

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일

2021년 9월 16일 (16.09.2021)

WIPO | PCT

WO 2021/182894 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 36/185 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2021/003041

(22) 국제출원일:

2021년 3월 11일 (11.03.2021)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2020-0030346 2020년 3월 11일 (11.03.2020) KR

(71) 출원인: 서울대학교병원 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) [KR/KR]; 03080 서울시 중로구 대학로 101, Seoul (KR). 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 김효수 (KIM, Hyosoo); 04419 서울시 용산구 독서당로 111, 105동 T-102호, Seoul (KR). 장현덕 (JANG, Hyunduk); 03322 서울시 은평구 갈현로29길 11, 101동 208호, Seoul (KR). 안경섭 (AHN, Kyung Seop); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 오세량 (OH, Sei-Ryang); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon

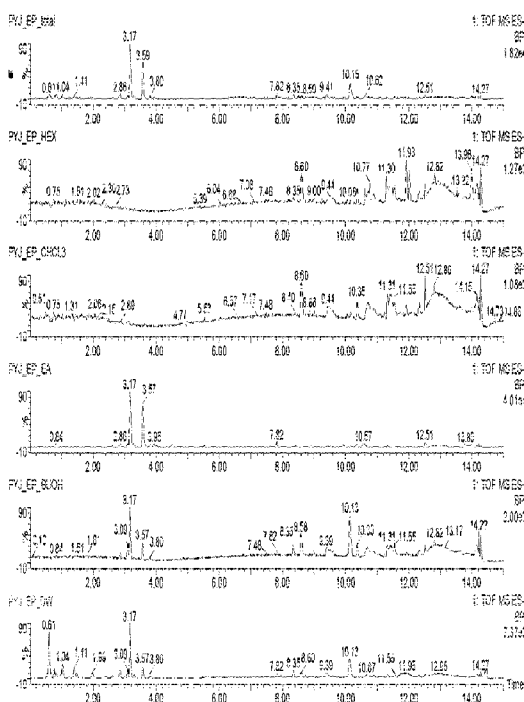
(KR). 권옥경 (KWON, Ok-Kyoung); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 류형원 (RYU, Hyung Won); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 금향 (JIN, Hang); 674100 운남성 곤명시 오화구 백운로 761번지 7동 501호, Yunnan (CN). 최상호 (CHOI, Sang-ho); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이상우 (LEE, Sang Woo); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 백진협 (PAIK, Jin Hyub); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 김수용 (KIM, Soo Yong); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이창영 (LEE, Changyoung); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 김용인 (KIM, Yong In); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 김혜원 (KIM, Hyewon); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 박미진 (PARK, Mijin); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 특허법인한얼 (HANOL INTELLECTUAL PROPERTY AND LAW); 05836 서울시 송파구 법원로 135, 6층, 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,

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING CARDIOMETABOLIC DISEASES, CONTAINING ELAEOCARPUS PETIOLATUS

(54) 발명의 명칭: 엘리오카페스 페티오라투스를 포함하는 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to: a pharmaceutical composition for preventing or treating cardiometabolic diseases and a food composition for preventing or alleviating cardiometabolic diseases, the compositions containing, as an active ingredient, an *Elaeocarpus petiolatus* extract, a fraction thereof or a compound isolated therefrom; and a method for preventing or treating cardiometabolic diseases by using same. The compositions containing an *Elaeocarpus petiolatus* extract, a fraction thereof or a compound isolated therefrom, of the present invention, inhibit the binding of resistin-cap1 so as to suppress the production of tumor necrosis factor, thereby suppressing inflammation of the cardiovascular system, and thus can be effectively used as a use of preventing or treating cardiometabolic diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 엘리오카페스 페티오라투스(*Elaeocarpus petiolatus*) 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는, 심혈관대사질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 심혈관대사질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물; 및 이를 이용한 심혈관대사질환의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다. 본 발명의 엘리오카페스 페티오라투스(*Elaeocarpus petiolatus*) 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 조성물은 리지스틴-갭1의 결합을 억제하여 중양피사인자의 생성을 저해함으로써 심혈관의 염증을 저해하는 활성을 가지는 바, 심혈관대사질환의 예방 또는 치료 용도로서 유용하게 사용될 수 있다.

ID, IL, IN, IR, IS, IT, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, 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))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

명세서

발명의 명칭: 엘리오카퍼스 페티오라투스를 포함하는 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 엘리오카퍼스 페티오라투스(*Elaeocarpus petiolatus*) 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 심혈관 대사 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물; 및 이를 이용한 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 최근 풍부하고 다양한 식생활 및 생활양식의 변화로 영양섭취는 불균형 상태가 되기 쉬우며 기계화된 현대 생활은 운동 부족을 초래하게 되었다. 그 결과 질병의 형태도 선진국형으로 변화하고 그에 따라 심혈관 대사 질환의 이환율도 증가하고 있다. 심혈관 대사 질환이란, 생체내의 당질, 지질 등의 대사 불균형에 의해 발생하는 질환을 말하는 것으로, 심혈관 질환, 이상지질혈증, 비만 또는 당뇨병 등이 주요 질환에 해당한다.
- [4] 심혈관 질환은 심장과 주요 동맥에 발생하는 질환으로, 전세계적으로 가장 높은 사망의 원인이 되는 질환이다. 심혈관 질환에 속하는 주요 질병으로는 고혈압, 협심증, 심근경색증, 동맥경화증, 죽상경화증, 뇌졸중, 부정맥 등이 있다. 심혈관 질환과 관련된 위험인자는 연령, 성별, 흡연, 운동부족 및 비만 등이 있으나, 최근 서구화된 식생활 및 급격한 생활양식의 변화를 고려할 때, 특히 저단백(lipoprotein)에 의한 콜레스테롤의 축적이 대표적인 원인으로 꼽힐 수 있다.
- [5] 동맥경화증은 핏속에 기름이 증가하여 혈관벽이 두꺼워지고, 혈관내부가 좁아지며 혈전이 생겨 혈관 내강이 좁아지고 동맥에 탄력이 떨어지는 경우를 말하며, 발생부위에 따라 뇌졸중, 협심증, 심근경색증, 말초혈관 질환 등으로 나뉜다(Insull et al., 2009. The American Journal of Medicine 122, S3-S14). 동맥경화증으로 인한 혈관이상은 사망에 이르는 중요한 원인이 되며, 이로 인한 성인 사망률은 미국과 일본의 경우 50%, 한국의 경우 35% 를 차지한다.
- [6] 동맥 내벽에 지방질 및 섬유조직이 쌓여 혈관벽이 좁아지거나 막히게 되는 것으로, 동맥경화증이 가벼울 경우 정상적인 활동에 지장은 없으나, 동맥경화증으로 관상조직의 50~70% 이상이 막히면 동맥경화성 심장병이 야기될 수 있다. 또한, 심할 경우 뇌동맥 또는 관상동맥이 파열될 수 있고 이 경우 뇌혈관 질환, 심장질환 등의 심혈관계로 발전하게 된다. 뇌동맥경화증의 경우 뇌연화증의 원인이 되며, 관상동맥경화증의 경우 협심증, 심근경색 등의 원인이

되는 것으로 알려져 있다. 또한, 이로 인해 고혈압, 심장병, 뇌일혈 등이 유발될 수 있다. 현재 동맥경화증의 치료제로 HMG-CoA reductase 저해제인 다양한 스타틴(statin) 계열 약물 등이 개발되어 있으나, 여전히 보다 효과적인 치료제의 개발의 필요성이 대두되고 있다.

