를 거쳐 지방세포(adipocyte)로 분화되며, 분화과정 동안 형태적, 생화학적 변화를 통하여 체내 지방을 축적한다. 지방세포의 분화는 지방 조직세포에 특징적으로 발현되는 일련의 유전자들의 발현 변화에 의해 유도되며 이 유전자들의 조절부위에 작용하는 transcription factor들의 발현에 의해 조절된다. 인슐린은 지방 세포의 분화를 유도하는 호르몬으로 지방세포 대사 조절에 관여하는 주요 외부인자이다. 지방세포는 분화 동안 CCAAT enhancer-binding-proteins(C/EBP) family, peroxisome-proliferators activated-receptor- γ (PPAR- γ), sterol regulatory element binding protein-1(SREBP-1)등의 전사인자들의 발현이 증가되고 이들 전사인자들은 상호 전사를 유도하여 지방세포의 분화가 이루어진다. 따라서 이들 전사인자 발현을 억제하는 부작용이 없는 천연물을 이용한 비만 연구가 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 본 발명의 목적은, 지방 축적 또는 지방세포 분화를 억제하는 상지 주정 추출물을 포함하는, 비만 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [5] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [6] 일실시예에 따르면, 상지(*Ramulus mori*) 주정 추출물을 유효성분으로 포함하는, 비만 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [7] 일측에 따르면, 상기 상지 주정 추출물은 지방 축적을 억제할 수 있다.
- [8] 일측에 따르면, 상기 상지 주정 추출물은 지방세포 분화를 억제할 수 있다.
- [9] 일측에 따르면, 상기 상지 주정 추출물은, 페록시솜 증식자-활성화 수용체- γ (PPAR- γ), CCAAT/인핸서-결합단백질- α (C/EBP- α) 또는 스테롤 조절인자 결합단백질-1(SREBP-1)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 전사인자 발현을 억제할 수 있다.
- [10] 일측에 따르면, 상기 조성물은 약학적 조성물일 수 있다.
- [11] 일측에 따르면, 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다.
- [12] 일실시예에 따르면, 상지(*Ramulus mori*) 주정 추출물을 유효성분으로 포함하는, 비만 예방 또는 치료용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [13] 본 발명의 비만 예방 또는 치료용 조성물은, 천연물인 상지로부터 추출된 상지 주정 추출물을 유효성분으로 포함하므로, 인체에 부작용 없이 지방세포 내 지방 축적을 억제하거나, 지방전구세포가 지방세포로 분화하는 것을 억제하여, 비만을 예방하거나 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [14] 도 1은, 일실시에에 따른 상지 주정 추출물이 처리된 3T3-L1 세포에서의 세포독성 정도를 나타내는 그래프이다.
- [15] 도 2는, 일실시에에 따른 상지 주정 추출물이 처리된 지방세포의 지방구를 나타내는 사진이다.
- [16] 도 3은, 일실시에에 따른 상지 주정 추출물이 처리된 지방세포의 지방 축적을 나타내는 그래프이다.
- [17] 도 4a 내지 도 4c는, 일실시에에 따른 상지 주정 추출물이 처리된 지방세포에서의 지방세포 분화에 관련된 유전자의 발현 정도를 나타내는 그래프이다.
- [18] 도 5a 및 도 5b는, 일실시에에 따른 상지 주정 추출물이 처리된 지방세포의 FACS 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [19] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 각 도면에 제시된 동일한 참조 부호는 동일한 부재를 나타낸다.
- [20] 아래 설명하는 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있다. 아래 설명하는 실시예들은 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 이들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [21] 실시예에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 실시예를 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [22] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [23] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조 부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로

한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

- [24] 일실시예에 따르면, 상지(*Ramulus mori*) 주정 추출물을 유효성분으로 포함하는, 비만 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 특히, 상기 상지 주정 추출물은 지방세포 내 지방의 축적을 억제할 수 있고, 지방전구세포에서 지방세포로의 분화를 억제할 수도 있다.
- [25] 본 발명에서 사용된 "상지(*Ramulus mori*)"는 식품 원료로 등재된 물질로서 장기간 또는 다량으로 사용하여도 부작용(예: 간독성)이 없으며, 본 발명의 상지 주정 추출물을 함유하는 조성물은, 경구로 투여되더라도 지방 축적 억제 또는 지방세포 분화 억제 효과를 충분히 달성할 수 있다.
- [26] 일측에 따르면, 상기 상지 주정 추출물은 페록시솜 증식자-활성화 수용체- γ (PPAR- γ), CCAAT/인핸서-결합단백질- α (C/EBP- α) 또는 스테롤 조절인자 결합단백질-1(SREBP-1)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 전사인자 발현을 억제할 수 있다. 실시예 5를 참고하면, 상지 주정 추출물을 처리한 지방세포에서 지방세포 분화에 관련된 유전자인 PPAR- γ , C/EBP- α , 및 SREBP-1의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있다. 상지 주정 추출물의 농도가 증가할수록 유전자 PPAR- γ , C/EBP- α , 및 SREBP-1의 발현 또한 함께 감소할 수 있다.
- [27] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물일 수 있으며, 이에 따라 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [28] 본 발명에서의 용어 "약학적으로 허용 가능한 담체"는 임의의 대상 조성물 또는 성분을 하나의 기관, 또는 신체의 부분으로부터 다른 기관, 또는 신체의 부분으로의 운반 또는 수송하는 것에 관여하는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질과 같은 제약상 허용 가능한 물질, 조성물 또는 비히클을 지칭하며, 본 발명의 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 스테아린산 마그네슘 및 광물유를 들 수 있다.
- [29] 또한, 본 발명의 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제,

산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

- [30] 뿐만 아니라, 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여될 수 있다. 본 발명에 사용된 "상지"는 식품 원료로 등재된 물질로서 장기간 또는 다량으로 사용하여도 부작용(예: 간독성)이 없으며, 경구로 투여되더라도 지방축적 억제 또는 지방세포분화 억제 효과를 충분히 달성할 수 있다. 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있으며, 장 질환에 대한 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [31] 한편, 본 발명의 염증성 장질환 예방 또는 치료용 조성물은 약학적 조성물 뿐만 아니라 식품 조성물일 수도 있으며, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있다.
- [32] 상기 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [33] 본 발명의 조성물은 통상의 건강기능식품과 같이 다양한 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올일 수 있다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.
- [34] 또한, 본 발명의 조성물은 다양한 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제,

펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

- [35] 다음의 실시예에서는, 상지 주정 추출물이 지방 축적 억제 및 지방세포 분화 억제에 도움이 되는지 확인하기 위해 앞서 세포에 대한 독성시험을 실시하였고, 3T3-L1 preadipocyte(지방전구세포)(American Type Culture Collection, USA)에 물질을 투여한 후 지방구 축적 억제, 지방세포 분화 억제 시험을 수행하였다.

