(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015 년 2 월 12 일 (12.02.2015)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2015/020489 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 36/82 (2006.01) *A61P 3/00* (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2014/007401

(22) 국제출원일: 2014 년 8 월 8 일 (08.08.2014)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2013-0094999 2013 년 8 월 9 일 (09.08.2013) KR

(71) 출원인: **전남대학교 산학협력단 (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY)** [KR/KR]; 500-757 광주시 북구 용봉로 77, Gwangju (KR).

(72) 발명자: **김종덕 (KIM, Jong Deog)**; 550-774 전라남도 여수시 여서 2 로 20, 6 동 1102 호, Jeollanam-do (KR).

(74) 대리인: **이원희 (LEE, Won Hee)**; 135-910 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2 차 8 층, Seoul (KR).

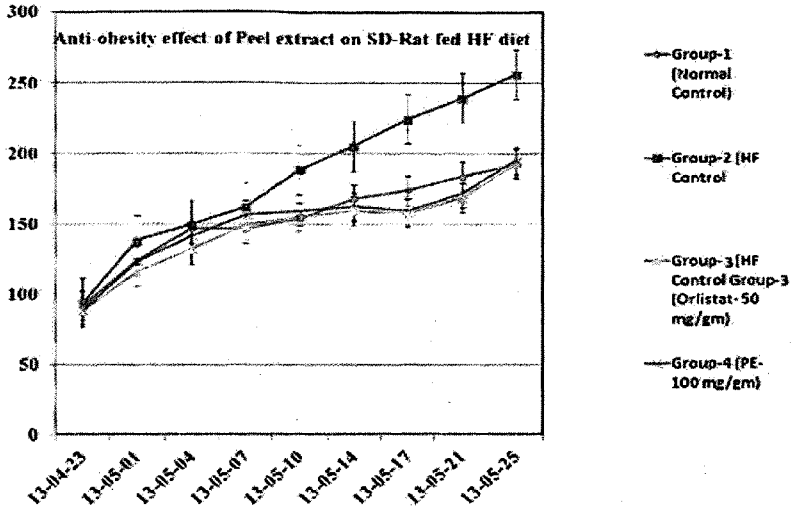
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) **Title**: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING AND TREATING OBESITY, CONTAINING GREEN-TEA SEED HUSK EXTRACT AS ACTIVE INGREDIENT

(54) **발명의 명칭** : 녹차씨앗 과피 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물



(57) **Abstract**: The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing and treating obesity, the composition containing green-tea (*Camellia sinensis* L.) seed husk extract or a fraction thereof as an active ingredient. The green-tea seed husk extract exhibits a significant vasculogenesis suppressing effect and has been confirmed to be effective in reducing adipocytes and body weight, and thus the green-tea seed husk extract can advantageously be used as an active ingredient in a composition for preventing and treating obesity, a health food for preventing and alleviating obesity, or a pharmaceutical composition for vasculogenesis suppression.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2015/020489 A1

본 발명은 녹차(Camellia sinensis L.)씨앗과피 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 상기 녹차씨앗 과피 추출물은 유의적으로 혈관신생억제 효과를 나타내고, 지방세포 및 체중감소 효과를 확인함으로써 상기 녹차씨앗 과피 추출물은 비만 예방 및 치료용 조성물, 비만 예방 및 개선용 건강 식품, 또는 신생혈관억제용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

녹차씨앗 과피 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물

【기술분야】

본 발명은 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물 및 건강식품에 관한 것이다.

【배경기술】

전 세계적으로 비만 인구가 꾸준히 증가하고 있으며, 우리나라의 비만 인구는 32.7%이며 미국의 경우 2000년 현재 성인 인구의 약 65%가 과체중에 해당되고 있다. WHO 보고에 의하면 향후 10년 동안 비만 인구가 지금보다 50% 증가할 것으로 예측하고 있다.

비만은 음식물로 섭취한 에너지와 신체활동으로 소비한 에너지 간의 불균형에 의하여 과잉의 에너지가 체지방으로 축적되는 현상이다. 일반적으로 비만은 체내에 지방 조직이 과다한 상태를 의미하며, 이러한 비만 상태가 오랜 시간에 걸쳐 지속되면 당뇨병, 고지혈증, 심장병, 뇌졸증, 동맥경화증, 지방간 등의 각종 대사성질환과 성인병이 유발된다. 최근 과다한 열량 섭취와 운동 부족으로 인하여 서구 선진국뿐만 아니라 우리나라에서도 비만인구가 급증하고 있으며 이는 심각한 사회문제로 대두 되고 있다.

비만은 과잉의 에너지 공급이 지방세포 크기와 수의 증가를 유발하여 체내 지방으로 축적되는 것이 주된 발생원인으로 알려져 있으며, 이 외에도 유전적 요인, 서구화된 식생활에 의한 환경적 요인, 심리적 요인, 에너지 대사 이상 등 다양한 원인이 작용한다고 알려져 있다.

전 세계적으로 비만 치료제의 개발을 위한 다각적인 측면의 연구가

진행되고 있다. 비만치료용 약물은 크게 지방흡수 억제, 지방 분해 및 열 발생 촉진, 식욕 및 포만감의 조절, 단백질 대사 저해 그리고 음식물의 섭취와 관련된 정서 조절 기전으로 나눌 수 있다. 대표적인 비만 치료제로는 oristat을 원료로 하여 지방흡수를 억제하는 제니칼™(Xenical™)과 시부트라민(sibutramine)을 주원료로 교감신경계를 자극하여 식욕을 억제시키는 리덕틸™(Reductil™)이 있다. 그러나 제니칼™의 경우 지방변, 복부통증, 구토, 가려움증, 간 손상 등의 부작용이 보고되어 있으며, 리덕틸™의 경우는 두통, 식욕부진, 불면, 변비 등의 부작용뿐만 아니라 심각한 심혈관계 부작용을 일으킨다는 이유로 최근 사용 기준이 강화되는 등의 논란이 일고 있다. 이러한 비만치료제를 통한 약물요법 이외에도 비만을 예방하고 치료하기 위한 방법으로 음식물의 섭취를 제한하는 식이요법, 에너지 소비를 증가시키는 운동요법이 있으며, 정신요법, 행동요법, 외과요법 등도 실시되고 있다.

바람직한 비만의 치료 방법으로는 운동을 통한 에너지 소비 촉진과 부작용이 적은 비만치료용 약제를 병행하는 것이 가장 안전하고 효과적인 방법으로 제시되고 있다. 그러나 비만치료용 약제의 경우, 상기의 제니칼™과 리덕틸™의 예처럼 심각한 부작용들이 보고되고 있으며 안전성에 대한 명확한 신뢰가 뒷받침 되지않고 있는 실정이다.

한편, 혈관신생의 형성은 현재까지 20가지 이상의 혈관형성 촉진인자에 의해 촉진되는 것으로 알려졌으며, 그 중 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 많은 종류의 종양세포 및 비만세포에서 분비되며, 동시에 가장 강력한 혈관형성 촉진인자로 알려져 있다. 또한, VEGF는 혈관투과인자(vascular permeability factor)로도 알려져 있으며, 그의 수용체인 VEGFR-1(Flt-1), VEGFR-2(Flk-1/KDR)와 결합하여 내피세포의 증식을 유발하고 혈관 투과성을 증가시켜 종양 및 비만세포의 성장과 전이에 관여하는

것으로 알려져 있다(Leung, D. W., G. Cachianes, W. J. Kuang, D. V. Goeddel and N. Ferrara (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 246:1306-1309; Ferrara, N, T. Davis-Smyth(1997) The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr. Rev. 18:4-25; Liping Liu, Mohsen Meydani(2003)Angiogenesis Inhibitors May Regulate Adiposity, Nutrition Review, 61(11),384-387; Jaap G.Neels, Terri Thinnes, and David J.Loskutoff(2004) Angiogenesis in an in vivo model of adipose tissue development, The FASEB Journal express article 10.1096/fj.03-1101fje.Published online April 14, 2004; G.J. Hausman and R.L. Tichardson(2004)Adipose tissue angiogenesis,J.anim.Sci, 82,925-934).

따라서, 인체에 대해서 비만의 우수한 효능을 나타내면서도 100 % 안전성이 보장되는 천연물 및 소재에 대한 개발이 요구되고 있다.

이에, 본 발명자들은 항비만 활성을 갖는 천연물을 개발하기 위해 노력한 결과, 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물이 유의적인 혈관신생 억제 효과를 나타내고, 지방세포 및 체중 감소 효과를 나타냄으로써, 상기 녹차씨앗 과피 추출물을 비만 예방 및 치료용 조성물에 유용하게 사용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 개선용 건강식품을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 신생혈관억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 유효한 양의 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물을 비만에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 비만 치료 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 유효한 양의 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 비만 예방 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물의 제조에 사용하기 위한 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물의 용도를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 비만 예방 및 개선용 건강 식품의 제조에 사용하기 위한 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물의 용도를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 유효한 양의 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신생혈관형성 억제 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 신생혈관형성 억제용 조성물의 제조에 사용하기 위한 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물의 용도를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 신행혈관형성 억제 및 개선용 건강식품의 제조에 사용하기 위한 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물의 용도를 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

또한, 본 발명은 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 신생혈관억제용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 유효한 양의 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물을 비만에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 비만 치료 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 유효한 양의 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 비만 예방 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물의 제조에 사용하기 위한 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물의 용도를 제공한다.

또한, 본 발명은 비만 예방 및 개선용 건강 식품의 제조에 사용하기 위한 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물의 용도를 제공한다.

또한, 본 발명은 유효한 양의 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신생혈관형성 억제 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 신생혈관형성 억제용 조성물의 제조에 사용하기 위한 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물의 용도를 제공한다.

아울러, 본 발명은 신행혈관형성 억제 및 개선용 건강식품의 제조에 사용하기 위한 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물의 용도를 제공한다.

【유리한 효과】

본 발명은 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물 및 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 상기 녹차씨앗 과피 추출물은 항산화 효능 및 혈관신생 억제 효능을 나타내고, 지방세포 억제 및 지방생성에 관여하는 SREBP-1분자, 및 지질합성에 관여하는 PRARr 및 C/EBPα의 발현을 모두 억제함으로써 유의적인 체중 감소 및 항비만 효과를 나타내므로, 상기 녹차씨앗 과피 추출물을 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물, 비만 예방 및 개선용 건강식품, 또는 신생혈관억제용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물 및 이의 분획물의 제조 방법을 나타낸 도이다.

도 2는 차사포닌 추출방법 중 조사포닌(crude saponin)의 추출과정을 나타낸 도이다.

도 3은 차사포닌 추출방법 중 사포닌(Saponin)의 추출과정을 나타낸 도이다.

도 4는 차사포닌 추출 방법의 결과로 추출된 사포닌에 대한 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography) 결과를 나타낸 도이다:

S: 사포닌 표준품;

A: 초음파 분쇄 처리군; 및

B: 초음파 분쇄 미처리군.

도 5는 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물의 세포독성을 확인한 도이다:

Peel: 녹차씨앗 과피.

도 6은 녹차씨앗 과피 유래 사포닌의 세포독성을 확인한 도이다:

Peel Saponin: 녹차씨앗 과피 유래 사포닌.

도 7은 녹차씨앗 과피 추출물 및 녹차씨앗 과피 유래 사포닌의 항산화 효과를 확인한 도이다:

Peel: 녹차씨앗 과피; 및

Peel Saponin: 녹차씨앗 과피 유래 사포닌.