- [7] 이상지질혈증은 콜레스테롤과 중성지방을 운반하는 지단백의 생합성 증가 또는 분해 감소에 의해 혈액 중에 지질 또는 지방성분이 과다하게 많이 함유하게 되는 상태를 말하는 것으로, 그 결과 혈중에 총콜레스테롤, LDL콜레스테롤, 중성지방이 증가된 상태거나 HDL콜레스테롤이 감소된 상태가 된다.
- [8] 유전적 요인, 비만, 당뇨 또는 음주 등의 원인에 의해 발생할 수 있으나, 특히 지방 함량이 높은 식생활에 의해 혈중 지질이 증가되어 이상지질혈증이 발생할 수 있다. 최근 한약재 및 식품 등의 천연물 유래 활성성분을 이용한 대체요법 등이 개발되고 있으나, 기존의 합성 약학적 조성물보다 치료 효과가 우수하며, 부작용이 적은 천연 약학적 조성물 또는 그 원료에 대한 개발은 아직까지 미비한 실정이다.
- [9] 비만은 지방간, 고혈압, 당뇨병, 심혈관계질환 등의 만성질환을 유발하는 것으로 널리 알려져 있으며, 최근 보건복지가족부의 2007년 국민건강·영양조사결과에 의하면 한국성인의 31.7%가 비만으로 나타났다. 또한, 전 세계인구의 약 25%에 해당하는 17억명이 현재 과체중(BMI> 25)이고, 미국, 유럽, 일본 등 주요 국가들의 1억 2천명을 포함한 서구지역 3억명 이상이 비만환자(BMI> 30)로 분류되고 있다. 국내외에서 판매되는 비만치료제로는 미 FDA에서 승인을 받은 orlistat을 주원료로 하는 '제니칼'이 있는데, 리파아제 작용을 억제하는 제니칼의 경우 지방변, 가스생성, 지용성 비타민 흡수 저하 등의 위장계 부작용이 있는 것으로 알려져 있다.
- [10] 당뇨병은 인슐린 분비가 부족한 경우(I형), 또는 인슐린에 대한 감수성이 떨어져 당질 대사에 이상이 생기는 경우(II형)의 두 가지 유형이 있고, 전체 당뇨병 환자 중 90%를 차지할 정도로 II형이 훨씬 더 흔하다. II형 당뇨병은 인슐린 비-의존성 당뇨병(non-insulin-dependent diabetes mellitus/NIDDM)으로, 종래 인슐린 비-의존성 당뇨병을 치료하기 위한 물질로서는 PPAR- γ 활성제, GLP-1 유도체, DPP-IV 저해제, PTP1B 저해제 등이 개발되어 있으나, 각각의 부작용으로서 간이나 신장, 근육, 심장에 대한 독성 및 체중증가 증상 등이 알려져 있다.
- [11] 요컨대, 심혈관 대사 질환의 주요 원인을 해결하기 위해, 혈중 지질 농도를 저하시키는 것이 중요하다고 할 수 있고, 혈중 지질 농도를 저하시키는 방법으로는 고지방 식이를 억제하는 식이요법, 운동요법 및 약물요법 등이 권장되고 있다. 그러나, 식이요법이나 운동요법은 엄격한 관리 및 실시가 어려우며, 그 효과에 한계가 있는 경우가 많다. 또한 현재까지 개발된 지질 농도 감소제로는 담즙산 결합 수지, HMG-CoA 환원효소 억제제, 네오마이신 등과 같은 콜레스테롤 함량을 저하시키는 약제 및 피브린산 유도체, 니코틴산 및 어유

등 중성지방 함량을 낮추는 약제들이 치료제로 이용되고 있다. 그러나 이와 같은 약제들은 간 독성, 위장장애 및 암 발생 등과 같은 부작용이 있다.

[12]

[13] 리지스틴(Resistin)은 염증을 유도하는 아디포카인(adipokine)으로 알려져 있으며, (Bokarewa et al., 2005. Journal of immunology 174, 5789-5795; Cho, Y et al., 2011. Journal of the American College of Cardiology 57, 99-109) 동맥경화에서 인간의 대식세포에서 트리글리세롤의 저장을 re-esterification과 lipolysis를 유도하며, 콜레스테롤 에스터의 침착(deposition)을 증가시킨다고 알려져 있다(Rae et al., 2007. FEBS Letters 581, 4877-83).

[14]

최근, 리지스틴이 수용체인 켈1(CAP1) 단백질과 결합하여 NF- κ B를 활성화시켜 세포신호전달체계를 활성화시켜 염증을 유발하여 TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인의 분비를 촉진시킴으로써, 염증을 유발된다고 보고 되었으므로(Lee S et al., Cell Metabolism 2014, 19(3), 484-497), 리지스틴-켈1(Resistin-CAP1)의 결합을 억제하는 화합물이 동맥경화증, 당뇨병 등 성인병 특히, 심혈관 대사 질환을 치료하기 위한 약물로 사용될 수 있을 것이다.

[15]

리지스틴-켈1의 결합을 저해하여 염증을 억제하는 심혈관 대사 질환 치료제를 개발하기 위하여 한국생명공학연구원 천연물의약연구센터에서 보유하고 있는 항염활성을 확인한 100여종의 천연물 소재를 대상으로 리지스틴-켈1의 결합저해효과를 효소면역학적 방법을 통하여, 그리고, 인간의 단핵세포구에서 리지스틴에 의해 유도되는 염증사이토카인인 종양괴사인자(tumor necrosis factor α ; TNF- α)의 생성 저해 활성을 효소면역학적 방법으로 스크리닝하였다.