[36] **실시예 1: 상지 주정 추출물의 제조**

- [37] 잘게 잘린 상지 1 kg을 준비하였다. 증류수로 깨끗하게 세척한 후, 80 % 주정용 에탄올 8,000 mL를 첨가하여, 초음파 세척기(H0429115, Hwashin Instrument Co.)에서 48 시간 동안 추출하였다. 추출이 끝난 주정 추출물은 GFC 여과지(Cat No. 1822-047, Whatman)를 이용하여 감압 여과 후 회전식 감압 농축기(N-1000, Eyela)를 사용하여 약 500 mL까지 감압농축 하였다. 농축된 추출물은 -80 °C 초저온냉동고(DF8520, Ilshin Lab Co.)에서 동결 후, 동결건조기(FD8512, Ilshin Lab Co.)를 사용하여 48 시간 동안 동결 건조하여, 상지 주정 추출물을 분말형태로 제조하였다.

[38] **실시예 2: 지방세포 준비**

- [39] 3T3-L1 지방전구세포(preadipocytes)(American Type Culture Collection, USA)는 DMEM 배지(Dulbecco's modified Eagle medium), 10% BCS(bovine calf serum) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신 함유(HyClone, Logan, UT, USA)를 이용하여 5% CO₂, 37 °C 환경에서 배양하였다. 2일마다 신선한 배지로 교환하여 배양하면서 지방구 축적 억제 및 지방세포로의 분화 억제 시험을 실시하였다.

[40] **실시예 3: 세포 독성 평가**

- [41] 상지 주정 추출물(ERMO)의 세포 독성을 평가하기 위하여, 3T3-L1 세포의 Lactate dehydrogenase(LDH) 유리 정도를 지표로 이용하였다.

- [42] 3T3-L1 세포를 5 x 10³ cells/well 의 농도로 96 웰 플레이트에 접종 후 24시간 배양하였다. 그리고 배지에 시료를 첨가하고 1시간 후에 EZ-LDH 세포 독성 어썬이 키트(cell cytotoxicity assay kit: Daeil Lab Service Co., Seoul, Korea)를 이용하여 세포 독성을 측정하였다. 세포 독성은 다음 식에 따라 계산하였다.

- [43] $\% \text{ LDH release} = (\text{LDH in culture medium} / \text{Total LDH}) \times 100.$

- [44] 상지 주정 추출물을 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL 농도별로 준비한 후, 이들을 각각 3T3-L1 세포에 처리하였다. 상지 주정 추출물의 농도에 따른 LDH 유리 정도를 측정하였다.

- [45] 도 1은, 일실시예에 따른 상지 주정 추출물이 처리된 3T3-L1 세포에서의 세포독성 정도를 나타내는 그래프이다.

[46] 도 1을 참고하면, 상지 주정 추출물의 농도에 따른 LDH 유리 정도는 다음과 같았다: 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($16.9 \pm 1.0\%$), 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($15.8 \pm 1.6\%$), 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($14.6 \pm 0.8\%$), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($13.1 \pm 1.3\%$), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($14.6 \pm 0.8\%$). 대조군($17.2 \pm 1.1\%$)과 비교하였을 때, 대부분 경우에서 크게 유의적인 LDH 유출은 관찰되지 않았다. 유의한 LDH 유출이 없는 결과를 통하여, 상지 주정 추출물은 세포 독성이 없다는 점을 확인할 수 있었다.

[47] **실시예 4: 지방 축적 평가**

[48] 3T3-L1 세포를 지방세포로 유도하기 위해 10% FBS 와 1% 페니실린-스트렙토마이신이 함유된 DMEM 배지에 MDI(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인슐린, 0.5 mM IBMX 및 1.0 μM dexamethasone)를 처리하고 2일간 분화를 유도하였다. 분화 유도된 3T3-L1 세포를 생리식염수(PBS)로 세척 후 10% 포르말린으로 1시간 고정시켰다. 고정된 세포를 ddH₂O로 2회 세척 후 60% 이소프로판올에 5분간 처리 후 오일레드 오(Oil Red O) 용액(60% 이소프로판올에 용해)으로 10분간 염색하였다. 염색 후 ddH₂O로 4회 세척하고 100% 이소프로판올로 10분간 탈염색 시킨 후 현미경으로 세포를 관찰하고 또한 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[49] 도 2는, 일실시예에 따른 상지 주정 추출물이 처리된 지방세포의 지방구를 나타내는 사진이다.

[50] 도 2를 참고하면, 상지 주정 추출물이 처리군에서는 상지 주정 추출물의 농도에 의존적으로 지방구가 현저히 감소하는 것이 관찰되었다.

[51] 또한, 용매로 사용된 DMSO만 처리한 시료 결과를 100%로 환산하여, 지방에 대하여 정량적으로 측정하였다.

[52] 도 3은, 일실시예에 따른 상지 주정 추출물이 처리된 지방세포의 지방 축적을 나타내는 그래프이다.

[53] 도 3을 참고하면, 상지 주정 추출물이 처리된 군에서 지방 축적이 감소하였으며, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($72.5 \pm 1.6\%$), 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($25.3 \pm 11.3\%$), 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($14.7 \pm 7.7\%$), 양성대조군으로 사용한 항산화제인 NAC(n-acetyl cysteine, 5mM)이 처리된 군과 유사한 정도의 지방축적 ($20.6 \pm 3.7\%$)이 관찰되었는 바, 상지 주정 추출물(ERMO)은 지방세포에 대하여 우수한 지방 축적 억제 효과를 갖는다는 점을 알 수 있었다.