도 8은 녹차씨앗 과피 추출물의 혈관신생형성 억제 효과를 확인한 도이다:

Peel: 녹차씨앗 과피.

도 9는 녹차씨앗 과피 유래 사포닌의 혈관신생형성 억제 효과를 확인한 도이다:

Peel Saponin: 녹차씨앗 과피 유래 사포닌.

도 10은 녹차씨앗 과피 추출물의 세포 부착 억제 효과를 확인한 도이다.

도 11은 녹차씨앗 과피 추출물의 지방세포 억제 효과를 확인한 도이다:

Peel: 녹차씨앗 과피.

도 12는 녹차씨앗 과피 유래 사포닌의 지방세포 억제 효과를 확인한 도이다:

Peel Saponin: 녹차씨앗 과피 유래 사포닌.

도 13은 녹차씨앗 과피 추출물의 혈관신생 억제 기전을 확인한 도이다:

Peel: 녹차씨앗 과피.

도 14는 녹차씨앗 과피 유래 사포닌의 혈관신생 억제 기전을 확인한 도이다:

Peel Saponin: 녹차씨앗 과피 유래 사포닌.

도 15는 혈관신생 억제 기전을 나타낸 도이다.

도 16은 녹차씨앗 과피 추출물 및 녹차씨앗 과피 유래 사포닌의 비만 억제 기전을 확인한 도이다:

Peel: 녹차씨앗 과피; 및

Peel Saponin: 녹차씨앗 과피 유래 사포닌.

도 17은 녹차씨앗 과피 추출물의 체중감소 효과를 확인한 도이다:

Peel: 녹차씨앗 과피;

Group 1: 정상 식이 섭취 군;

Group 2: 고지방 식이 섭취 군;

Group 3: 고지방 식이 섭취 + 올리스타트(Orlistat) 섭취군; 및

Group 4: 고지방 식이 섭취 + 녹차씨앗 과피 추출물 섭취 군.

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 유효한 양의 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물을 비만에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 비만 치료 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 유효한 양의 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 비만 예방 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물의 제조에 사용하기 위한 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물의 용도를 제공한다.

상기 녹차씨앗 과피 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

1) 녹차씨앗 과피에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및

3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압농축한 후 건조하는 단계.

상기 방법에 있어서, 단계 1)의 녹차씨앗 과피는 재배한 것 또는 시판되는 녹차씨앗에서 분리되는 것이 바람직 하나 이에 한정되지 않는다.

상기 방법에 있어서, 단계 1)의 상기 추출용매는 물, C_1 내지 C_2의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출한 것을 특징으로 하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 방법에 있어서, 단계 1)의 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 추출 방법으로는 냉침 추출, 가열 추출, 초음파 추출 또는 환류 냉각 추출을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무 건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

상기 분획물은 녹차씨앗 과피 추출물을 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나로 추가적으로 또한 순차적으로 추출하여 수득 된 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

상기 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물은 신생혈관 억제활성을 통해 항비만 활성을 갖는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 녹차씨앗 과피 추출물을 제조하고, 상기 추출물로부터 분획물을 제조하였다(도 1 참조).

또한, 본 발명자들은 상기 녹차씨앗 과피 추출물로부터 사포닌을 추출하였다(도 2 내지 4 참조).

또한, 녹차씨앗 과피 추출물의 세포 독성을 확인하기 위해, 상기 추출물을 사람태반세포(HUVECs)에 처리하여 플레이트 리더(plate reader)로 흡광도를 측정한 결과, 상기 추출물은 세포 독성이 나타나지 않음을 확인하였다(도 5 참조).

또한, 녹차씨앗 과피 유래 사포닌의 세포 독성을 확인하기 위해, 상기 녹차씨앗 과피 유래 사포닌을 사람태반세포(HUVECs)에 처리하여 플레이트 리더(plate reader)로 흡광도를 측정한 결과, 녹차씨앗 과피 유래 사포닌은 세포 독성이 나타나지 않음을 확인하였다(도 6 참조).

또한, 녹차씨앗 과피 추출물의 항산화 효과를 확인하기 위해, Benzie와 Strain의 방법으로 FRAP(ferric reducing ability assay of plasma) 측정을 한 결과, 녹차씨앗과피 추출물 및 녹차씨앗 과피 유래 사포닌은 강한 항산화력을 가진 EGCG와 유사한 항산화 효과를 확인하였다(도 7 참조).

또한, 녹차씨앗 과피 추출물의 혈관신생(angiogenesis) 억제 효과를 확인하기 위해, 상기 추출물을 사람태반세포(HUVECs)에 처리한 결과, 녹차씨앗 과피 추출물은 농도의존적으로 혈관신생을 억제 하는 것을 확인하였다(도 8 참조).

또한, 녹차씨앗 과피 유래 사포닌의 혈관신생 억제 효과를 확인하기 위해, 상기 녹차씨앗 과피 유래 사포닌을 사람태반세포(HUVECs)에 처리한 결과, 녹차씨앗 과피 유래 사포닌은 농도의존적으로 혈관신생을 억제 하는 것을 확인하였다(도 9 참조).

또한, 녹차씨앗 과피 추출물의 세포부착 억제효과를 확인하기 위해, 상기

녹차씨앗 과피 추출물을U937 인간 단핵구 세포주(American Type Culture Collection, Rockville, MD)에 농도의존적으로 처리하여 불규칙적으로 5면을 선택하여 디지털 카메라(Nikon, Coolpix)로 촬영하여 이미지를 수득하고, NIH 이미지 프로그램으로 실제의 세포를 측정한 후 5면의 세포를 합하여 부착된 세포의 수를 확인한 결과, 상기 녹차씨앗 과피 추출물은 세포부착 억제 효과가 높은 것을 확인하였다(도 10 참조).

또한, 녹차씨앗 과피 추출물의 지방세포 저해효과를 확인하기 위하여, 상기 녹차씨앗 과피 추출물을 3T3-L1 아지방세포(preadipocyte)에 농도의존적으로 처리하여 Oil-red 및 반응용액(working solution)으로 염색한 후, 염색된 세포내 지방질을 현미경하에서 관찰한 결과, 상기 추출물은 농도의존적으로 지방세포를 감소 시키는 것을 확인하였다(도 11 참조).

또한, 녹차씨앗 과피 유래 사포닌의 지방세포 저해효과를 확인하기 위해, 상기 녹차씨앗 과피 유래 사포닌을 3T3-L1 아지방세포(preadipocyte)에 농도의존적으로 처리하여 Oil-red 및 반응용액(working solution)으로 염색한 후, 염색된 세포내 지방질을 현미경하에서 관찰한 결과, 상기 녹차씨앗 과피 유래 사포닌은 농도의존적으로 지방세포를 감소시키는 것을 확인하였다(도 12 참조).

또한, 녹차씨앗 과피 추출물의 신생혈관억제 기전을 파악하기 위하여, 상기 추출물을 사람태반세포(HUVECs)에 처리하고 PCR을 사용하여 유전자의 발현을 확인한 결과, 상기 추출물을 처리에 의해 신호전달 분자, 즉 베타카테닌(β-catenin), VE-캐터린(vascular epithelium-cadherin), 수용체-2(VEGFR-2), PI3키나제(PI3Kinase), 엔에프-카파비(NF-κB); 및 하위 그룹인 Akt(Protein kinase B)의 저해 효과를 나타내는 것을 확인하였다(도 13 참조).

또한, 녹차씨앗 과피 유래 사포닌의 신생혈관억제 기전을 파악하기 위하여, 상기 녹차씨앗 과피 유래 사포닌을 사람태반세포(HUVECs)에 처리하고 PCR을 사용하여 유전자의 발현을 확인한 결과, 상기 추출물을 처리에 의해

신호전달 분자, 즉 베타카테닌(β-catenin), VE-캐터린(vascular epithelium-cadherin), 수용체-2(VEGFR-2), PI3키나제(PI3Kinase), 엔에프-카파비(NF-κB); 및 하위 그룹인 Akt(Protein kinase B)의 저해 효과를 나타내는 것을 확인하였다(도 14 참조).

또한, 녹차씨앗 과피 추출물 및 녹차씨앗 과피 유래 사포닌의 지방생성(adipogenesis) 및 지질합성(lipogenesis)의 작용기전의 파악을 위하여 3T3-L1 아지방세포(preadipocyte)세포에 처리하고 PCR을 사용하여 유전자의 발현을 확인한 결과, 본 발명의 녹차씨앗 과피 추출물 및 녹차씨앗 과피 유래 사포닌은 지방생성에 관여하는 SREBP-1분자, 및 지질합성에 관여하는 PRARr 및 C/EBPα의 발현을 모두 억제하는것을 확인하였다(도 16 참조).

또한, 녹차씨앗 과피 추출물의 체중감소 효과를 확인하기 위하여, 스프래그-돌리(Sprague-Dawley; TACONIC(독일)) 계열의 쥐에 고지방식이와 녹차씨앗 과피 추출물을 함께 경구 투여한 결과, 고지방 식이 단독 투여군과 비교하여 현저한 체중감소 효과를 나타냄을 확인하였다(도 17 참조).

또한, 녹차씨앗 과피 추출물의 체중감소 효과를 확인하기 위하여, 스프래그-돌리(Sprague-Dawley; TACONIC(독일)) 계열의 쥐에 고지방식이 단독 및 고지방식이와 녹차씨앗 추출물(비교군 1), 녹차씨앗의 외피와 내피를 분리하지 않고 녹차씨앗 추출물(비교군 2), 상기 녹차씨앗 과피 추출물을 함께 경구 투여한 군을 비교한 결과, 고지방식이와 상기 본 발명의 녹차씨앗 과피 추출물을 함께 투여한 군은, 고지방 식이 단독 투여군, 비교군 1 및 비교군 2와 비교하여 현저한 체중감소 효과를 나타냄을 확인하였다(표 3 참조).

따라서, 본 발명의 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물은 유의적으로 혈관신생억제 효과를 나타내고, 지방세포 및 체중감소 효과를 나타냄으로써, 상기 녹차씨앗 과피 추출물은 비만 예방 및 치료용 조성물에 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 신생혈관억제용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 유효한 양의 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신생혈관형성 억제 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 신생혈관형성 억제용 조성물의 제조에 사용하기 위한 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물의 용도를 제공한다.

본 발명의 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물은 유의적으로 혈관신생억제 효과를 나타내므로, 상기 녹차씨앗 과피 추출물은 혈관신생 억제용 조성물에 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명의 녹차씨앗 과피 추출물을 함유하는 조성물은 상기 성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

즉, 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 담배풀 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate),

수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

구체적으로, 본 발명에 따른 화합물의 유효량은 환자의 나이, 성별,

체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.1 mg 내지 100 mg, 바람직하게는 0.5 mg 내지 10 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

또한, 본 발명은 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

또한, 본 발명은 비만 예방 및 개선용 건강 식품의 제조에 사용하기 위한 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물의 용도를 제공한다.

또한, 본 발명은 신행혈관형성 억제 및 개선용 건강식품의 제조에 사용하기 위한 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물의 용도를 제공한다.

상기 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물은 비만예방, 개선 활성을 가지는 것이 바람직하나 한정하지 않는다.

상기 녹차씨앗 과피 추출물은 신생혈관 억제활성을 갖는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물은 유의적으로 지방세포 및 체중 감소 효과를 나타내므로, 상기 녹차씨앗 과피 추출물은 비만 예방 및 개선용 건강식품 조성물에 유용하게 사용될 수 있다.