[16]

리지스틴-켈1 저해효과가 우수한 엘리오카퍼스 페티오라투스(*Elaeocarpus petiolatus*)는 팽이밥목과 담팔수과(Elaeocarpaceae)에 속하며, 주로 열대, 난대, 온대에 자생하는 식물이며, 동속이종인 엘리오카퍼스 스페리쿠스(*Elaeocarpus sphaericus*)의 항주름제 및 피부 외용제에 대한 피부의 건조 및 주름개선효과와 Rat에서 carrageenin으로 유도된 염증에 대한 항염효과(Singh H et al., J Pharmacol Toxicol Methods. 2000 May-Jun;43(3):219-24)가 보고된 바가 있으며, *Elaeocarpus bifidus*의 항바이러스 효과가 미국에서 보고된 바 있으나, 이 식물이 심혈관 대사 질환에 관한 연구가 진행된 바는 없었다.

[17]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[18]

따라서, 본 연구자들은 엘리오카퍼스 페티오라투스 추출물 및 분획물과 이에서 분리한 단일화합물이 리지스틴-켈1을 저해함으로써, 염증반응을 감소시켜 심혈관 대사 질환에 효과를 나타냄을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

[19]

과제 해결 수단

- [20] 본 발명의 하나의 목적은 엘리오카퍼스 페티오라투스(*Elaeocarpus petiolatus*) 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [21] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [22] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 엘리오카퍼스 페티오라투스(*Elaeocarpus petiolatus*) 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[23]

발명의 효과

- [24] 본 발명의 엘리오카퍼스 페티오라투스(*Elaeocarpus petiolatus*) 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 조성물은 리지스틴-궤1의 결합을 억제하여 중앙괴사인자의 생성을 저해함으로써 심혈관의 염증을 저해하는 활성을 가지는 바, 심혈관대사질환의 예방 또는 치료 용도로서 유용하게 사용될 수 있다.

[25]

도면의 간단한 설명

- [26] 도 1은 엘리오카퍼스 페티오라투스 잎 추출물 및 용매분획물들의 UPLC-QTOF-MS 크로마토그램이다.
- [27] 도 2a는 엘리오카퍼스 페티오라투스 잎의 부탄올 및 물층을 컬럼을 이용하여 분획한 그림이다.
- [28] 도 2b는 엘리오카퍼스 페티오라투스 잎의 부탄올 및 물층을 컬럼을 이용하여 분획한 각 분획의 크로마토그램이다.
- [29] 도 3은 대량 채집한 엘리오카퍼스 페티오라투스 잎의 부탄올 및 물층을 컬럼분획한 각 분획의 크로마토그램이다.
- [30] 도 4a는 대량 채집한 엘리오카퍼스 페티오라투스 잎의 부탄올 및 물층에서 단일물질을 분리한 모식도이다.
- [31] 도 4b는 대량 채집한 엘리오카퍼스 페티오라투스 잎의 부탄올 및 물층에서 분리된 단일성분의 크로마토그램이다.
- [32] 도 5a는 엘리오카퍼스 페티오라투스 잎 추출물 및 용매분획물의 리지스틴-궤1(Resistin-CAP1) 결합에 대한 저해 활성이다.
- [33] 도 5b는 엘리오카퍼스 페티오라투스 잎의 부탄올 및 물층으로부터 얻은 컬럼분획물에 대해 실시한 리지스틴-궤1 결합저해 활성이다.
- [34] 도 5c는 대량 채집한 엘리오카퍼스 페티오라투스 잎의 부탄올 및 물층에서 분리된 단일성분을 처리한 리지스틴-궤1 결합저해 활성이다.

- [35] 도 6a는 리지스틴-마우스를 이용한 심혈관대사질환에서 엘리오카퍼스 페티오라투스(*Elaeocarpus petiolatus*)의 저해효과를 측정한 방법의 모식도이다.
- [36] 도 6b는 리지스틴-마우스를 이용한 심혈관대사질환모델에서 엘리오카퍼스 페티오라투스의 플라크(plaque) 저해효과이다.
- [37] 도 6c는 리지스틴-마우스를 이용한 심혈관대사질환모델에서 엘리오카퍼스 페티오라투스가 혈액 내 지방에 미치는 영향을 분석한 것이다.
- [38] 도 6d는 리지스틴-마우스 엘리오카퍼스 페티오라투스 처리 군의 체중변화를 나타낸 것이다.
- [39] 도 7a는 엘리오카퍼스 페티오라투스와 엘리오카퍼스 가니트리스 시료에 대한 크로마토그램이다.
- [40] 도 7b는 엘리오카퍼스 페티오라투스와 엘리오카퍼스 가니트리스 시료의 THP-1 세포에서 리지스틴에 의한 TNF- α 생성 저해활성을 비교한 것이다.
- [41] 도 8은 엘리오카퍼스 페티오라투스 유래 화합물과 그 모체화합물의 TNF- α 생성저해 활성을 비교한 것이다.

[42]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [43] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[44]

- [45] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 엘리오카퍼스 페티오라투스(*Elaeocarpus petiolatus*) 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [46] 본 발명에서는, 엘리오카퍼스 페티오라투스(*Elaeocarpus petiolatus*) 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물이 심혈관 대사 질환의 발병 또는 악화를 야기하는 리지스틴-렐1(Resistin-CAP1)결합 억제 효과 및 염증반응 억제효과를 확인하여, 상기 엘리오카퍼스 페티오라투스(*Elaeocarpus petiolatus*) 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물이 심혈관 대사 질환의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[47]

- [48] 본 발명의 용어, “엘리오카퍼스 페티오라투스(*Elaeocarpus petiolatus*)”란 엘리오카퍼스(*Elaeocarpus*) 속으로 열대와 아열대 지방의 상록 나무와 관목으로 인도, 말레이시아, 중국 남부, 일본, 호주, 뉴질랜드, 피지, 하와이 등에 많이 분포하고 있는 식물로, 항산화 효과 및 항염효과를 나타낸다는 것은 공지 되었으나, 심혈관 대사 질환과 관련한 효과는 알려진 바 없으며, 본 발명자들에

의해 최초로 규명되었다.