[54] **실시예 5: 지방세포 분화 관련 유전자 발현 측정**

[55] 분화 유도된 세포로부터 총 mRNA를 AccuZol reagent (Bioneer, Daejun, Korea)를 사용하여 추출 후 NanoDrop(ND-1000, Thermo Scientific)으로 정량하였다. mRNA 1 μg 을 Revert Aid First Strand cDNA synthesis kit(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 역전사시켜 cDNA를 제조 하였다. 정량 실시간 RT-PCR (qPCR)은 StepOne Plus Real-Time PCR System(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 기기를 이용하여 수행하였으며 qPCR에 사용된 프라이머는 다음 표

1과 같다. PCR 반응은 95°C에서 10분 반응 시킨 후 95°C에서 15초, 60°C에서 1분 반응을 40회 반복하였다. β -actin 유전자를 endogenous control로 사용하였으며 아무것도 처리하지 않은 샘플(음성대조군: Negative control)의 유전자 발현량을 1로 하여, 상대정량 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ method) 하였다.

[56]

【표 1】

Gene	Primer	Sequence
PPAR γ	Forward	5' CAA GCC CTT TAC CAC AGT TGA 3'
	Reverse	5' CAG GTT CTA CTT TGA TCG CAC TT 3'
C/EBP α	Forward	5' TGG ACA AGA ACA GCA ACG AG 3'
	Reverse	5' TCA CTG GTC AAC TCC AGC AC 3'
SREBP-1	Forward	5' AAC CAG AAG CTC AAG CAG GA 3'
	Reverse	5' TTT CAT GCC CTC CAT AGA CA 3'
β -actin	Forward	5' CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG 3'
	Reverse	5' ACC AGA GGC ATA CAG GGA CA 3'

[57] 도 4a 내지 도 4c는, 일실시예에 따른 상지 주정 추출물이 처리된 지방세포에서의 지방세포 분화에 관련된 유전자의 발현 정도를 나타내는 그래프이다.

[58] 도 4a 내지 도 4c를 참고하면, 상지 주정 추출물(ERMO)의 지방세포 분화에 관련된 유전자의 발현 저해를 평가하기 위해 3T3-L1 세포를 MDI로 분화 유도 후 유전자 발현을 qPCR 분석을 수행한 결과, peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ), CCAAT/enhancer-binding proteins- α (C/EBP- α) 및 sterol regulatory element-binding protein-1(SREBP-1) 모두 농도의존적으로 감소하는 것을 알 수 있었다.

[59] 보다 상세하게는, 용매로 사용된 DMSO만 처리한 시료 결과를 1로 환산하여 상대적인 발현량을 비교한 결과, 도 4a를 참고하면, PPAR- γ 의 경우 20 $\mu\text{g/ml}$ (0.85 $\pm$ 0.03), 30 $\mu\text{g/ml}$ (0.55 $\pm$ 0.04), 40 $\mu\text{g/ml}$ (0.47 $\pm$ 0.04)로 감소하였고, 도 4b를 참고하면, C/EBP- α 의 경우 20 $\mu\text{g/ml}$ (0.76 $\pm$ 0.04), 30 $\mu\text{g/ml}$ (0.30 $\pm$ 0.02), 40 $\mu\text{g/ml}$ (0.23 $\pm$ 0.04) 이었으며, 도 4c를 참고하면, SREBP-1의 경우 20 $\mu\text{g/ml}$ (0.88 $\pm$ 0.001), 30 $\mu\text{g/ml}$ (0.74 $\pm$ 0.01), 40 $\mu\text{g/ml}$ (0.60 $\pm$ 0.02) 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[60] **실시예 6: 지방세포 분화 억제 평가**

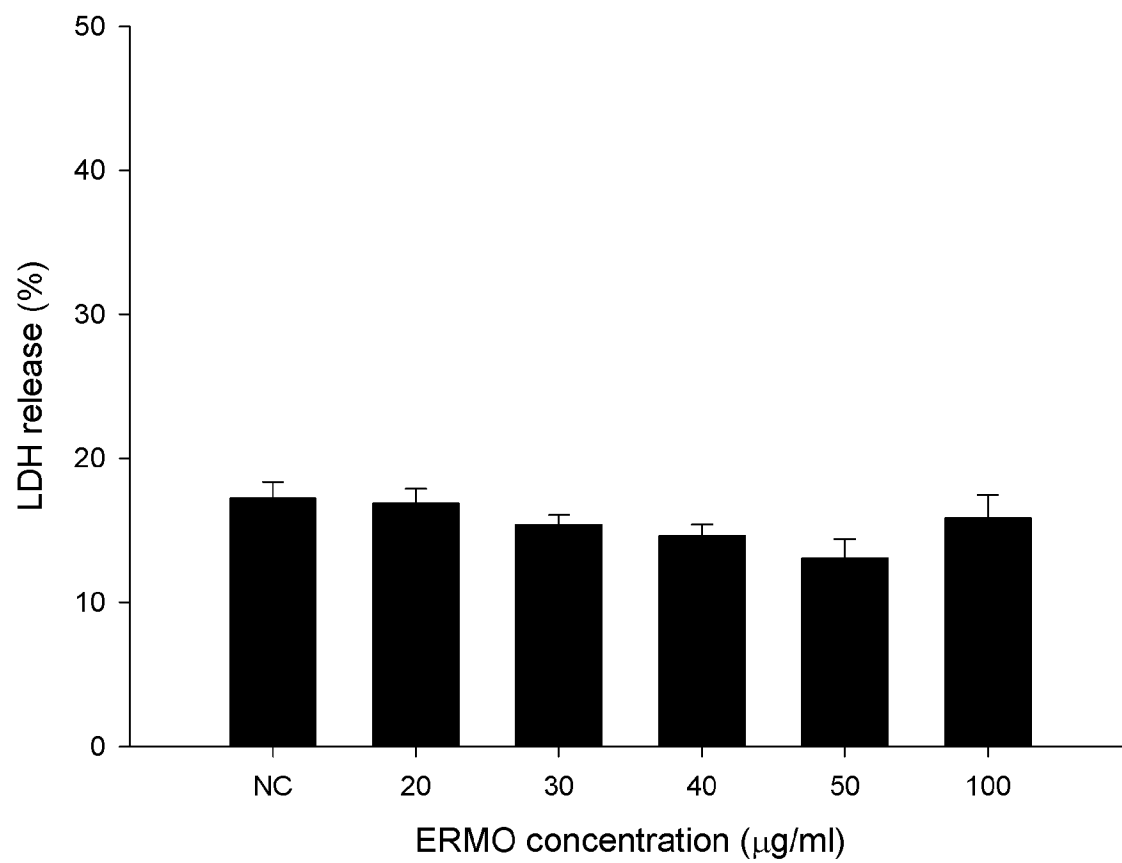
[61] 지방세포의 분화가 억제되는지를 평가하기 위하여, 3T3-L1 세포를 100mm 디쉬에 배양 후 상지 주정 추출물을 첨가하여 18시간 세포 분화를 유도하였다. 세포를 회수 후 70% 에탄올로 4°C에서 최소 2시간 고정 후 PBS로 세척하고 300 x g에서 5분 원심분리하여 세포를 회수 하였다. 고정된 세포를 FxCycle PI/RNase Staining solution(Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 실온에서 30분 염색하였다. 염색된 세포는 flow cytometry(BD Caliber, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 분석되었다.