상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 과자류, 빵류, 면류 등과 같은 각종 식품류, 물, 청량음료, 과실음료 등의 드링크류, 껌, 차, 비타민 복합제, 조미료류, 건강기능 식품류 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

본 발명의 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용

목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 5 중량%로 가할 수 있으며 건강음료 조성물에는 100 을 기준으로 0.01 내지 5.0 g, 바람직하게는 0.01 내지 1.0 g의 비율로 첨가할 수 있다. 그러나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어, 말토스, 수크로즈 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어, 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리스리톨 등의 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마킨, 스테비아 추출물 등), 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탄 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 당 일반적으로 약 0.1 내지 2.0 g, 바람직하게는 약 0.1 내지 1.0 g이다.

본 발명의 건강기능식품은 기재로 되는 식품의 제조공정 중에 상술한 본 발명의 추출물 또는 화합물을 첨가하는 공정을 가함으로써 또는 기재로 되는 식품의 제조 후에 상술한 본 발명의 추출물 또는 화합물을 첨가하는 공정을 가함으로써 용이하게 얻을 수 있다. 이때 필요에 따라 맛과 냄새 교정제를 첨가하여도 좋다.

상기 외에 본 발명의 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린,

알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 녹차씨앗 과피 추출물 또는 이의 분획물 100 중량부 당 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물의 제조

전남, 순천시에서 녹차씨앗을 구입한 후, 과피를 분리한 다음, 상기 과피를 깨끗하게 세척한 후, 50℃의 온도에서 3일간 열풍 건조한 후, 40 메쉬로 분말화 하였다. 그런 다음, 상기 녹차씨앗 과피 분말에 70% 에탄올을 가한 후, 상온에서 순환시키후, 추출용액을 여과한 다음, 농축하고 동결건조하여 녹차씨앗 과피 추출물을 25g 제조하였다.

<실시예 2> 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 용매 분획물 제조

상기 <실시예 1>에서 얻어진 녹차씨앗 과피 추출물 중 4 g 에 물 50 ㎖을 첨가하여 현탁시키고, 동량의 100% 헥산을 가하여 진탕 방치하기를 3회 실시하여 헥산 분획물 363.5 mg을 수득하였다. 그런 다음, 상기 헥산 분획물을 제거하고 남은 물층에 클로로포름을 동량 가하여 진탕 방치하기를 3회 반복하여 클로로포름 분획물 195.9 mg을 수득하였으며, 다시 남은 물층에 에틸아세테이트를 동량 가하여 같은 방법으로 에틸아세테이트 분획물 97.8 mg을 수득하였으며, 또 다시 남은 물층에 부탄올을 동량 가하여 동일한 방법으로 부탄올 분획물 199.9 mg을 수득하였으며, 남은 물층을 농축하여 물

분획물 130.3 mg을 수득하였다(도 1).

<실시예 3> 녹차씨앗 과피 추출물로부터 사포닌 추출

<3-1> 활성 4-브로모프탈 무수물 준비

녹차씨앗 과피 추출물로부터 사포닌을 추출하기 위하여, 200 g의 4-브로모프탈 무수물(4-bromophthalic anhydride)을 1L의 비이커에 넣고 충분히 침지될 수 있도록 에탄올을 넣은 후 2시간 동안 활성화시켰다. 그런 다음, 여과하여 에탄올을 제거하되 탁도가 없어 질 때까지 계속 에탄올을 사용하여 세척하면서 여과하였다. 여과된 4-브로모프탈 무수물을 증류수가 충분히 침지시킨 후 에탄올을 제거하기 위하여 진공 여과하였다.

<3-2> 조사포닌의 추출

상기 실시예<3-1>에서 준비된 진공여과된 4-브로모프탈 무수물을 500 ml의 비이커에 넣고 <실시예 1>에서 수득한 여액(녹차씨앗 과피추출물) 200 mL을 넣은 후 실온에서 1시간 반응시켰다. 이어, 4-브로모프탈 무수물과 반응시킨 녹차씨앗 과피추출물을 칼럼에 충진하고, 10 시간동안(overnight) 반응시켰다. 조사포닌(crude saponin)을 추출하기 위하여 0.3-0.5%의 NaOH 수용액을 칼럼에 처리하였다(도 2). 이 때 칼럼 내에서는 사포닌과 NaOH가 반응하여 황색 액체(yellow liquid)가 형성되는데, 상기 황색 액체가 바로 조사포닌 분획이다.

<3-3> 사포닌의 추출

상기 실시예<3-2>에서 수득한 조사포닌을 염산 수용액으로 중화(pH 7.0)한 후, 다시 활성화된 4-브로모프탈 무수물과 배치(batch) 반응시킨 후, 칼럼에 충진하고 10시간(overnight)동안 반응시켰다. 그런 다음, 70-95%의 에탄올 수용액으로 추출하였다. 이 때에는 추출액이 흰색 침전(white precipitate)이 형성되는데 이것이 바로 녹차씨앗 과피추출물의 사포닌이다(도 3).

<3-4> 녹차씨앗 사포닌 확인

상기 실시예<3-3>에서 추출된 사포닌이 실제 사포닌이 맞는지 확인하기 위해, n-부탄올:아세트산:물 = 4:1:5의 용액을 전개액으로 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography)를 실시하여 사포닌 표준품(TEA saponin E1, 일본 채소차과학연구소)과 비교하여 확인하였다. 그 결과, 도 4에서 나타난 바와 같이, 초음파 분쇄 처리군과 초음판 분쇄 미처리군 모두 표준품과 동일한 위치에서 밴드가 검출되어, 사포닌이 제대로 추출됨을 확인하였다(도 4).

<실험예 1> 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물의 세포 독성 확인

사람태반세포(HUVECs)는 Young Science(한국)으로 부터 구입하여 3-5세대의 것을 사용했으며, HUVECs은 하이드로코르티손(Hydrocortisone), 상피세포성장인자(Epidermal growth factor(EGF)), 염기성 섬유아세포 성장인자(basic fibroblast growth factor(bFGF)), 인슐린 유사 성장인자(insulin-like growth factor 1(IGF-1)), 혈관 내피 성장인자(vascular endothelial growth factor(VEGF)), 아스코르브산(ascorbic acid) 및 헤파린(heparin) 등을 함유하는 EBM-2 배지(Clonetics, 미국)에 2% FBS(fetal bovine serum)를 첨가하고 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 그런 다음, 상기 세포는 2% gelatin(Sigma, 미국)으로 코팅(coating)한 플라스크(flasks) 및 플레이트(plates)에서 포화(confluence) 될 때까지 배양하였다. 이후, 상기 HUVECs를 96웰 프레이트(well plate)에 4×10^4씩 분주한 다음, 24시간 배양한 후, 상기 <실시예 1> 제조한 녹차씨앗과피 추출물 5, 10, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 150 및 200 ㎍ 및 <실시예 3>에서 정제한 녹차과피 유래 사포닌 1.0, 2.5, 5, 10, 15 및 25 ㎍을 농도별로 첨가한 후 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 48시간 동안 배양하였다. 이후, 상기 배양액의 배지를 버리고 0.5% MTT용액 20㎕를 첨가한 후, 추가로 4시간 배양시킨 후 배지를 제거하였고 DMSO를 각 웰당 40㎕씩

분주하고 540 nm에서 플레이트 리더(plate reader)로 흡광도를 측정하였다.

그 결과, 도 5 및 도 6에서 나타난 바와 같이, 녹차씨앗과피 추출물은 100 μg, 녹차과피 유래 사포닌은 10.0 μg에서도 세포독성이 나타나지 않음을 확인하였다(도 5 및 도 6).

<실험예 2> 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물의 항산화 효과 확인

녹차씨앗 과피 추출물의 항산화 효과를 확인하기 위하여, Benzie와 Strain의 방법(Benzie IFF & Strain JJ, Analytical Biochemistry, 239, 70-76, 1996)으로 FRAP(ferric reducing ability assay of plasma) 측정을 수행하였다.

구체적으로, 300 mM 아세테이트 완충용액(acetate buffer, pH 3.6), 40 mM 염산(HCl)에 용해한 10 mM TPTZ(2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine) 및 20 mM ferric chloride를 각각 10:1:1(v/v/v)의 비율로 혼합하여 FRAP 시약을 제조하였다. 그런 다음, 상기 <실시예 1>에서 제조한 녹차씨앗과피 추출물 또는 <실시예 3>에서 정제한 녹차씨앗과피 유래 사포닌을 1 mg 내지 5 mg이 되도록 희석한 시료액 0.15 mL과 3 mL의 FRAP 시약을 혼합하고, 37℃에서 5분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 강한 항산화력을 가진다고 알려진 EGCG(epigallocatechin-3-gallate)를 표준물질로 하여 시료 1mg 중에 들어있는 $FeSO_4$ 양(mM FeSO4 eq./mg extract)으로 표시하였다.

그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 본 발명의 녹차씨앗과피 추출물 및 녹차씨앗 과피 유래 사포닌은 강한 항산화력을 가진 EGCG와 유사한 항산화 효과를 나타냄을 확인하였다(도 7).

<실험예 3> 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물의 혈관신생(angiogenesis) 억제 효과 확인

녹차씨앗 과피 추출물의 혈관신생(angiogenesis) 억제 효과를 확인하기 위하여, 24웰 배양 플레이트(well culture plate)에 트립신-EDTA를 사용하여 웰로부터 분리한 2.5×10^4 개/웰의 사람태반세포(HUVECs)를 분주한 후, 상기

<실시예 1>에서 제조한 녹차씨앗과피 추출물 또는 <실시예 3>에서 정제한 녹차씨앗과피 유래 사포닌을 농도별로 투여한 후, 37℃, 5% CO_2 의 조건에서 4시간 동안 배양하였다. 이후, 형성된 튜브(tube) 망이 형성되면, 불규칙적으로 5면을 선택하여 디지털 카메라(Coolpix; Nikon, 일본)로 촬영하여 이미지를 수득하였고, NIH 이미지 프로그램으로 튜브 길이를 측정하였다.

그 결과, 도 8 및 도 9에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 녹차씨앗과피 추출물 및 녹차씨앗과피 유래 사포닌은 농도의존적으로 유의적인 혈관신생형성 억제효과를 나타냄을 확인하였다(도 8 및 도 9).

<실험예 4> 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물의 세포부착 억제효과 확인

녹차씨앗 과피 추출물의 세포부착 억제효과 확인를 확인하기 위하여, U937 인간 단핵구 세포주(American Type Culture Collection, Rockville, MD)는 2 mM L-글루타민(Life Technologies), 10 mM HEPES, 페니실린 100 unit/mL 및 스트렙토마이신 100 ㎍/mL을 함유하는 RPMI-1640 배지(Life Technologies, Grand Island, NY)에 10% FBS를 첨가하여 37℃, 5% CO2 조건에서 배양하였다. U937 세포를 100 rpm, 5분 동안 원심분리하여 10^6cell/mL로 농축한 후 24 웰 플레이트에 재분주한 후, 상기 <실시예 1>에세 제조한 녹차씨앗과피 추출물을 첨가하거나 첨가하지 않고 20시간 배양하였다. 이후, 현미경하에서 세포를 배양한 플레이트(plate)의 웰(well)을 불규칙적으로 5면을 선택하여 디지털 카메라(Nikon,Coolpix)로 촬영하여 이미지를 수득하였고, NIH 이미지 프로그램으로 실제의 세포를 측정한 후 5면의 세포를 합하여 부착된 세포의 수로 확인하였다.