- [49] 상기 엘리오카퍼스 페티오라투스의 잎, 줄기, 꽃, 뿌리 또는 이들의 조합이 사용될 수 있으나, 바람직하게는 엘리오카퍼스 페티오라투스의 잎을 사용할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [50] 상기 엘리오카퍼스 페티오라투스는 상업적으로 판매되는 것을 구입하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있다.
- [51] 상기 엘리오카퍼스 페티오라투스의 원산지 또는 자생지는 중국, 베트남, 말레이시아 등일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [52] 또한, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 엘리오카퍼스 속(genus *Elaeocarpus*)의 식물인 엘리오카퍼스 페티오라투스(*E. petiolatus*) 및 엘리오카퍼스 가니트루스(*E. ganitrus*)와의 TNF- α 생성저해 효과를 비교한 결과, 엘리오카퍼스 가니트루스 추출물의 경우 TNF- α 생성저해 효과가 나타나지 않은 반면, 엘리오카퍼스 페티오라투스 추출물 처리시 농도의존적인 TNF- α 생성저해 효과를 확인할 수 있었다(도 7b). 또한, 이 결과로서 엘리오카퍼스 속의 식물 중 특히 엘리오카퍼스 페티오라투스가 리지스틴- κ 1 저해활성효능을 가짐으로 인해 심혈관 대사 질환의 치료용도로 사용 가능함을 확인할 수 있었다.
- [53]
- [54] 본 발명의 용어 “추출물”은 상기 엘리오카퍼스 페티오라투스를 추출하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 희석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다.
- [55] 상기 엘리오카퍼스 페티오라투스를 추출하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 상기 추출 방법의 비제한적인 예로는, 열수추출법, 초음파추출법, 여과법, 환류 추출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다.
- [56] 본 발명에서, 상기 엘리오카퍼스 페티오라투스를 추출하는데 사용되는 추출 용매의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다.
- [57] 상기 추출용매의 비제한적인 예로는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 또는 이들의 혼합용매 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 사용되거나 1종 이상 혼합하여 사용될 수 있다. 구체적으로 에탄올 및 물의 혼합용매가 사용될 수 있으며, 상기 에탄올 10 내지 100%(v/v)일 수 있지만 이에 제한되지 않는다.
- [58] 본 발명에서, 상기 엘리오카퍼스 페티오라투스 추출물은 엘리오카퍼스 페티오라투스 잎의 에탄올 수용액 추출물인 것일 수 있다.
- [59] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 엘리오카퍼스 페티오라투스의 추출물에 대하여 리지스틴- κ 1 결합저해 활성을 확인하였고(도 5a), 리지스틴에 의한 TNF- α 생성 저해효과를 확인할 수 있었다(도 7b).

- [60] 상기 결과를 통해 엘리오카퍼스 페티오라투스의 추출물이 심혈관 대사 질환의 치료용도로 사용 가능함을 확인할 수 있었다.
- [61]
- [62] 본 발명의 용어, “분획물”은 여러 다양한 구성 성분들을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 성분 그룹을 분리하기 위하여 분획을 수행하여 얻어진 결과물을 의미한다.
- [63] 본 발명에서, 상기 엘리오카퍼스 페티오라투스의 분획물을 얻는 분획 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 수행될 수 있다. 상기 분획 방법의 비제한적인 예로는, 다양한 용매를 처리하여 수행하는 용매 분획법, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 수행하는 한외여과 분획법, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)를 수행하는 크로마토그래피 분획법, 및 이들의 조합 등이 있다. 구체적으로, 본 발명의 엘리오카퍼스 페티오라투스를 추출하여 얻은 추출물에 소정의 용매를 처리하여 상기 추출물로부터 분획물을 얻는 방법을 들 수 있다.
- [64] 본 발명에서 상기 분획물을 얻는데 사용되는 분획 용매의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다.
- [65] 상기 분획 용매의 비제한적인 예로는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 등의 극성 용매; 헥산(Hexan), 에틸 아세테이트(Ethyl acetate) 등의 비극성 용매; 또는 이들의 혼합용매 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 1종 이상 혼합하여 사용될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [66] 구체적으로, 상기 분획용매는 헥산(hexane), 클로로포름(CHCl_3), 에틸아세테이트(EA), 부탄올(BuOH) 또는 물 (DW)으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 보다 구체적으로 부탄올 및 물일 수 있다.
- [67] 또한, 상기 추출물 또는 분획물은 추출 후 건조 분말 형태로 제조되어 사용될 수 있지만, 이제 제한되는 것은 아니다
- [68] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 엘리오카퍼스 페티오라투스의 용매 분획물에 대하여 리지스틴-켈1 결합 저해활성을 확인하였고, 특히 부탄올 및 물층에서 결합 저해 효과가 뛰어남을 확인할 수 있었다(도 5a). 또한, 상기 용매분획물 중 부탄올 및 물층을 컬럼분획한 컬럼분획물 1-12에서 리지스틴-켈1 결합저해 활성을 확인할 수 있었으며, 특히 7-12번 컬럼분획물의 효과가 뛰어남을 확인할 수 있었다(도 5b).
- [69] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 심혈관 대사 질환모델에서 엘리오카퍼스 페티오라투스의 부탄올 및 물층 분획물의 플라크(plaque)저해효과를 확인하였으며(도 6b), 혈액 내의 중성지방(TG) 및 저밀도지질단백콜레스테롤(LDL-C)의 감소효과 및 고밀도지질단백콜레스테롤(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)의 증가효과를 확인할 수 있었다(도 6c).

- [70] 본 발명의 또 다른 구체적인 일 실시예에서는, 엘리오카퍼스 페티오라투스의 부탄올 및 물층 분획물의 리지스틴에 의한 TNF- α 생성 저해효과를 확인할 수 있었다(도 7b).
- [71] 상기와 같은 결과를 통하여, 엘리오카퍼스 페티오라투스의 분획물이 심혈관 대사 질환의 치료용도로 사용 가능함을 확인할 수 있었다.
- [72]
- [73] 본 발명의 용어, “엘리오카퍼스 페티오라투스로부터 분리된 화합물”이란
- [74] 상기 엘리오카퍼스 페티오라투스로부터 분리된 단일화합물 또는 단일물질의 의미하는 것으로, 수득방법은 통상의 방법에 의할 수 있다. 구체적으로, 엘리오카퍼스 페티오라투스의 추출물 또는 분획물로부터 단일화합물을 수득할 수 있으며, 바람직하게는 부탄올 및 물을 분획용매로 사용한 분획물로부터 수득할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [75] 이때, 상기 엘리오카퍼스 페티오라투스의 추출물 또는 분획물은 엘리오카퍼스 페티오라투스의 잎으로부터 수득된 추출물 또는 분획물 일 수 있다.
- [76] 상기 분리된 화합물은 메틸갈레이트-O-헥소사이드(Methylgallate-O-hexoside), 미리세틴-3-O-a-L-람노사이드(Myricetin-3-O-a-L-rhamnoside), 엘라그산(Ellagic acid), 이소람네티-3-O-b-D-헥소사이드(Isorhamnetin-3-O-b-D-hexoside), 또는 갈산(gallic acid) 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [77] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 대량채집한 엘리오카퍼스 페티오라투스의 잎의 부탄올 및 물층에서 분리된 화합물의 리지스틴- κ 1 결합저해 효과를 확인할 수 있었다(도 5c).
- [78] 상기 결과로 인하여, 엘리오카퍼스 페티오라투스로부터 분리된 화합물이 심혈관 대사 질환의 치료용도로 사용 가능함을 확인할 수 있었다.
- [79]
- [80] 본 발명의 용어 “심혈관 대사 질환”이란, 생체내의 당질, 지질 등의 대사 불균형에 의해 발생하는 질환을 의미하는 것으로, 심혈관 질환 및 대사성 질환을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [81] 상기 “심혈관 질환”은 심장과 주요 동맥에 발생하는 질환으로, 주요 질병으로는 고혈압, 협심증, 심근경색증, 동맥경화증, 죽상경화증, 뇌졸중, 부정맥 등이 있으며, 혈관 내 콜레스테롤의 축적(총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, 중성지방의 증가, HDL 콜레스테롤의 감소)이 대표적인 원인으로 꼽힐 수 있다.
- [82] 상기 “대사성 질환”은 특별히 제한되지 않으나, 당질 대사 이상 또는 지질 대사 이상에 의한 대사성 질환을 포함할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 용어 “당질 대사 이상에 의한 대사성 질환”이란 생체 내 당질의 대사과정에 있어서 발생한 불균형에 의한 질환을 말하는 것으로서, 특별히 이에 제한되지 않으나, 당뇨병, 당뇨병전증, 2형 당뇨병 등을 포함할 수 있다. 또한, 구체적으로, “지질 대사 이상에 의한 대사성 질환”이란 생체 내 지질의 대사과정에 있어서 발생한