- [62] 즉, 상지 주정 추출물(ERMO)의 3T3-L1 세포 지방세포로의 분화 억제에 대해 평가하기 위해 3T3-L1 세포를 MDI로 분화 유도 후 분화 초기 과정 중의 세포를 fluorescence-activated cell sorting(FACS) 분석 하고 각 단계의 세포 비율을 정량화 하였다.
- [63] 도 5a 및 도 5b는, 일실시에에 따른 상지 주정 추출물이 처리된 지방세포의 FACS 결과를 나타낸 것이다.
- [64] 도 5a의 FACS 결과를 보면 상지 주정 추출물 처리에 의해 S 단계의 세포는 감소하고 G_0/G_1 세포는 증가함을 알 수 있었다. 도 5b를 참고하면, FACS 결과를 정량화 한 결과 또한 용매로 사용된 DMSO만 처리한 군에 비해 상지 주정 추출물(ERMO) 처리에 의해 G_0/G_1 주기의 세포가 농도 의존적으로 증가함을 알 수 있었다. 보다 구체적으로, G_0/G_1 주기 세포 비율이 용매로 사용된 DMSO만 처리한 시료에서는 30.86% 였으며, 상지 주정 추출물(ERMO)을 20, 30, 40 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 그룹에서는 각각 55.41, 62.49, 70.78%로 증가하였다. 이러한 결과는 3T3-L1 지방전구세포(preadipocytes)가 상지 주정 추출물(ERMO) 처리에 의하여 G_0/G_1 주기에 정지되는 것을 의미하는 것이며, 따라서, 상지 주정 추출물(ERMO)이 3T3-L1 세포의 지방세포로의 분화를 억제한다는 점을 확인할 수 있었다.
- [65] 본 발명의 실시예 전반에 걸쳐 사용된 통계분석은 SigmaPlot Version 10.0 및 SPSS version 21를 이용하여 수행하였으며, One-way analysis of variation(ANOVA)를 실시하여 유의성이 관찰되면 용매대조군과 유의한 차이가 있는 시험군을 확인하기 위해 Dunnett's t-test를 실시하였다(* $p < 0.05$).
- [66] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.
- [67] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 특허청구범위의 범위에 속한다.