그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 본 발명의 녹차씨앗과피 추출물은 세포부착 억제효과가 현저하게 높은 것을 확인하였다(도 10).

<실험예 5> 지방세포의 저해 효과 확인

녹차씨앗 과피 추출물의 지방세포 저해효과를 확인하기 위하여, 3T3-L1 아지방세포(preadipocyte)를 DMEM/10% FBS 배지에서 플라스크 바닥을 완전히 덮을 때까지 배양한 후, 2 일간 더 배양한 후에 유도배지(MDI, 0.5 mM 3-isobuty-1-methylxanthine, 0.5 μM dexamethasone, 10 μg/mℓ insulin)를 넣어 배양하여 아지방세포가 지방세포가 되도록 분화를 유도하였다. 3일째에 정상적인 DMEM/10% FBS 배지로 교환하였고, 이후 2일에 한 번씩 배지를 교환하면서 7-10일 동안 상기 <실시예 1>에서 제조한 녹차씨앗과피 추출물 또는 <실시예 3>에서 정제한 녹차씨앗과피 유래 사포닌을 농도별로 처리하였다. 또한, 지방세포로의 분화를 분석하기 위하여 배양된 세포를 포르말린으로 고정한 후, 포르말린을 제거하고 60% 이소프로판올로 씻은 후 흰 알갱이가 보일 때까지 말렸다. Oil-red 및 반응용액(working solution)으로 염색한 후, 염색액을 제거하고 증류수로 4회 정도 세척하였다. 100% 이소프로판올로 비지방 부분의 염색액을 세척한 후, 염색된 세포내 지방질을 현미경하에서 관찰하였다.

그 결과, 도 11 및 12에 나타난 바와 같이, 본 발명의 녹차씨앗과피 추출물 및 녹차씨앗과피 유래 사포닌은 농도의존적으로 지방세포를 현저히 감소시키는 것을 확인하였다(도 11 및 도 12).

<실험예 6> 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗과피 추출물의 혈관신생 억제 기전 확인

녹차씨앗과피 추출물의 신생혈관형성억제의 기전을 파악하기 위하여, HUVECs을 EBM-2 배지에 배양하였다. 또한 지방생성(adipogenesis) 및 지질합성(lipogenesis)의 작용기전의 파악을 위하여 3T3-L1세포를 배양하였으며, 총 RNA의 추출은 TRI 용액을 사용하여 추출하였다. DNA의 합성은 RevertAid Premium First Strand cDNA synthesis Kit를 사용하였고, 유전자의 발현은 PCR을 사용하였으며, 이 때 하기 [표 1] 및 [표 2]와 같은 프라이머를 사용하였다.

【표 1】

Gene	Primer sequence	Gene Bank Accession No.	Size (bp)
VEGFR-2 (KDR)	F 5'-AGG TTG CGT GTT CTT CGA GT-3'(서열번호 : 1) R 5'-CCC AAA GTG CTG GGT TTT TA -3'(서열번호 : 2)	M_002253.2	934
PI3K (PIK3CA)	F 5'-CGT GTG CCA TTT GTT TTG AC-3'(서열번호 : 3) R 5'-TCA AAC CCT GTT TGC GTT TAC-3'(서열번호 : 4)	NM_006218.2	536
VE-Cadherin (CDH5)	F 5'-GGA AGG AGA CAC CAA GCT CA-3'(서열번호 : 5) R 5'-CTT GTC ATG CAC CAG TTT GG-3'(서열번호 : 6)	NM_001795.3	322
β-Catenin (CTNNB1)	F 5'-GGT GGG CTG GTA TCT CAG AA-3'(서열번호 : 7) R 5'-GGC AAC TGG TAA ACT GTC CAA-3'(서열번호 : 8)	NM_001098209.1	629
AKT-1	F 5'-CCG ATT CAC GTA GGG AAA TG-3'(서열번호 : 9) R 5'-AGC GTC GAA AAG GTC AAG TG-3'(서열번호 : 10)	NM_005163.2	529
NF-kB(RELA)	F 5'-TGG TCA GCT CCC TTC TCT GT-3'(서열번호 : 11) R 5'-GCC AGC TTG GCA ACA GAT-3' (서열번호 : 12)	NM_001145138.1	521
β-actin (ACTB)	F 5'-CTC CTG AGC GCA AGT ACT CC-3'(서열번호 : 13) R 5'-ACA TCT CAA GTT GGG GGA CA-3'(서열번호 : 14)	NM_001101.3	632

【표 2】

Gene	Primer sequence	Gene Bank Accession No.	Size (bp)
PRAR-γ	F 5'- CTG GCC TCC CTG ATG AAT AA-3' (서열번호: 15) R 5'- GGG TGA AGG CTC ATG TCT GT-3' (서열번호: 16)	NM_001127330.1	393
SREBP-1	F 5'- TTG CAC CAG AGA GCA TTT TG-3' (서열번호 : 17) R 5'-GAA AAT GAG AGG CTG GTT GC-3'(서열번호 : 18)	NM_033218.1	593
C/EBPα	F-5'- TTA CAA CAG GCC AGG TTT CC-3'(서열번호 : 19) R 5'- CCA CAG GGG TGT GTG TAT GA-3'(서열번호: 20)	NM_007678.3	629
GAPDH	F- 5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3'(서열번호 : 21) R- 5'-TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT-3'(서열번호 : 22)	AK191558.1	988

그 결과, 도 13 및 도 14에 나타난 바와 같이, 본 발명의 녹차씨앗과피 추출물 및 녹차씨앗과피 유래 사포닌은 베타카테닌(β-catenin) 및 VE-캐터린(vascular epithelium-cadherin) 및 수용체-2(VEGFR-2) 및

PI3키나제(PI3Kinase) 및 엔에프-카파비(NF-κB); 및 하위 그룹인 Akt(Protein kinase B)등의 전분야에 걸쳐 신호전달 분자 발현을 억제하였고, 이로부터 신호전달을 억제하여 엔에프-카파비(NF-κB)까지의 신호전달이 이루어지지 못함으로써(도 15), 엔에프-카파비(NF-κB)가 활성화되지 못하여 나타내어 신생혈관의 형성을 억제함을 확인하였다(도 13 및 도 14).

또한, 도 16에 나타난 바와 같이, 본 발명의 녹차씨앗과피 추출물 및 녹차씨앗과피 유래 사포닌은 지방생성에 관여하는 SREBP-1분자, 및 지질합성에 관여하는 PRARr 및 C/EBPα의 발현을 모두 억제함으로써 항비만의 효과를 나타냄을 확인하였다(도 16).

<실험예 7> 체중감소 효과 확인

녹차씨앗과피 추출물의 체중감소 효과를 확인하기 위하여, 스프래그-돌리(Sprague-Dawley; (Sprague-Dawley; TACONIC(독일)) 계열의 쥐에 상기 <실시예 1> 에서 제조한 녹차씨앗과피 추출물을 100 ㎎/㎏을 1 ㎖씩 15일간 경구투여 하면서 고지방식이를 섭취하게 하여 체중의 변화를 관찰하였다. 대조군으로는 추출물을 투여하지 않고 고지방식이만 하였다.

그 결과, 도 17에서 나타난 바와 같이 고지방식이와 본 발명의 녹차씨앗과피 추출물을 함께 투여한 군은, 고지방식이 단독 투여군과 비교하여 현저한 체중감소효과를 나타냄을 확인하였다(도 17).

또한, 녹차씨앗 과피 추출물 및 녹차씨앗 추출물의 체중감소 효과를 비교하였다.

구체적으로, 녹차씨앗을 여수농업기술센터로부터 구입한 후, 외피와 내피를 제거하고 분쇄한 후, 상기 <실시예 1>과 동일한 방법으로 녹차씨앗 추출물(비교군 1)을 제조하였다. 또한, 녹차씨앗의 외피와 내피를 분리하지 않고 녹차씨앗 추출물(비교군 2)을 제조하였다.

그런 다음, 상기 <실험예 7>과 동일한 방법으로 체중감소효과를 확인하였습니다.

그 결과, 표 3에 나타낸 바와 같이, 녹차씨앗 과피 추출물을 투여한 군은 1개월 후, 녹차씨앗 추출물을 투여한 군(비교군 1 및 비교군 2)에 비하여 50% 이상의 현저한 체중감소 효과를 나타냄을 확인하였다(표 3).

【표 3】

	녹차씨앗 과피 추출물 및 고지방식이 투여군	비교군 1 및 고지방식이 투여군	비교군 2 및 고지방식이 투여군	고지방식이 단독 투여군
0일	89 g	89 g	89 g	89 g
5일	118 g	139 g	139 g	140 g
10일	132 g	164 g	165 g	181 g
15일	141 g	189 g	190 g	212 g
20일	156 g	211 g	215 g	236 g
25일	164 g	228 g	230 g	262 g
30일	180 g	239 g	241 g	296 g

【산업상 이용가능성】

상술한 바와 같이, 본 발명은 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물 및 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 상기 녹차씨앗 과피 추출물은 항산화 효능 및 혈관신생 억제 효능을 나타내고, 지방세포 억제 및 지방생성에 관여하는 SREBP-1분자, 및 지질합성에 관여하는 PRARr 및 C/EBPα의 발현을 모두 억제함으로써 유의적인 체중 감소 및 항비만 효과를 나타내므로, 상기 녹차씨앗 과피 추출물을 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물, 비만 예방 및 개선용 건강식품, 또는 신생혈관억제용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 물, C_1 내지 C_2 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출되는 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 4】

제 1항에 있어서, 상기 녹차씨앗 과피 추출물은 신생혈관형성 억제활성을 갖는 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 5】

녹차씨앗 과피 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방 및 개선용 건강식품.

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 상기 추출물은 물, C_1 내지 C_2 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출되는 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 개선용 건강식품.

【청구항 7】

제 6항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 개선용 건강식품.

【청구항 8】

제 5항에 있어서, 상기 녹차씨앗 과피 추출물은 신생혈관형성 억제활성을 갖는 것을 특징으로 하는 비만 예방 및 개선용 건강식품.

【청구항 9】

녹차씨앗 과피 추출물을 유효성분으로 함유하는 신생혈관억제용 약학적 조성물.

【청구항 10】

유효한 양의 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물을 비만에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 비만 치료 방법.

【청구항 11】

유효한 양의 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 비만 예방 방법.

【청구항 12】

비만 예방 및 치료용 약학적 조성물의 제조에 사용하기 위한 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물의 용도.

【청구항 13】

비만 예방 및 개선용 건강 식품의 제조에 사용하기 위한 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물의 용도.

【청구항 14】

유효한 양의 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신생혈관형성 억제 방법.