불균형에 의한 질환을 말하는 것으로서, 특별히 이에 제한되지 않으나, 심혈관 질환과 이상지질혈증, 비만 등을 포함할 수 있다.

[83] 본 발명의 용어, “동맥경화증”은 혈관이 좁아지거나 막히게 되어 그 혈관이 말초로의 혈류장애를 일으키는 질환을 의미한다. 상기 동맥 경화증은 관상동맥경화증 및 죽상동맥경화증을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 리지스틴(Resistin)은 염증을 유도하는 아디포카인(adipokine)의 일종으로 알려져 있으며, 동맥경화증에서는 인간의 대식세포에서 트리글리세롤의 저장을 지방합성(re-esterification)과 지방분해(lipolysis)를 통하여 유도하며, 콜레스테릴 에스테르(cholesteryl ester)의 침착(deposition)을 증가시킨다고 알려져 있다. 또한, 최근 리지스틴의 수용체인 CAP1 단백질과 결합하여 NF- κ B를 활성화시켜 세포신호전달체계를 활성화시켜 염증을 유발하여 TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인의 분비를 촉진시킴으로써, 염증을 유발된다고 알려져 있어, 리지스틴- κ 1의 결합 억제제가 동맥경화증의 예방 또는 치료에 중요한 역할을 할 수 있다.

[84] 본 발명의 일 구체예에서는, 죽상동맥경화 플라크(atherosclerotic plaque) 감소로 동맥경화와 같은 심혈관대사질환에 효과가 있음을 확인할 수 있었으며, 중성지방, 저밀도지질단백콜레스테롤의 감소 및 고밀도지질단백콜레스테롤의 증가효과를 확인함에 따라 심혈관 대사질환의 치료효과를 확인할 수 있었다.

[85] 본 발명의 용어, “이상지질혈증”은 혈중에 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 또는 중성지방이 증가된 상태거나, HDL-콜레스테롤이 감소된 상태를 의미한다. 구체적인 예로, 고지혈증, 고콜레스테롤혈증 또는 고중성지방혈증 등이 여기에 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[86] 본 발명의 일 구체예에서는 상기 약학적 조성물의 중성지방, 저밀도지질단백콜레스테롤의 감소 및 고밀도지질단백콜레스테롤의 증가효과를 확인함에 따라 이상지질혈증에도 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[87] 또한, 몸무게의 감소효과 또한 확인할 수 있어 심혈관대사질환으로 인한 비만의 예방 효과 또한 확인할 수 있었다.

[88]

[89] 본 발명에서, 상기 엘리오카퍼스 페티오라투스 추출물, 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 리지스틴- κ 1의 결합을 억제하는 것일 수 있다. 상기 엘리오카퍼스 페티오라투스 추출물, 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물은 심혈관대사질환의 발병 또는 악화를 야기하는 리지스틴- κ 1의 결합을 억제하는 효과를 나타내며, NF- κ B 활성 저해 및 TNF- α 의 생성저해 효과를 나타내므로, 심혈관대사질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[90]

[91] 본 발명의 용어, “치료”는 상기 엘리오카퍼스 페티오라투스 추출물, 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 투여로

심혈관대사질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

- [92] 본 발명의 용어, “예방”은 상기 엘리오카퍼스 페티오라투스 추출물, 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 투여로 심혈관대사질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[93]

- [94] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 엘리오카퍼스 페티오라투스 추출물, 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물이 리지스틴-켈1의 결합을 억제할 수 있음을 확인하였고(도 5c), 사이토카인 TNF- α 의 생성억제 효능을 확인하였다(표 3).

- [95] 또한, 리지스틴-켈1의 저해활성을 나타낸 시료에 대하여 리지스틴에 의해 유도되는 TNF- α 의 저해활성 효과를 확인하여 상기 TNF- α 생성억제는 리지스틴-켈1의 결합저해로 인한 것임을 확인할 수 있었다.

- [96] 또한, 다른 구체적인 일 실시예에서, 심혈관대사질환 마우스 모델(리지스틴 마우스)에서 혈액내의 TG와 LDL의 양을 감소시키고, HDL의 양을 증가시킴을 확인 하여 심혈관대사질환 저해효과를 확인할 수 있었다(도 6c).

- [97] 이는, 상기 엘리오카퍼스 페티오라투스 추출물, 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물은 리지스틴-켈1의 결합을 억제하여 TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인의 분비를 저해 효과를 확인함으로써, 상기 엘리오카퍼스 페티오라투스 추출물, 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 본 발명의 조성물은 심혈관대사질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[98]

- [99] 본 발명의 약학적 조성물은 조성물의 총 중량에 대하여 상기 엘리오카퍼스 페티오라투스 추출물, 분획물을 0.1~1000 μ g/mL, 구체적으로 0.1~200 μ g/mL, 0.1~100 μ g/mL으로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [100] 본 발명의 약학적 조성물은 조성물의 총 중량에 대하여 엘리오카퍼스 페티오라투스로부터 분리된 화합물을 0.1~1000 μ g/mL, 구체적으로 0.1~20 μ g/mL으로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[101]

- [102] 또한, 상기 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있고, 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occurring carrier)를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 구체적인 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[103] 또한, 상기 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조제 및 좌제으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 사용될 수 있으며, 상기 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제 등이 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 사용될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 또는 좌제 등이 사용될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[104]

[105] 다른 하나의 양태는 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 심혈관대사질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[106] 이때, 상기 “심혈관대사질환”, “예방” 및 “치료”의 정의는 전술한 바와 같다.