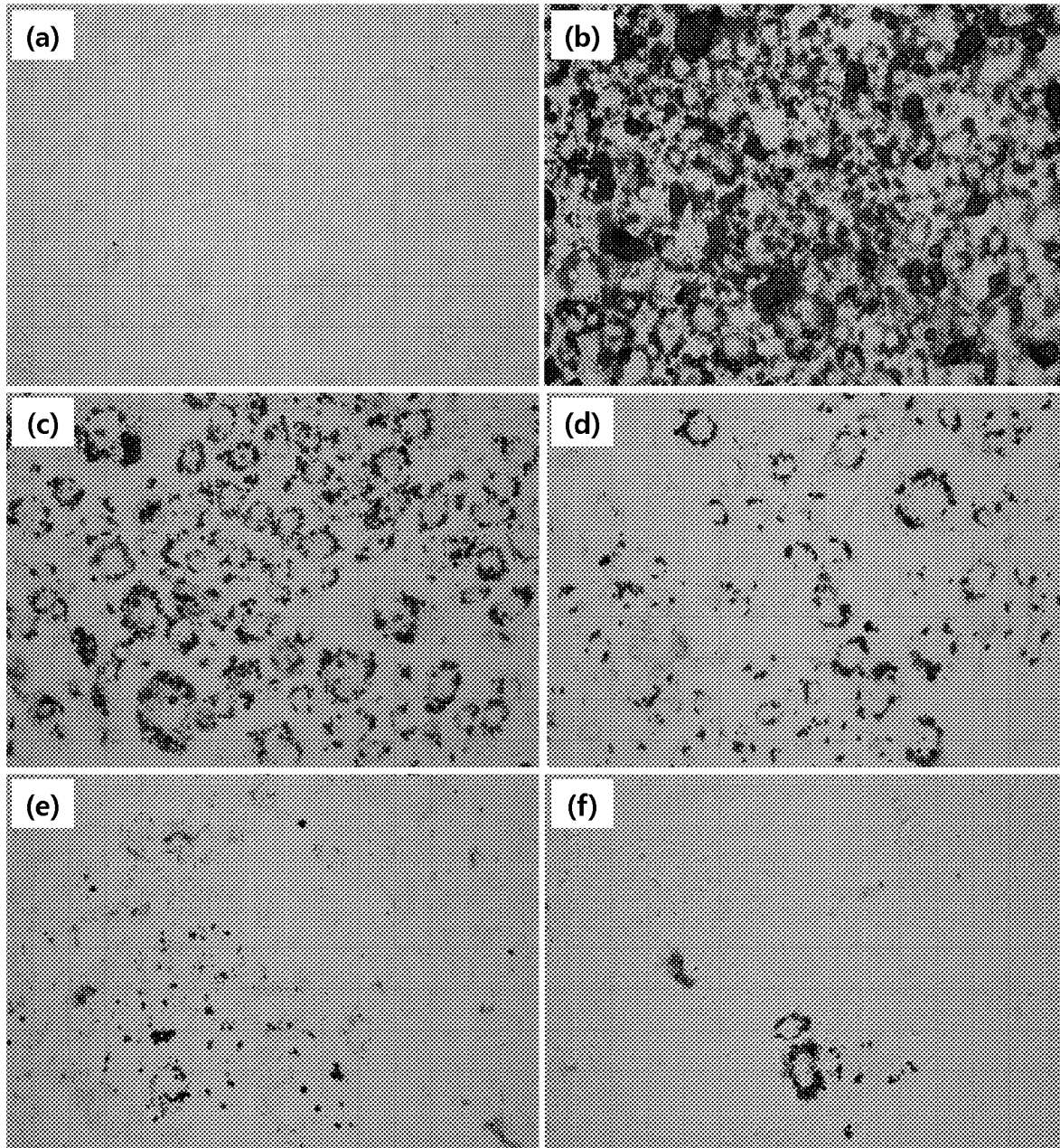
청구범위

- [청구항 1] 상지(*Ramulus mori*) 주정 추출물을 유효성분으로 포함하는, 비만 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 상지 주정 추출물은 지방 축적을 억제하는, 비만 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 상지 주정 추출물은 지방세포 분화를 억제하는, 비만 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 상지 주정 추출물은, 페록시솜 증식자-활성화 수용체- γ (PPAR- γ), CCAAT/인핸서-결합단백질- α (C/EBP- α) 또는 스테롤 조절인자 결합단백질-1(SREBP-1)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 전사인자 발현을 억제하는, 비만 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 약학적 조성물인, 비만 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함하는, 비만 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 7] 상지(*Ramulus mori*) 주정 추출물을 유효성분으로 포함하는, 비만 예방 또는 치료용 식품 조성물.

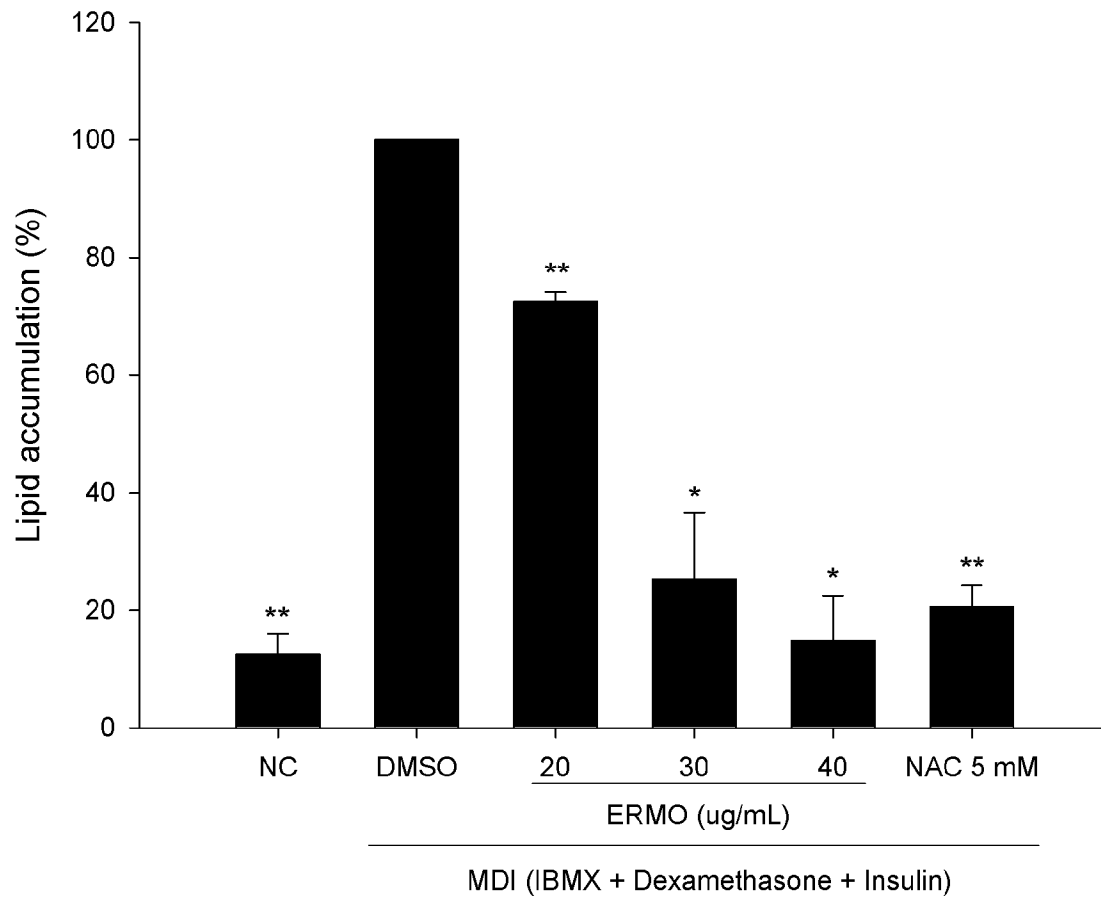
[도1]