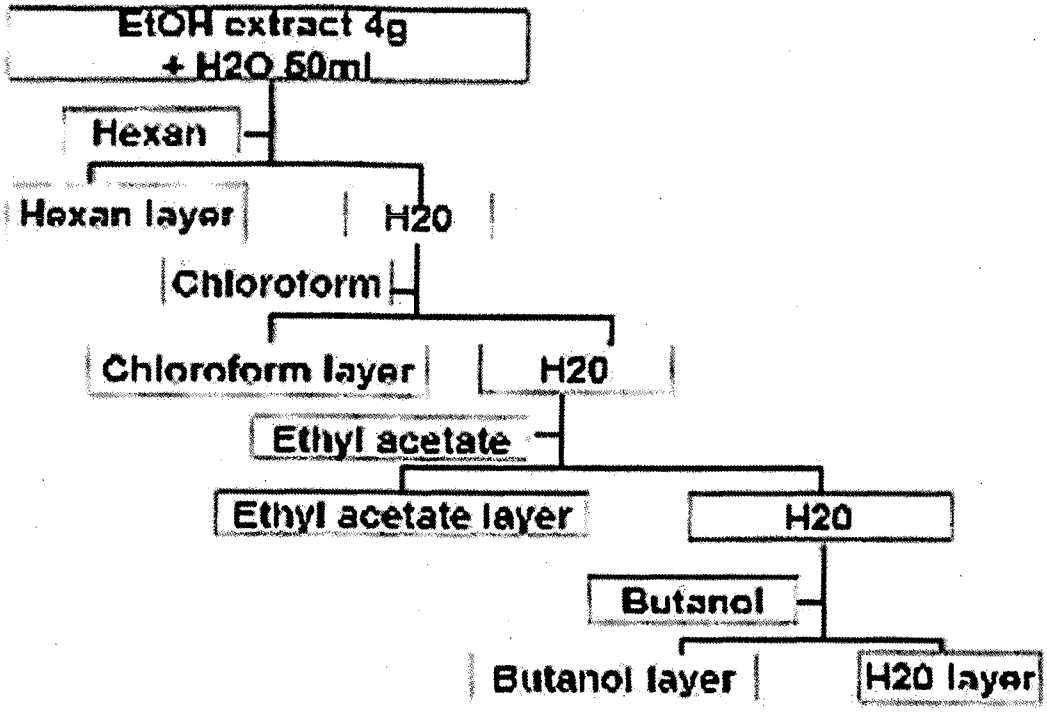
【청구항 15】

신생혈관형성 억제용 조성물의 제조에 사용하기 위한 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물의 용도.

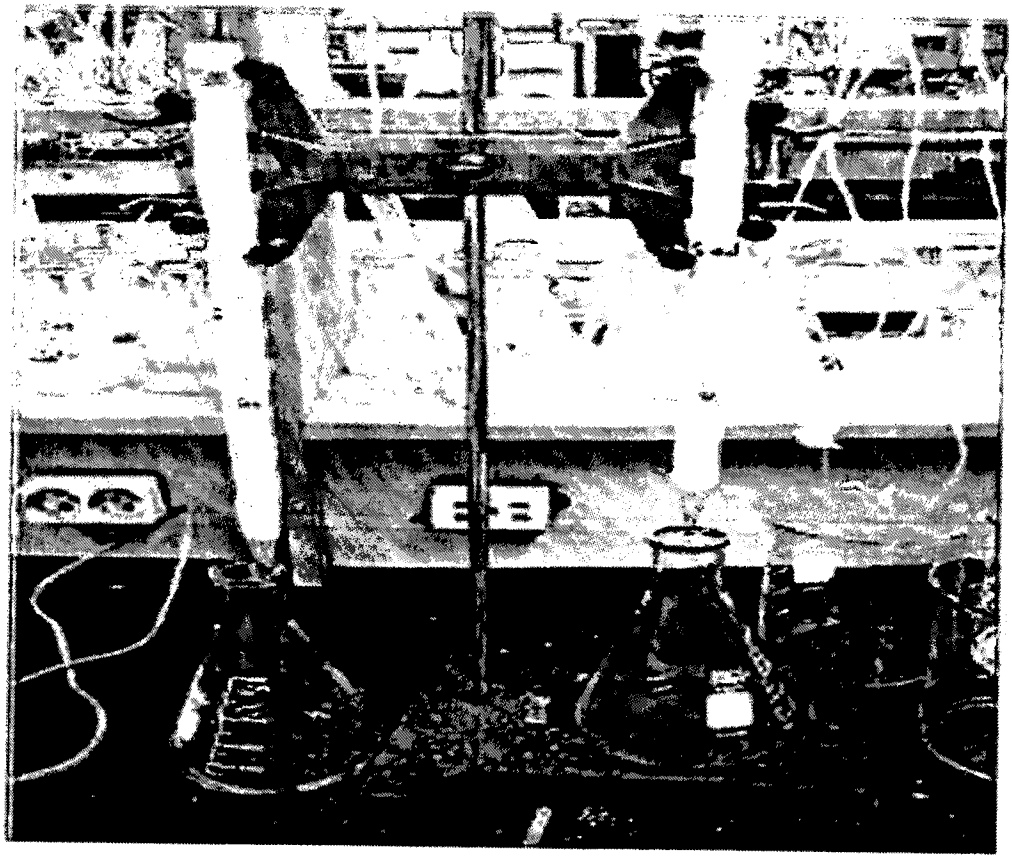
【청구항 16】

신생혈관형성 억제 및 개선용 건강 식품의 제조에 사용하기 위한 녹차(*Camellia sinensis* L.)씨앗 과피 추출물의 용도.

[도 1]


EtOH extract 4g
+ H2O 50ml
Hexan
Hexan layer
H20
Chloroform
Chloroform layer
H20
Ethyl acetate
Ethyl acetate layer
H20
Butanol
Butanol layer
H20 layer

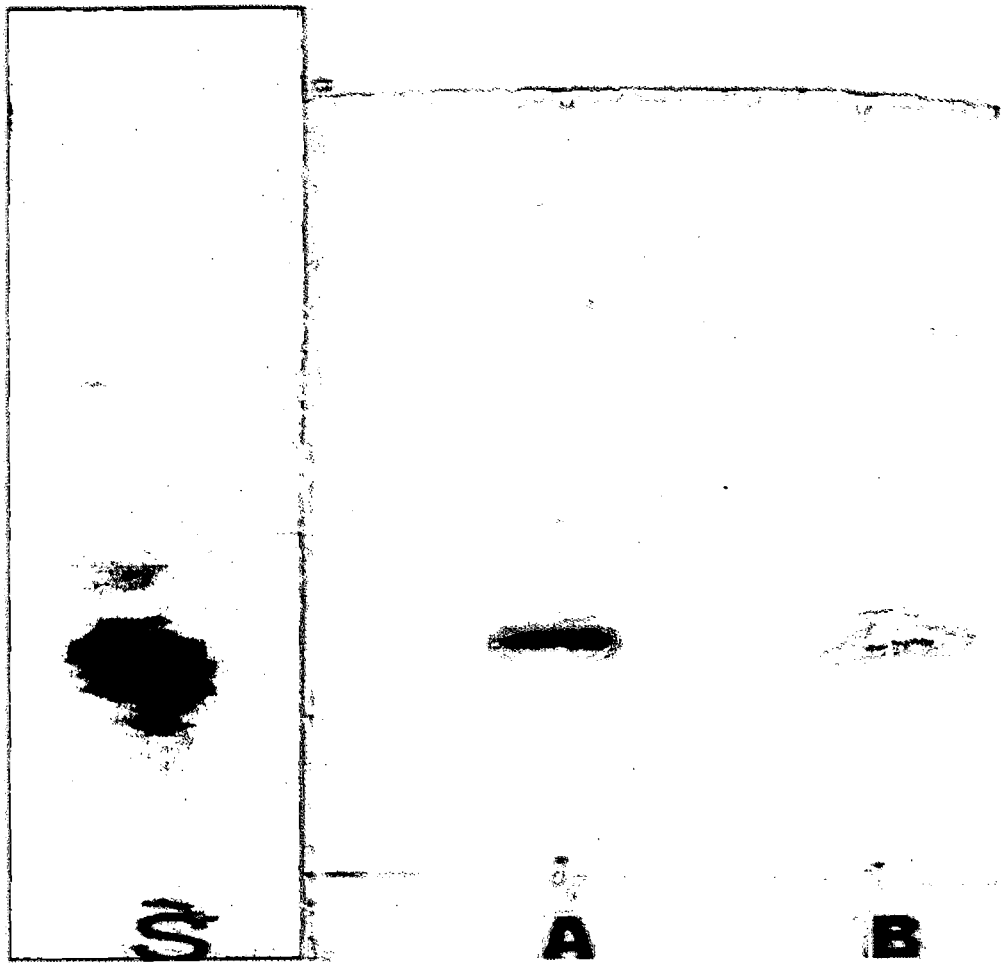
[도 2]



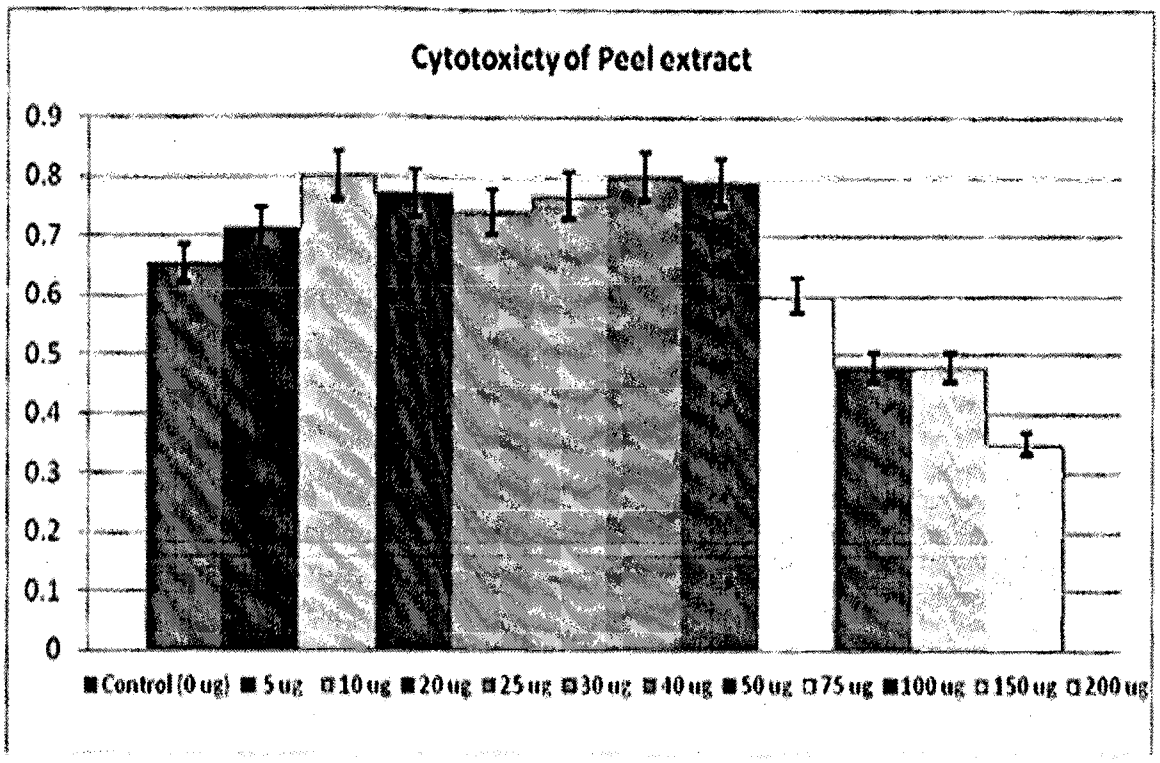
[도 3]