[107] 본 발명의 용어, “투여”는 적절한 방법으로 개체에게 상기 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미한다.

[108] 본 발명의 용어, “개체”는 심혈관대사질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 상기 동물은 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 예방 또는 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[109]

[110] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.

[111] 상기 용어, “약학적으로 유효한 양”은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[112] 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여할 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여할 수 있다. 또한,

단일 또는 다중 투여할 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [113] 또한, 상기 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 구체적인 예로, 상기 약학적 조성물은 일반적으로 1일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있으나, 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[114]

- [115] 또 다른 하나의 양태는 엘리오카퍼스 페티오라투스(*Elaeocarpus petiolatus*) 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는, 심혈관대사질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

- [116] 이때, 상기 “엘리오카퍼스 페티오라투스”, “추출물”, “분획물”, “분리된 화합물”, “심혈관대사질환” 및 “예방”의 정의는 전술한 바와 같다.

- [117] 본 발명의 식품 조성물은 일상적으로 섭취하는 것이 가능하며, 일반약품과는 달리 천연물을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있으므로, 심혈관대사질환의 예방 또는 개선 목적으로 매우 유용하게 사용될 수 있다.

- [118] 본 발명의 용어, “개선”은 상기 식품 조성물의 섭취로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[119]

- [120] 본 발명의 용어, “식품”은 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 건강기능식품 및 건강식품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.

- [121] 상기 건강기능(성)식품(health functional food)은 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다.

- [122] 여기서 ‘기능(성)’은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 상기 건강식품(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)은 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강기능식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 혼용될 수 있다.

- [123] 구체적으로, 상기 건강기능식품은 엘리오카퍼스 페티오라투스(*Elaeocarpus petiolatus*) 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 음료, 차류,

향신료, 껌, 과자류 등의 식품 소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용이 없는 장점이 있다.

- [124] 본 발명의 식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다.
- [125] 또한, 상기 식품 조성물은 식품으로 인정되는 제형이면 다양한 형태의 제형으로 제한 없이 제조될 수 있다.
- [126] 또한, 상기 식품 조성물은 식품학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다.
- [127] 또한, 상기 식품 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크롬(Cr) 등의 미네랄; 및 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [128] 또한, 상기 식품 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(돌신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별하고 적절한 양으로 사용할 수 있다.
- [129]
- [130] 본 발명의 목적을 위한 또 다른 하나의 양태는 엘리오카퍼스 페티오라투스 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는, 심혈관대사질환의 예방 또는 개선용 의약외품을 제공한다.
- [131] 상기 “엘리오카퍼스 페티오라투스”, “추출물”, “분획물”, “분리된 화합물”, “심혈관대사질환”, “예방” 및 “개선”의 정의는 전술한 바와 같다.
- [132] 본 발명에서 사용되는 용어 “의약외품”은 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것 및 사람이나 동물의 구조와 기능에 약리학적 영향을 줄 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것을 제외한 물품을 의미한다.
- [133] 본 발명에서 상기 의약외품 조성물은 심혈관질환의 예방 또는 개선 효과를

가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [134] 본 발명의 의약품 조성물에는 상기 성분 외에 필요에 따라 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더욱 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제는 본 발명의 효과를 해하지 않는 한 제한되지 않으며, 예를 들어 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제, 윤활제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다.
- [135] 상기 "약학적으로 허용 가능한 담체"는 생물체를 자극하지 않으면서, 주입되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체, 부형제 또는 희석제를 의미할 수 있으며, 구체적으로, 비자연적 담체(non-naturally occurring carrier)일 수 있다. 본 발명에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충식염수, 알부민 주사 용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [136] 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 상기 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있으나, 바람직하게는 경구의 제형일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 구체적으로, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 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.
- [137] 본 발명의 의약품 조성물은 소독 청결제, 샤워폼, 연고액, 물티슈, 코팅제 등을 예시할 수 있으나 이에 제한되는 것이 아니며, 의약품의 제제화 방법, 용량, 이용방법, 구성성분 등은 기술분야에 공지된 통상의 기술로부터 적절히 선택될 수 있다.
- [138]
- [139] 본 발명의 목적을 위한 또 다른 하나의 양태는 심혈관질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 엘리오카퍼스 페티오라투스 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터

분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

[140] 상기 “엘리오카퍼스 페티오라투스”, “추출물”, “분획물”, “분리된 화합물”, “심혈관대사질환”, “치료”, “예방” 및 “개선”의 정의는 전술한 바와 같다.

[141]

[142] 본 발명의 목적을 위한 또 다른 하나의 양태는 심혈관질환을 예방 또는 치료하는 의약을 제조하기 위한, 엘리오카퍼스 페티오라투스 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

[143]

[144] 본 발명의 목적을 위한 또 다른 하나의 양태는 심혈관질환을 개선 또는 예방하는 식품을 제조하기 위한, 엘리오카퍼스 페티오라투스 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

[145]

[146] 본 발명의 목적을 위한 또 다른 하나의 양태는 심혈관질환을 개선 또는 예방하는 의약외품을 제조하기 위한, 엘리오카퍼스 페티오라투스 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

[147]

발명의 실시를 위한 형태

[148] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예 및 실험예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 실시예 및 실험예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[149]

[150] 실시예 1. 엘리오카퍼스 페티오라투스(*Elaeocarpus petiolatus*)의 용매분획물 제조 및 UPLC 분석

[151]

[152] 엘리오카퍼스 페티오라투스 잎으로부터 에탄올 수용액으로 얻은 추출물 234.1g을 생리활성 분획법을 이용하여 헥산(hexane, 40.3g), 클로로포름(CHCl_3 , 11.9g), 에틸아세테이트(EA, 18.9g), 부탄올(BuOH, 45.9g), 물(DW, 95.0g) 층으로 분획하여 총 5개의 분획물을 얻었다. 엘리오카퍼스 페티오라투스 잎 추출물(추출용매: 95% 에탄올)의 활성 지표물질의 정성분석을 위한 UPLC 분석은 BEH C18 (2.1 X 100mm, 1.7mm) 컬럼관과 PDA 검출기(200-600nm, max plot)를 장착한 ACQUITY UPLC Ultra Performance를 사용하였고, 유속은 0.4 mL/min로 0.1% formic acid가 포함된 증류수와 acetonitrile을 사용하여 수행하였다(표 1 및 도 1 참조).