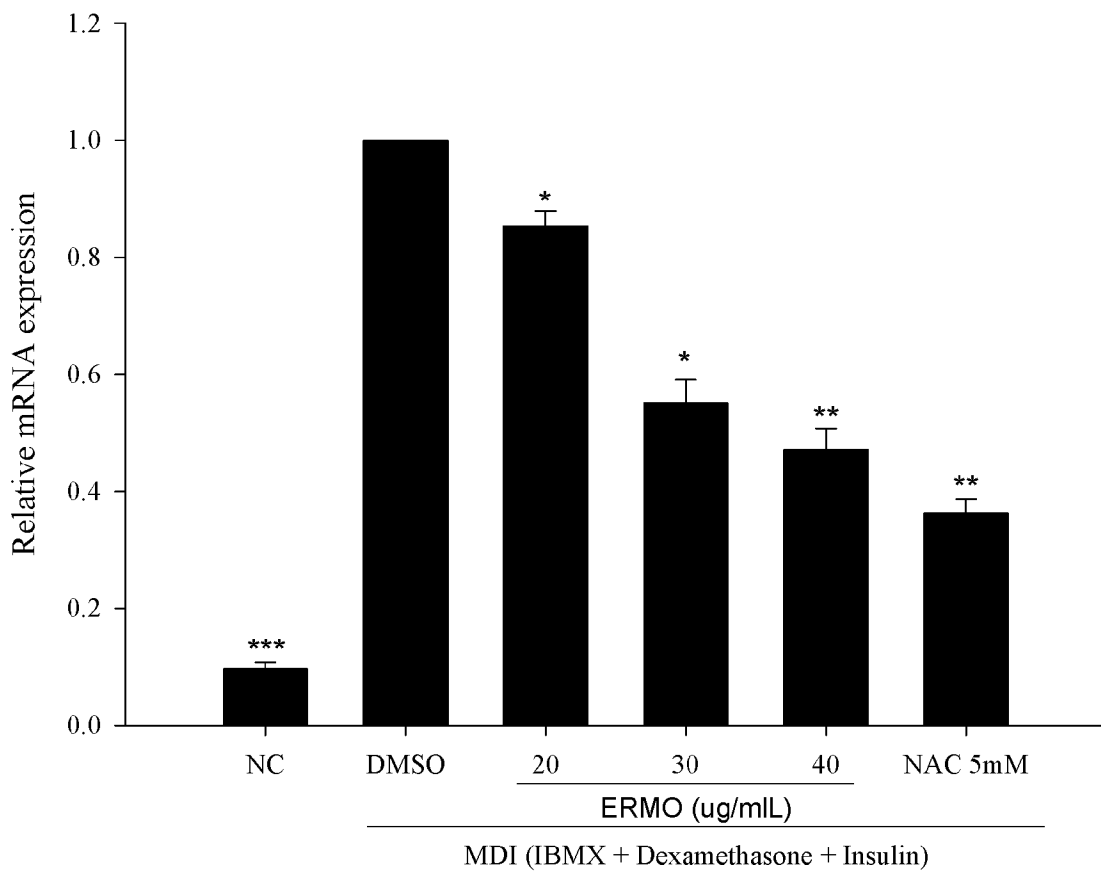
[도2]



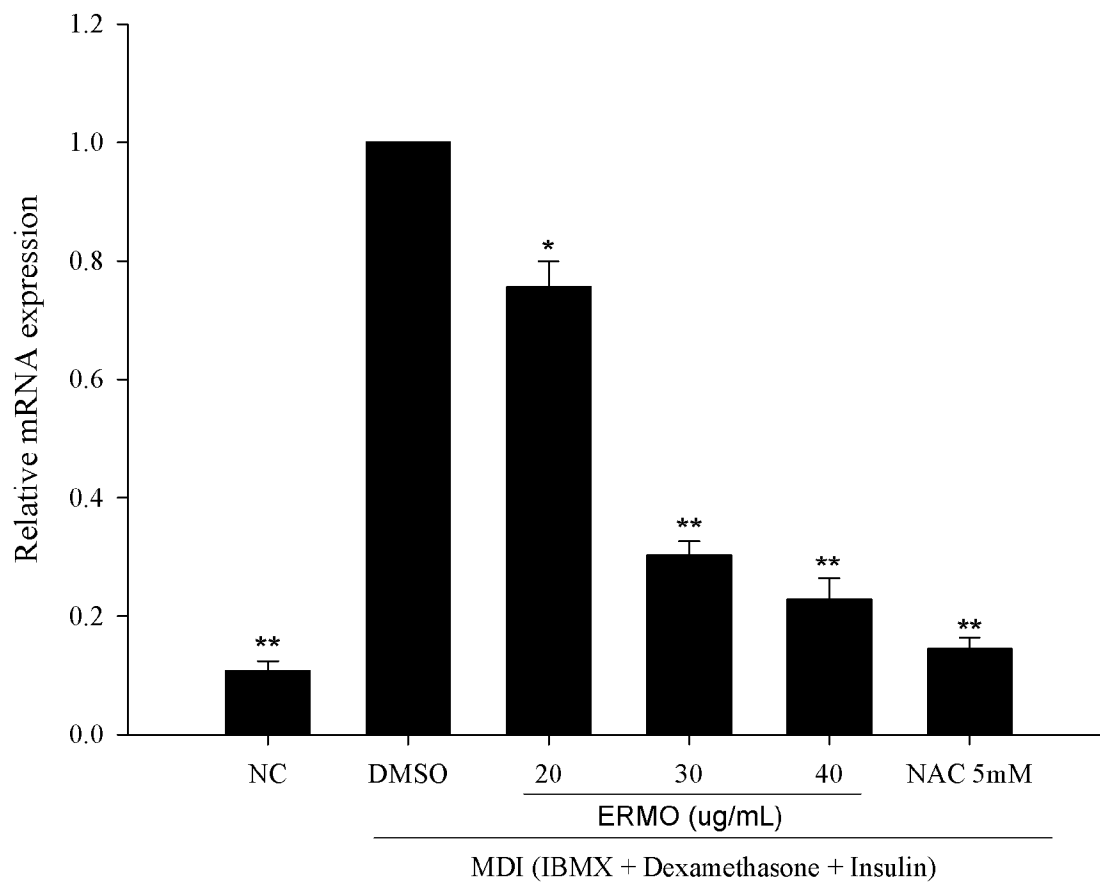
[도3]