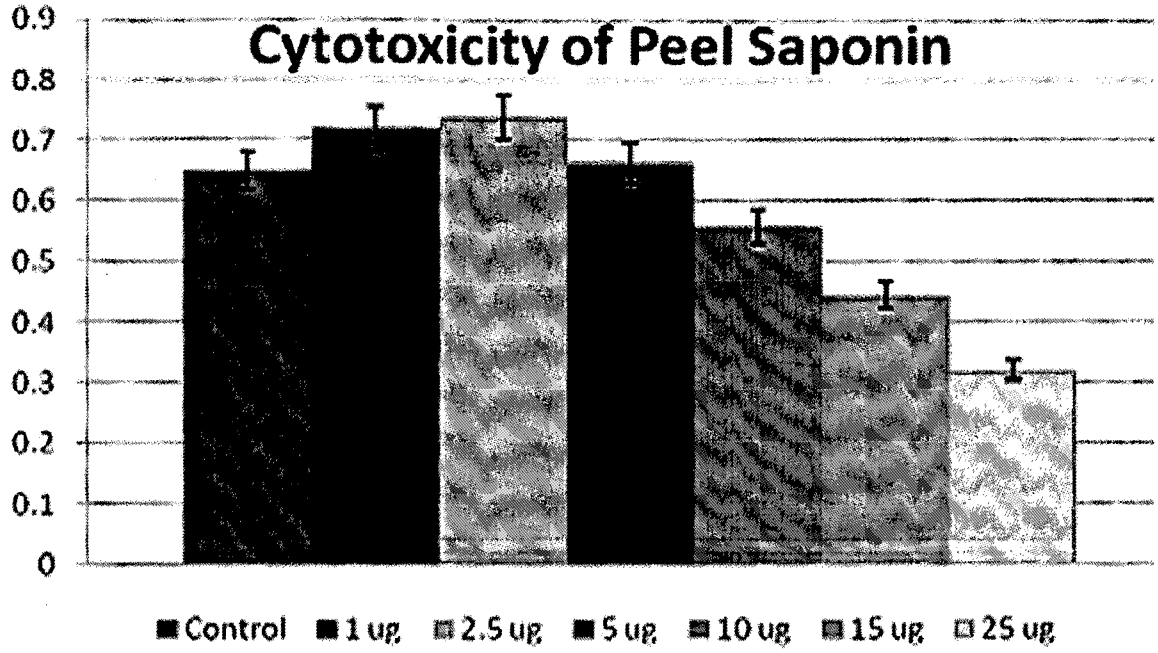
[도 4]



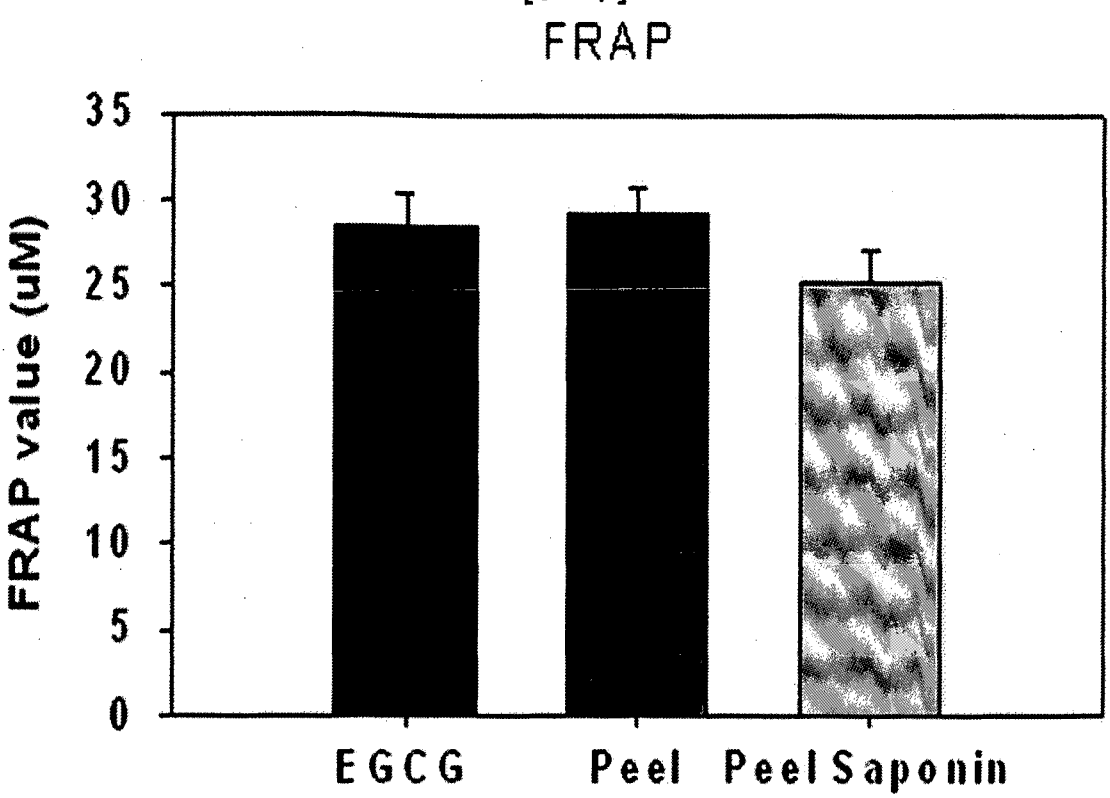
[도 5]


Cytotoxicty of Peel extract
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Control (0 ug)
5 ug
10 ug
20 ug
25 ug
30 ug
40 ug
50 ug
75 ug
100 ug
150 ug
200 ug

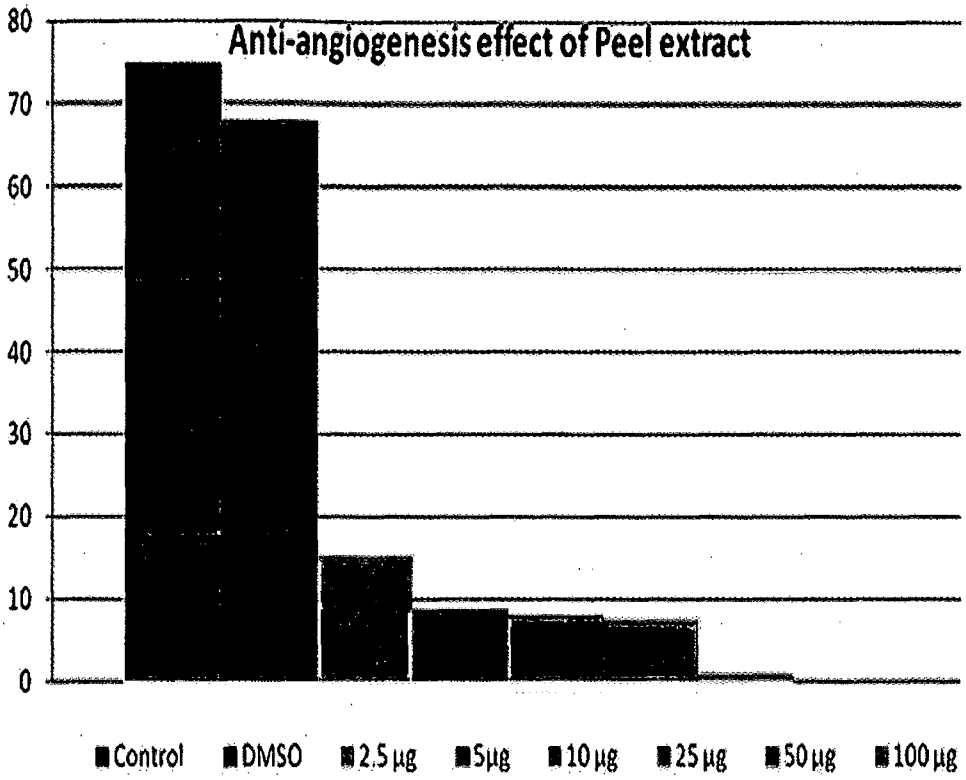
[도 6]


Cytotoxicity of Peel Saponin
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Control
1 ug
2.5 ug
5 ug
10 ug
15 ug
25 ug

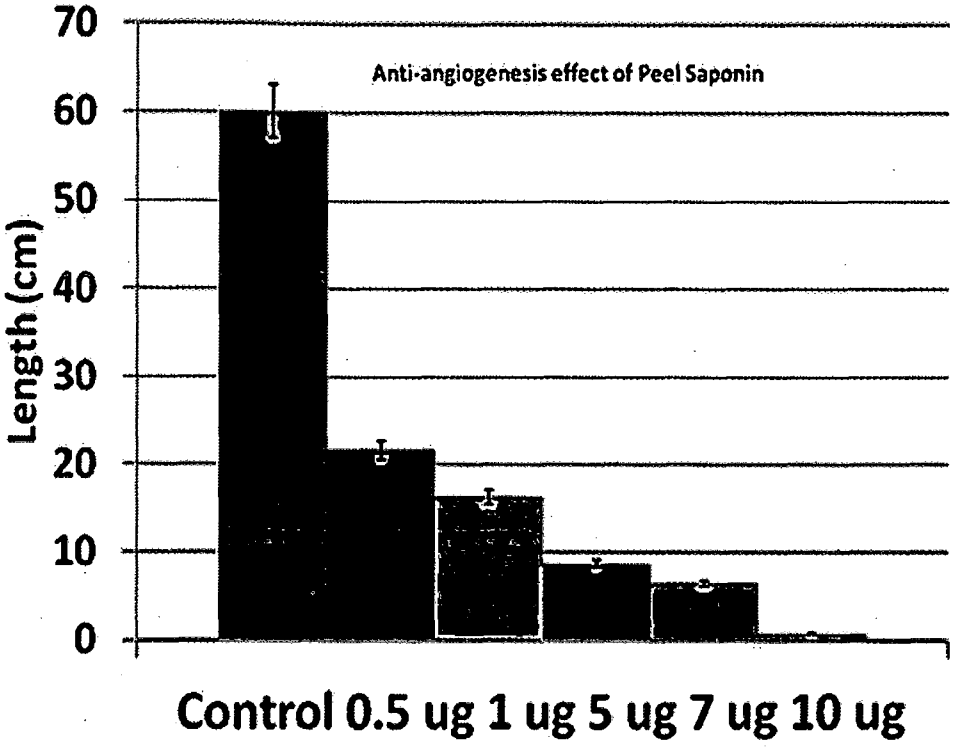
[도 7]