[153] [표1]

엘리오카퍼스 페티오라투스 잎 추출물의 UPLC-PDA-QTOF-MS 조건

UPLC conditions		
Time (min)	A (%) 0.1% Formic acid/D.W.	B (%) 0.1% Formic acid/ACN
0	90	10
1.0	90	10
12.0	2	98
13.4	2	98
13.5	90	10
15.0	90	10

QTOF Mass conditions	
Desolvation gas	N ₂
Desolvation flow rate	500 L/h
Desolvation temperature.	350 ° C
Source temperature	100 ° C
Capillary voltage	2300 V
Con voltage	50 V
Scan mode	Negative
<i>m/z</i> range	100-1500

[154]

[155] 실시예 2. 엘리오카퍼스 페티오라투스 잎 추출물로부터 UPLC를 이용한 순수 단일물질 분리 및 분석

[156]

- [157] 상기 실시예 1에서 얻은 분획물 중 활성이 나타난 유효분획물(BuOH 및 물층)을 MPLC를 이용하여 분획물을 제조 후, bioassay-guided fractionation을 통하여 생리활성을 나타내는 물질을 분리 하였다. 부탄올과 물(DW)층을 SPOT PREP II 250 (MPLC, armen)기기에 2X25cm에 YMC-Pack ODS AQ-HG, 10mM를 충전한 컬럼관에 로딩한 후 MeOH-H₂O를 혼합용매 (0-60min, 0-100%; 60-90min, 100%)를 이동상으로 하여 MeOH의 비율을 순차적으로 높여가며 UV 검출기(254nm)에 확인되는 컬럼크로마토그래피를 실시하였으며, bioassay-guided fractionation를 통하여 생리활성 컬럼분획물 총 12개(Fr. 1-12)를 얻었다(도 2a 및 도 2b).
- [158] 또한, 단일물질을 분리하기 위하여 엘리오카퍼스 페티오라투스 잎을 대량으로 채집하여 부탄올 층(BuOH) 및 물 층(DW)을 확보하였으며, 이로부터 컬럼을 통하여 7개의 분획으로 나누고 HPLC를 통한 분석을 진행하였으며(도 3), 이로부터 단일물질을 도 4a의 방법으로 분리하였다. 분리된 단일물질은 6종의 화합물로서 분광학적 자료를 통하여 화합물명을 결정하였으며(표 2), 분리된 화합물들의 크로마토그램은 도 4b와 같다.
- [159]
- [160] [표2]
대량 채집한 엘리오카퍼스 페티오라투스의 BuOH 및 DW층에서 분리된 화합물 6종의 분광학적 자료

Peak	Fraction	UV Rt (min)	UV (nm)	화합물명
Peak 1	EP_BuOH+DW_4 A	3.48	216, 271	Gallic acid
Peak 2	EP_BuOH+DW_2 B	3.48	221, 271	Gallic acid
Peak 3	EP_BuOH+DW_2 CEP_BuOH+DW_ 2D	3.95	221, 274	Methylgallate-O-hexoside
Peak 13	EP_BuOH+DW_5 E2	5.21	231, 259, 350	Myricetin-3-O-a-L-rhamnosid e
Peak 14	EP_BuOH+DW_6 D	5.15	255, 367	Ellagic acid
Peak 16	EP_BuOH+DW_6 E	5.55	226, 263, 331	Isorhamnetin-3-O-b-D-hexosi de

[161]

[162] **실시예 3. 리지스틴-궤1 결합저해 활성(Resistin-CAP1 competitive binding assay)**

[163]

[164] 엘리오카퍼스 페티오라투스 추출물 및 분획물이 리지스틴-궤1 결합을 직접적으로 억제하는지를 확인하기 위하여 추출물 및 분획물 시료를 효소면역학적방법을 이용하여 확인하였다.

[165] 제조합 CAP-1 단백질을 면역분석용 플레이트에 밤새 부착시키고, 세척한 후, 1% BSA/PBS용액으로 다른 단백질의 부착을 차단시키고, mouse Fc가 부착된 recombinant 리지스틴과 시료를 1시간동안 미리 반응시킨 후, 이 용액을 플레이트에 분주하여, 상온에서 2시간동안 반응시켰다. 이 플레이트를 세척한 후, CAP-1에 결합된 Resistin의 mFc에 부착하는 HRP를 분주하여 1시간동안 반응시켰다. 이를 세척한 후, 기질을 분주하여 HRP에 의해 30분간 반응시킨 후, 마이크로플레이트 측정기로 450nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[166] CAP-1에 mFc-Resistin을 결합시킨 군의 흡광도를 100%로 하여, 화합물에 의한 리지스틴-궤1 결합 저해율을 계산하였다.

[167] 그 결과, 엘리오카퍼스 페티오라투스 추출물의 경우 리지스틴-궤1 결합저해 효과가 뛰어난 것을 확인할 수 있었다(도 5a).

[168] 또한, 엘리오카퍼스 페티오라투스 용매분획물 중에서는 부탄올 및 물층이 리지스틴-궤1 결합저해효과가 가장 우수함을 확인하였다(도 5a).

[169] 상기 부탄올 및 물층의 생리활성 컬럼분획물을 시료로 사용한 경우에는, 13개의 컬럼분획물 중 7-12번에 해당되는 컬럼분획물이 강한 리지스틴-궤1 결합저해효과를 나타냄을 확인할 수 있었다(도 5b).

[170] 또한, 엘리오카퍼스 페티오라투스 잎을 대량으로 채집하여 확보한 부탄올 및 물층 분획물에서 분리한 단일화합물 역시 리지스틴-궤1 결합저해활성 효과를 확인할 수 있었으며, 단일화합물인 메틸갈레이트-O-헥소사이드(Methylgallate-O-hexoside, 2C, 2D), 미리세틴-3-O-a-L-람노사이드(Myricetin-3-O-a-L-rhamnoside, 5E2), 엘라그산(Ellagic acid, 6D) 및 이소람네틴-3-O-b-D-헥소사이드(Isorhamnetin-3-O-b-D-hexoside, 6E) 에서 모두 농도의존적으로 리지스틴-궤1 결합저해 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다(도 5c).

[171] 상기 결과로, 엘리오카퍼스 페티오라투스의 추출물, 분획물 및 이로부터 분리한 단일화합물에 대한 리지스틴-궤1 결합저해 효과를 확인할 수 있었다.

[172]

[173] **실시예 4. 사이토카인 생성 저해 활성**

[174]

[175] 엘리오카퍼스 페티오라투스의 추출물, 분획물 및 이로부터 분리한 단일화합물에 대하여 리지스틴-궤1의 결합에 의해 유도되는 염증 억제효과를

알아보기 위하여 TNF- α assay를 수행하였다.