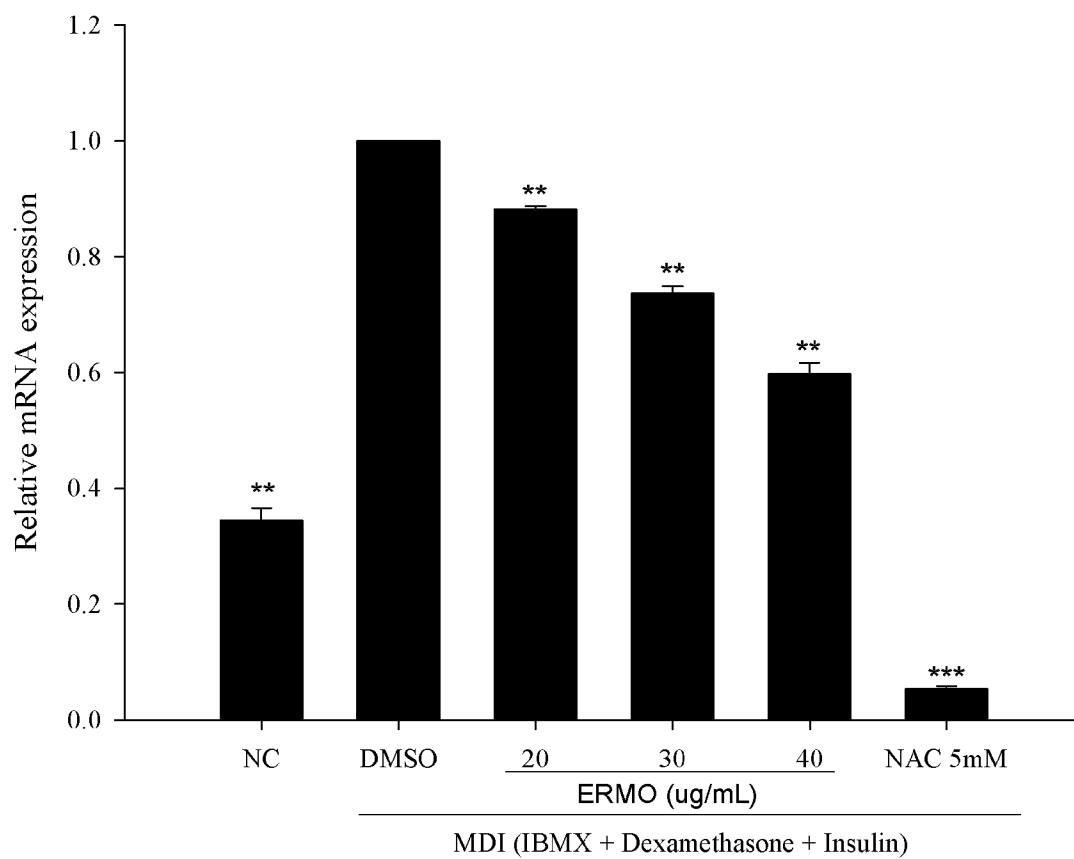
[도4a]



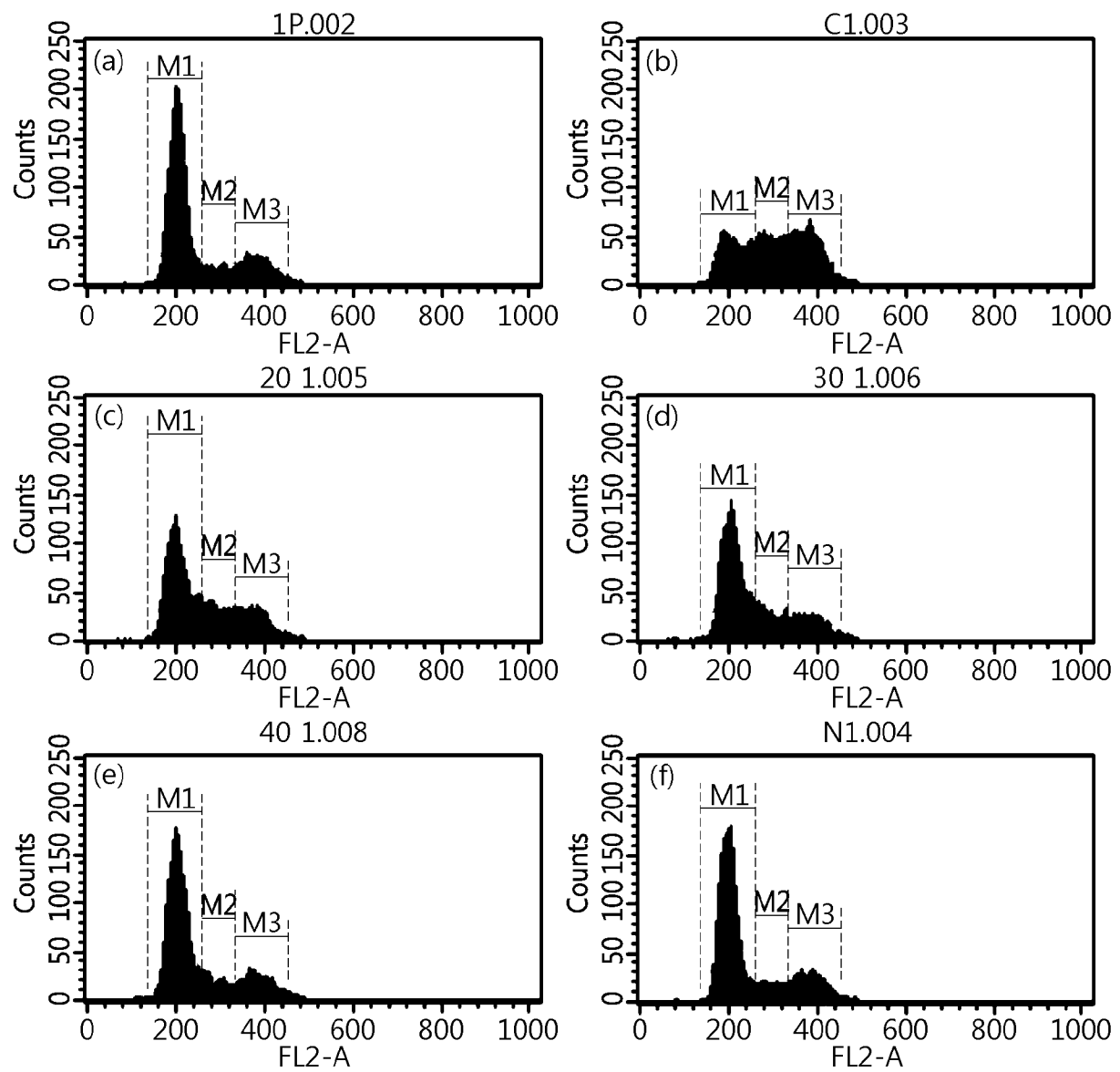
[도4b]



[도4c]