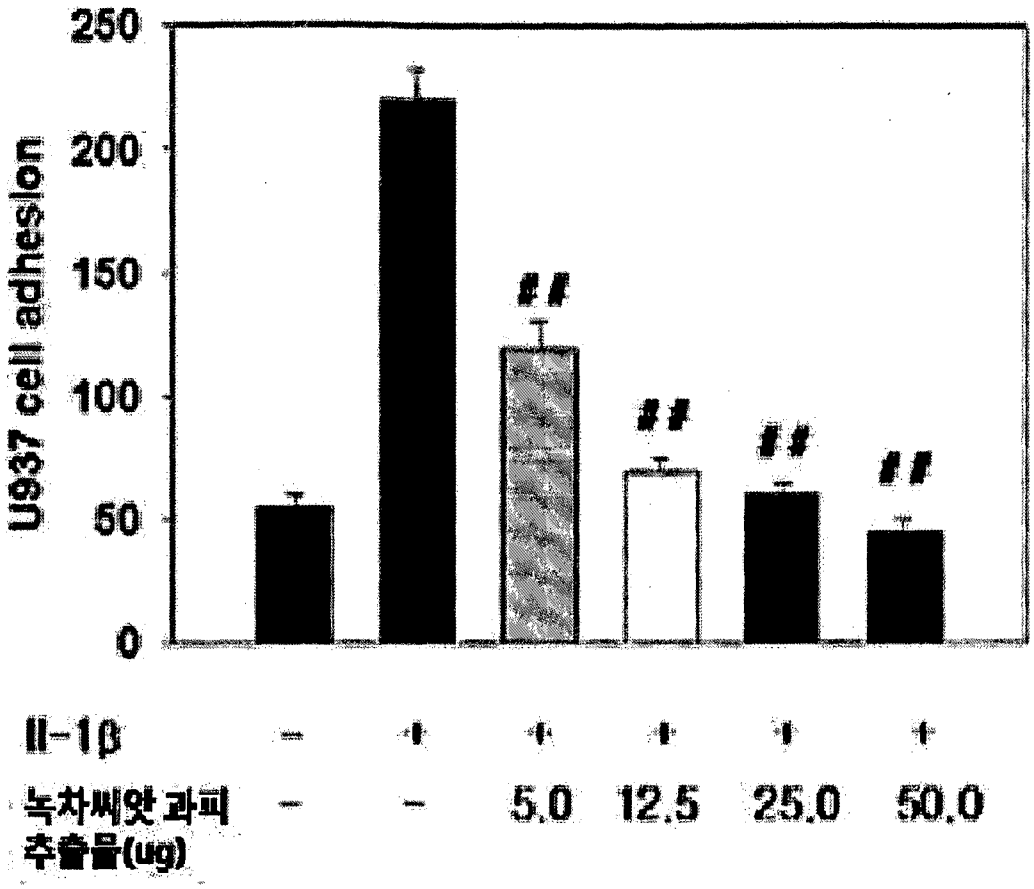
[도 8]


Anti-angiogenesis effect of Peel extract
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Control
DMSO
2.5 μg
5μg
10 μg
25 μg
50 μg
100 μg

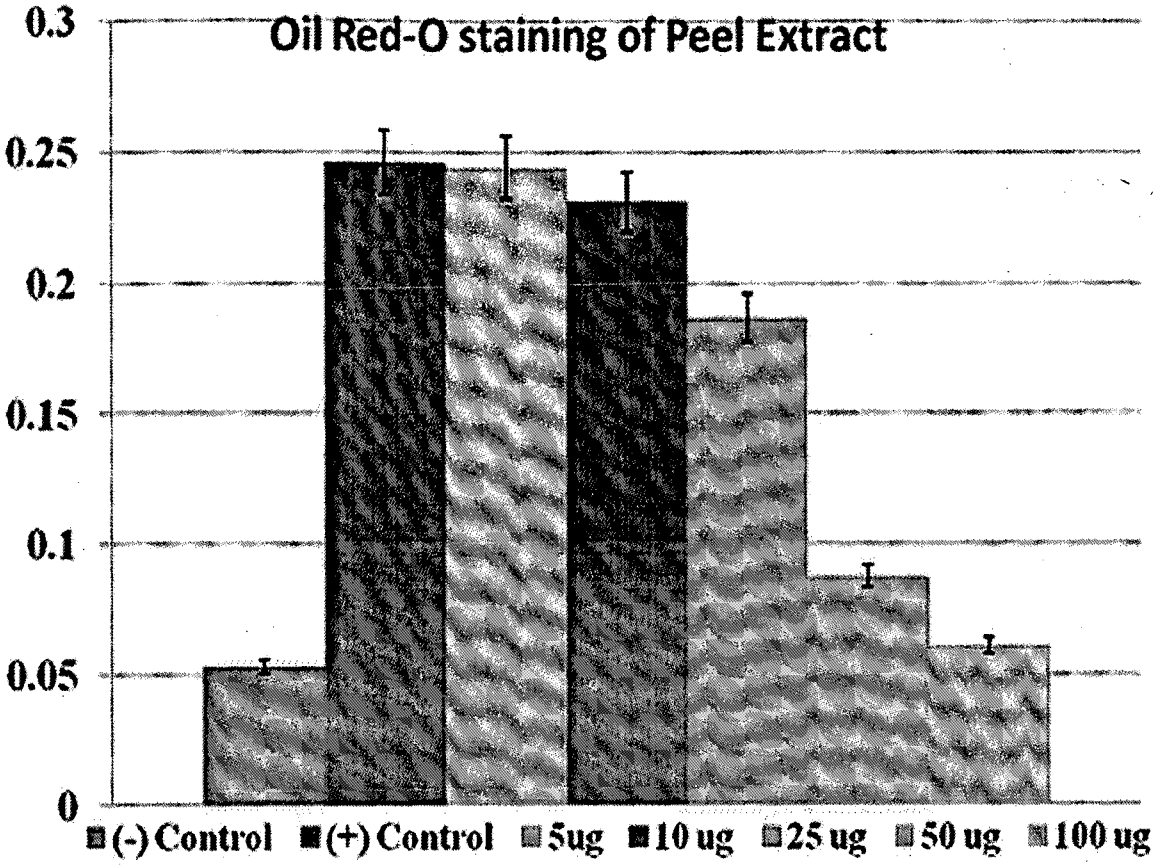
[도 9]


Anti-angiogenesis effect of Peel Saponin
Length (cm)
70
60
50
40
30
20
10
0
Control 0.5 ug 1 ug 5 ug 7 ug 10 ug

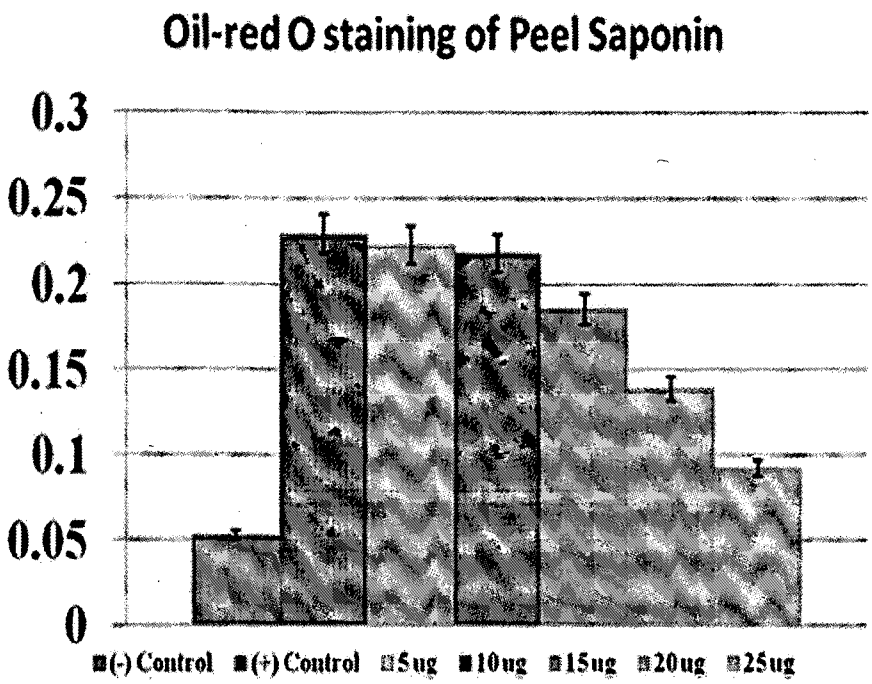
[도 10]


250
200
150
100
50
0
U937 cell adhesion
##
##
##
##
Il-1β - + + + + +
녹차씨앗 과피 추출물(ug) - - 5.0 12.5 25.0 50.0

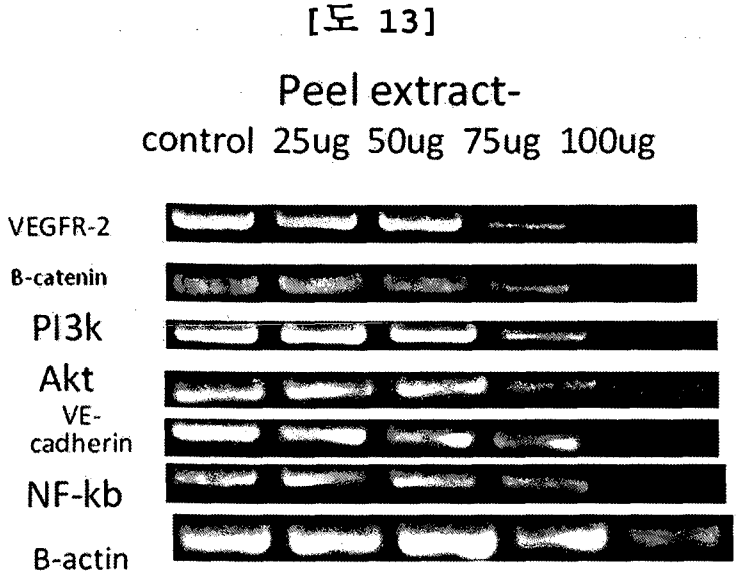
[도 11]


Oil Red-O staining of Peel Extract
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
(-) Control
(+) Control
5ug
10 ug
25 ug
50 ug
100 ug

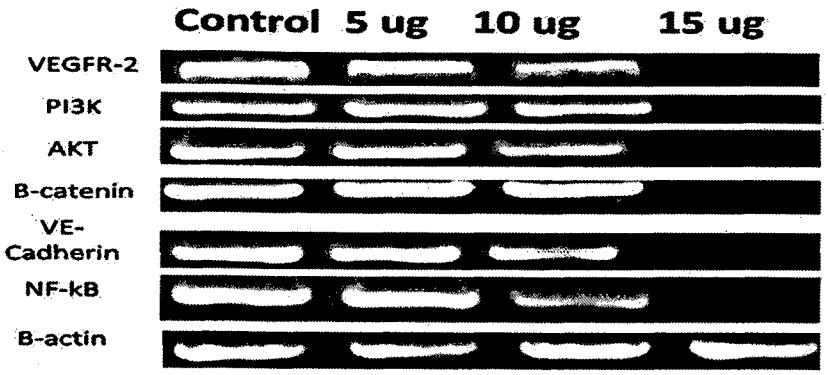
[도 12]


Oil-red O staining of Peel Saponin
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
(-) Control
(+) Control
5ug
10ug
15ug
20ug
25ug

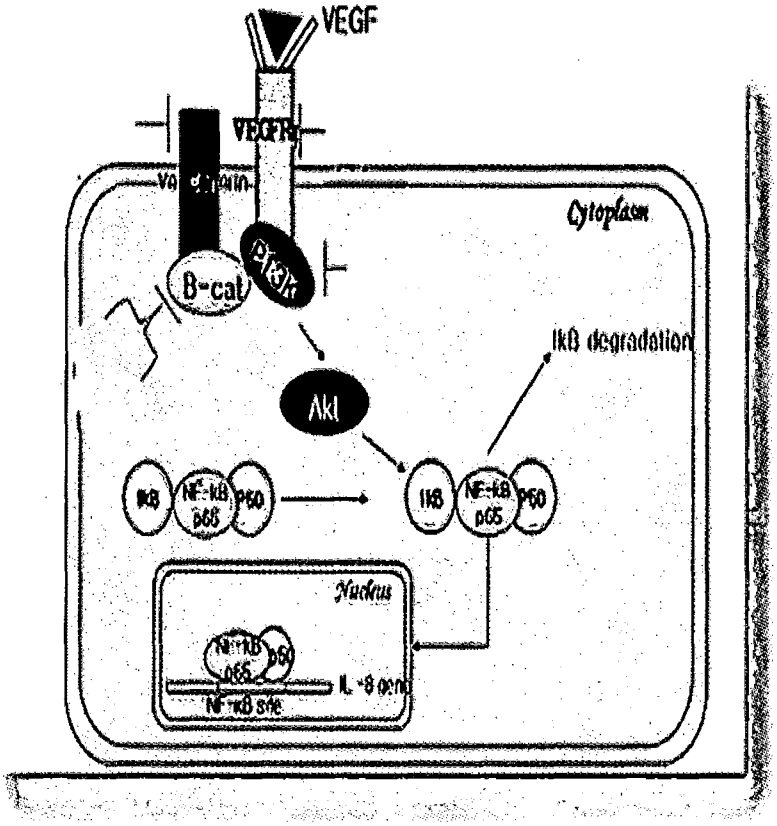
[도 13]