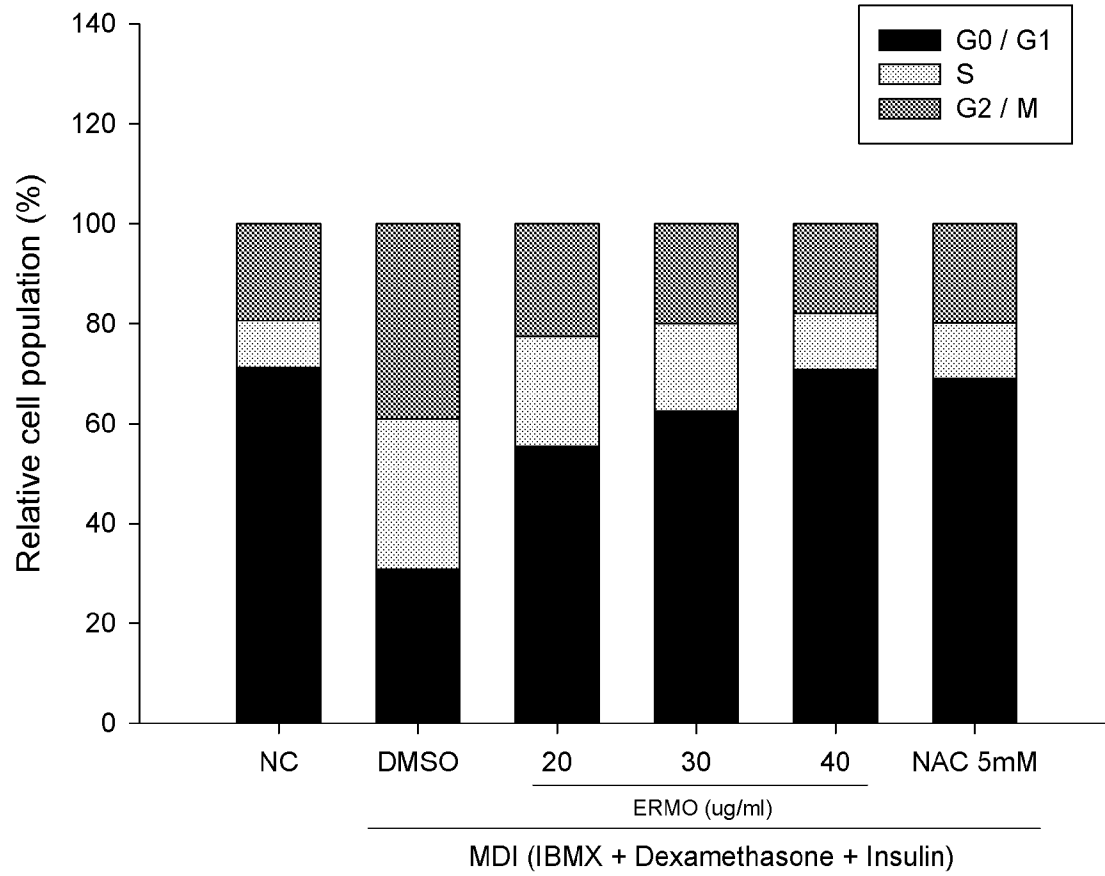


[도5a]



	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)
MDI	-	+	+	+	+	+
ERMO ($\mu\text{g/mL}$)	-	-	20	30	40	-
NAC (μM)	-	-	-	-	-	5

[도5b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/011501**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***A61K 36/605(2006.01)i, A23L 33/105(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 36/605; A61K 36/185; A23L 33/00; A61K 36/15; A61K 36/258; A23L 33/105

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: Ramulus mori ethanol extract, obesity prevention, treating composition

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM, Hyun-Soo et al., "Effects of Ramulus Mori Extract on Obesity and Lipid Metabolism in High Fat Diet Rats", Journal of Korean Medicine, December 2002, vol. 23, no. 4, pages 64-72 See page 65, Preparation of Ramulus Mori Extract; page 67, Effect of Weight Change; Discussion and Result.	1-7
A	PARK, Soo Yeon et al., "Postprandial Hypoglycemic Effects of Mulberry Twig and Root Bark in Vivo and in Vitro", Journal of Nutrition and Health, February 2016, vol. 49, no. 1, pages 18-27 See Introduction; page 19, Preparation of Test Material; Result and Discussion.	1-7
A	KR 10-0624488 B1 (JE IL PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 19 September 2006 See the entire document.	1-7
A	KR 10-0813187 B1 (NEXENTECH et al.) 20 March 2008 See the entire document.	1-7
A	KR 10-0237168 B1 (KOREA FOOD RESEARCH INSTITUTE) 15 January 2000 See the entire document.	1-7



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

24 JANUARY 2018 (24.01.2018)

Date of mailing of the international search report

24 JANUARY 2018 (24.01.2018)

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. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/011501

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-0624488 B1	19/09/2006	KR 10-2005-0078868 A	08/08/2005
KR 10-0813187 B1	20/03/2008	NONE	
KR 10-0237168 B1	15/01/2000	KR 10-1998-0085889 A	05/12/1998

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 36/605(2006.01)i, A23L 33/105(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 36/605; A61K 36/185; A23L 33/00; A61K 36/15; A61K 36/258; A23L 33/105

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: 상지 주정 추출물, 비만 예방, 치료용 조성물

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	김현수 등, '상지추출물이 고지방식이에 의한 체중 변화와 지질대사에 미치는 영향', 대한한의학회지, 2002.12, 제23권, 제4호, 페이지 64-72 페이지 65, 상지추출물의 조제; 페이지 67, 체중에 미치는 영향; 고찰 및 결론 참조.	1-7
A	박수연 등, 'In vivo와 in vitro에서 상지 및 상백피 에탄올 추출물이 식후 혈당 상승 억제 조절에 미치는 영향', Journal of Nutrition and Health, 2016.02, 제49권, 제1호, 페이지 18-27 서론; 페이지 19, 시험물질의 제조; 결과 및 고찰 참조.	1-7
A	KR 10-0624488 B1 (제일약품주식회사) 2006.09.19 전체 문헌 참조.	1-7
A	KR 10-0813187 B1 (주식회사 넥스엔텍 등) 2008.03.20 전체 문헌 참조.	1-7
A	KR 10-0237168 B1 (한국식품개발연구원) 2000.01.15 전체 문헌 참조.	1-7

☐ 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

2018년 01월 24일 (24.01.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 01월 24일 (24.01.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



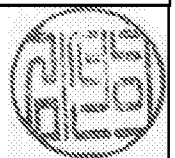
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김선희

전화번호 +82-42-481-5405



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-0624488 B1	2006/09/19	KR 10-2005-0078868 A	2005/08/08
KR 10-0813187 B1	2008/03/20	없음	
KR 10-0237168 B1	2000/01/15	KR 10-1998-0085889 A	1998/12/05