Peel extract-
control 25ug 50ug 75ug 100ug
VEGFR-2
B-catenin
PI3k
Akt
VE-cadherin
NF-kb
B-actin

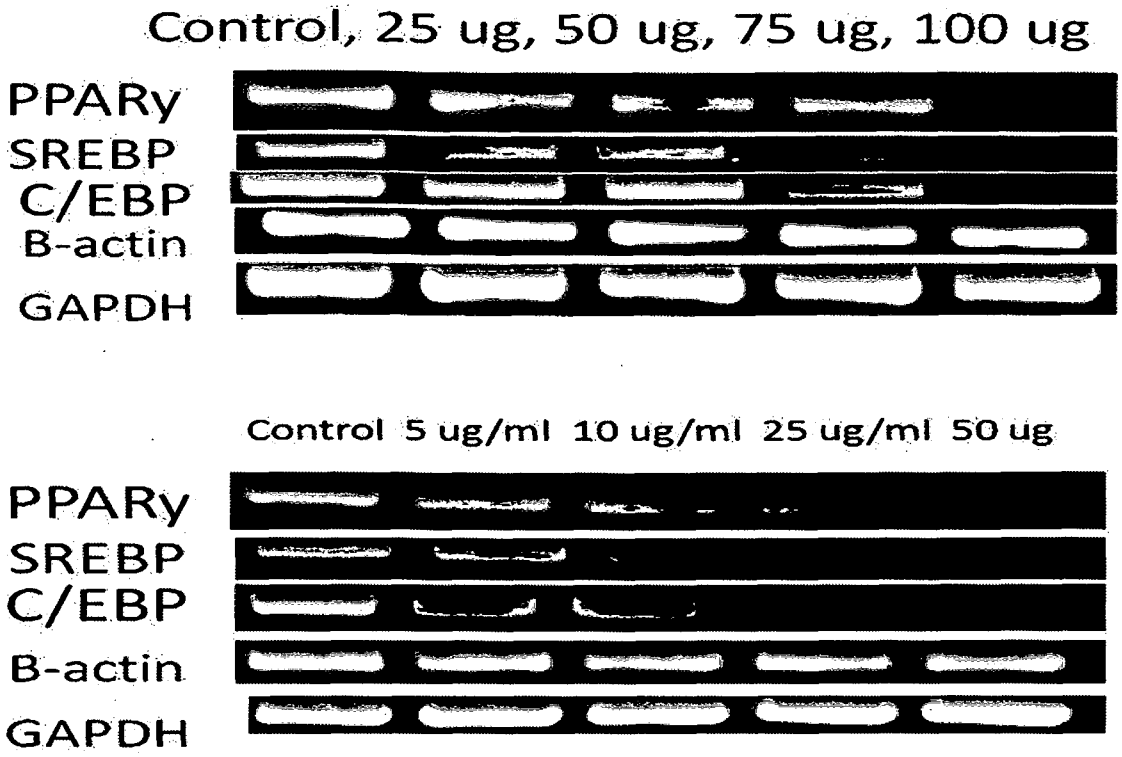
[도 14]


Control
5 ug
10 ug
15 ug
VEGFR-2
PI3K
AKT
B-catenin
VE-Cadherin
NF-kB
B-actin

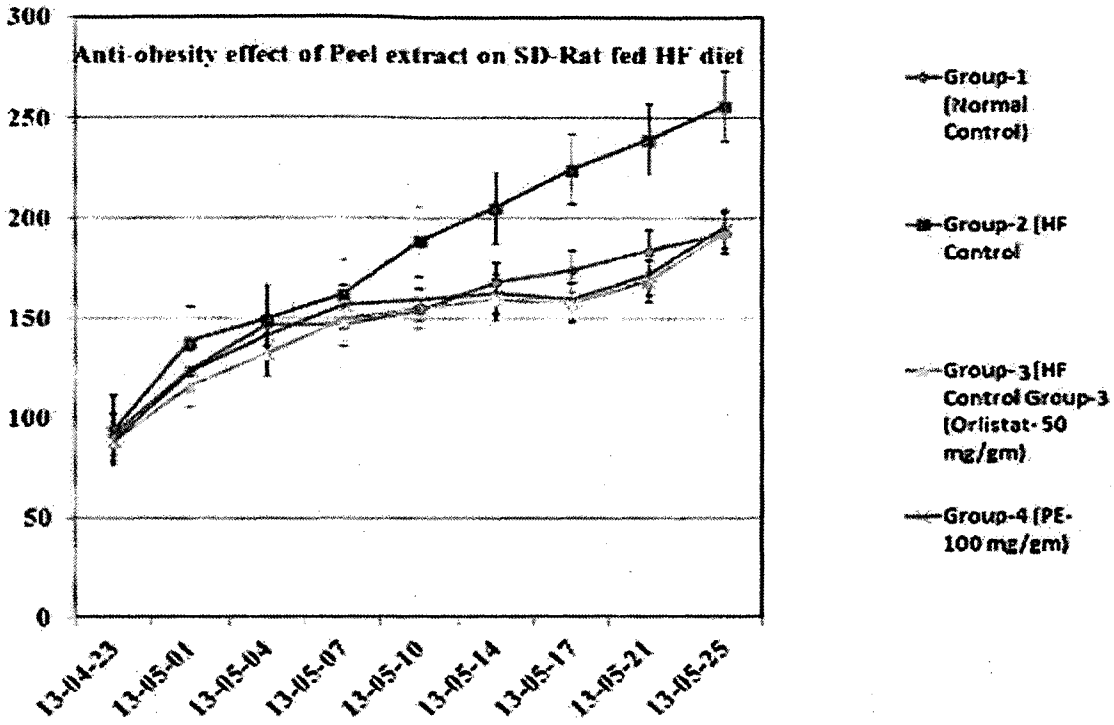
[도 15]


VEGF
VEGFR
Cytoplasm
B-cat
IkB degradation
Akt
IkB
NF-kB p65
p50
Nucleus
IL-8 gene
NF-kB site

[도 16]


Control, 25 ug, 50 ug, 75 ug, 100 ug
PPARγ
SREBP
C/EBP
B-actin
GAPDH
Control 5 ug/ml 10 ug/ml 25 ug/ml 50 ug
PPARγ
SREBP
C/EBP
B-actin
GAPDH

[도 17]


Anti-obesity effect of Peel extract on SD-Rat fed HF diet
300
250
200
150
100
50
0
13-04-23
13-05-01
13-05-04
13-05-07
13-05-10
13-05-14
13-05-17
13-05-21
13-05-25
Group-1 (Normal Control)
Group-2 (HF Control
Group-3 (HF Control Group-3 (Orlistat-50 mg/gm)
Group-4 (PE-100 mg/gm)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/007401

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 36/82(2006.01)i, A61P 3/04(2006.01)i, A61P 3/00(2006.01)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 36/82; A61Q 19/00; A61P 35/00; A61K 8/97; A61P 3/04; A61P 3/00

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), Google Scholar & Keywords: Camellia sinensis L., Green tea seed, seed, seed, peel, peel, obesity, loss in weight, new blood vessel, Green tea, Camellia sinensis L., Seed, Obesity, Angiogenesis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2008-0090805 A (KIM, Jong Deok) 09 October 2008 See abstract, paragraph [35], claims 1 and 2.	1-9,12-13,15-16
X	KR 10-2008-0091053 A (KIM, Jong Deok) 09 October 2008 See abstract, claim 1.	1-9,12-13,15-16
X A	CHOI, Seon Gyeong, "Antiobesity Effect of Green Tea Seed Oi", Wonkwang University Master's degree thesis, February 2008 See page 1 Korean abstract.	1-8,12-13 9,15-16
A	KR 10-2011-0112916 A (INJE UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 14 October 2011 See the entire document.	1-9,12-13,15-16
A	KR 10-2010-0124519 A (AMOREPACIFIC CORPORATION) 29 November 2010 See the entire document.	1-9,12-13,15-16

☐ 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	Date of mailing of the international search report
05 NOVEMBER 2014 (05.11.2014)	**12 NOVEMBER 2014 (12.11.2014)**
Name and mailing address of the ISA/**KR** Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/007401

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **10-11, 14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 10-11 and 14 pertain to a method for treatment of the human, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.
PCT/KR2014/007401

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2008-0090805 A	09/10/2008	NONE	
KR 10-2008-0091053 A	09/10/2008	NONE	
KR 10-2011-0112916 A	14/10/2011	NONE	
KR 10-2010-0124519 A	29/11/2010	CN 102438642 A	02/05/2012
		JP 2012-527450 A	08/11/2012
		US 2012-0052138 A1	01/03/2012
		WO 2010-134756 A2	25/11/2010
		WO 2010-134756 A3	10/03/2011
		WO 2010-134756 A8	25/11/2010

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/007401

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 36/82(2006.01)i, A61P 3/04(2006.01)i, A61P 3/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 36/82; A61Q 19/00; A61P 35/00; A61K 8/97; A61P 3/04; A61P 3/00

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), 구글 스칼라 & 키워드 : 녹차, 녹차씨, 씨앗, 종자, 과피, 껍질, 비만, 체중 감소, 신생혈관, Green tea, Camellia sinensis L., Seed, Obesity, Angiogenesis

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2008-0090805 A (김종덕) 2008.10.09 요약, 식별번호 [35], 청구항 1 및 2 참조.	1-9,12-13,15-16
X	KR 10-2008-0091053 A (김종덕) 2008.10.09 요약, 청구항 1 참조.	1-9,12-13,15-16
X A	최선경, '녹차씨 오일의 항비만 효과', 원광대학교 석사학위논문, 2008.02 1면 국문초록 참조.	1-8,12-13 9,15-16
A	KR 10-2011-0112916 A (인제대학교 산학협력단) 2011.10.14 전문 참조.	1-9,12-13,15-16
A	KR 10-2010-0124519 A ((주)아모레퍼시픽) 2010.11.29 전문 참조.	1-9,12-13,15-16

☐ 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

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

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2014년 11월 05일 (05.11.2014)	2014년 11월 12일 (12.11.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
민경난
전화번호 +82-42-481-3336

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/007401

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 10-11, 14
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제10-11, 14항은 사람의 치료방법에 해당하는 것으로, PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2014/007401

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2008-0090805 A	2008/10/09	없음	
KR 10-2008-0091053 A	2008/10/09	없음	
KR 10-2011-0112916 A	2011/10/14	없음	
KR 10-2010-0124519 A	2010/11/29	CN 102438642 A	2012/05/02
		JP 2012-527450 A	2012/11/08
		US 2012-0052138 A1	2012/03/01
		WO 2010-134756 A2	2010/11/25
		WO 2010-134756 A3	2011/03/10
		WO 2010-134756 A8	2010/11/25