[176] THP-1 세포(human monocyte)를 소태아혈청 (Fetal Bovine Serum, FBS)을 10% 첨가한 RPMI (Welgene, 한국) 배지에서 배양하였으며, 리지스틴으로 유도된 TNF- α 생성에 대한 시료의 억제율을 측정하였다. THP-1 세포를 5×10^5 개/mL 농도로 현탁하여 96-웰 플레이트에 100 μ l씩 접종한 후, 시료를 각각 5 μ M의 농도로 처리하였다. 1시간 동안 배양한 후, 2 μ g/mL의 human recombinant Resistin(Biovision)을 처리하여 6시간 동안 더 배양하였다. 그 후, 상등액을 회수하여 -70°C에 보관하였다.

[177] TNF- α assay를 위하여 Human TNF- α ELISA kit(BD bioscience)를 사용하였으며, 제조사의 프로토콜에 따라 분석하였다.

[178] 상기 실시예 3의 도 5b에서 리지스틴-캘1의 결합저해활성을 확인할 수 있었던, 엘리오카퍼스 페티오라투스의 부탄올 및 물층의 컬럼분획물 12개 중 특히 효과가 뛰어난 7~12번에 대하여 리지스틴에 의해 유도되는 TNF- α 의 저해활성을 측정하였다(표 3).

[179] 상기 결과, 표 3과 같이 모두 10 μ g/mL의 농도로 처리하였을 때 50%이상의 저해효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[180] 또한, 엘리오카퍼스 페티오라투스의 대량채집하여 확보한 부탄올 및 물층에서 분리한 단일화합물에 대한 리지스틴에 의해 유도된 TNF- α 에 대한 저해효과를 확인하였다. 그 결과, 3개 화합물(Myricetin-3-O-a-L-rhamnoside, Ellagic acid 및 Isorhamnetin-3-O-b-D-hexoside)에서 모두 TNF- α 생성 저해효과를 나타냄을 확인하였다(표 4).

[181] 상기 결과로 인하여, 엘리오카퍼스 페티오라투스의 추출물, 분획물 및 이로부터 분리한 단일화합물에 대한 리지스틴-캘1의 결합저해를 통한 TNF- α 의 저해활성효과를 확인할 수 있었다.

[182]

[183] [표3]

엘리오카퍼스 페티오라투스의 부탄올 및 물층 컬럼분획물의 TNF- α 저해효과

시료명	μ g/mL	RETN	TNF- α 저해율 (% , 평균 $\pm$ 표준편차)
부탄올+물층	10	+	61.52 $\pm$ 4.40
Fr.7	10	+	76.48 $\pm$ 1.98
Fr.8	10	+	83.85 $\pm$ 4.01
Fr.9	10	+	84.23 $\pm$ 2.60
Fr.10	10	+	73.76 $\pm$ 6.84
Fr.11	10	+	79.20 $\pm$ 0.51
Fr.12	10	+	70.19 $\pm$ 1.51

[184] [표4]

엘리오카퍼스 페티오라투스에서 분리한 화합물의 TNF- α 저해효과

시료	$\mu\text{g/mL}$	RETN	TNF- α 저해율(%, 평균 $\pm$ 표준편차)
Myricetin-3-O-α-L-rhamnoside (5E2)	5	+	28.57 $\pm$ 6.79
	10	+	24.13 $\pm$ 3.31
	20	+	33.64 $\pm$ 9.21
Ellagic acid (6D)	5	+	16.40 $\pm$ 5.12
	10	+	27.44 $\pm$ 4.50
	20	+	-18.61 $\pm$ 3.16
Isorhamnetin-3-O-β-D-hexoside (6E)	5	+	43.06 $\pm$ 10.44
	10	+	51.29 $\pm$ 5.76
	20	+	59.53 $\pm$ 9.02

[185]

[186] 실시예 5. 세포생존율 조사

[187]

[188] 엘리오카퍼스 페티오라투스의 분획물 및 이로부터 분리한 화합물 시료가 세포생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여, THP-1 세포를 1×10^5 개/mL의 농도로 현탁하여 100 μL 씩 96-웰 플레이트에 접종하였다. 1시간 후에 시료를 각각 5 μM 의 농도로 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후, CytoX (엘피에스솔루션, Korea) 용액을 웰당 5 μL 씩 첨가하여 4시간 더 배양하였다. 그 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 DMSO를 처리한 음성대조군 값을 100%로 하여 하기 수식식에 따라 계산하였다.

[189] 그 결과, 엘리오카퍼스 페티오라투스의 부탄올 및 물층에 대한 분획물 및 부탄올 및 물층에 대한 컬럼분획물 12개 중 리지스틴-깁1 결합저해 효과가 뛰어났던 7~12번 컬럼분획물은 각각 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 세포생존율에 영향을 미치지 않음을 확인하였다(표 5).

[190]

[191] [표5]

엘리오카퍼스 페티오라투스의 부탄올 및 물층 컬럼분획물이 세포생존율에 미치는 영향

시료명	$\mu\text{g/mL}$	Viability (% , 평균 $\pm$ 표준편차)
대조군	0	100.00 $\pm$ 3.86
BUOH+DW	10	101.62 $\pm$ 3.15
Fr.7	10	104.17 $\pm$ 6.51
Fr.8	10	106.07 $\pm$ 7.45
Fr.9	10	102.85 $\pm$ 6.06
Fr.10	10	99.36 $\pm$ 3.27
Fr.11	10	101.70 $\pm$ 3.67
Fr.12	10	99.33 $\pm$ 3.08

[192]

[193] 또한, 대량채집한 엘리오카퍼스 페티오라투스의 부탄올 및 물층에서 분리된 단일화합물이 THP-1 세포의 생존율에 미치는 영향을 조사한 결과, 표 6에서 볼 수 있듯이, 2.5~20 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 세포생존율에 크게 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다(표 6).

[194]

[195] [표6]

엘리오카퍼스 페티오라투스에서 분리한 화합물이 세포생존율에 미치는 영향

시료명	μg/mL	Viability (% , 평균±표준편차)	
대조군	0	100.00	± 0.93
Myricetin-3-O-α-L-rhamnoside (5E2)	2.5	99.54	± 3.22
	5	106.14	± 0.93
	10	98.85	± 1.07
	20	100.12	± 0.64
Ellagic acid (6D)	2.5	96.89	± 0.05
	5	98.73	± 0.91
	10	94.38	± 0.13
	20	89.21	± 1.01
Isorhamnetin-3-O-β-D-hexoside (6E)	2.5	101.71	± 4.56
	5	101.88	± 0.10
	10	95.02	± 0.20
	20	94.72	± 0.28

[196]

[197] 실시예 6. 리지스틴-마우스 모델에서 엘리오카퍼스 페티오라투스의 심혈관대사질환 저해효과

[198] 실시예 6-1. 심혈관대사질환 모델 마우스 제작(리지스틴 마우스)

[199] 심혈관대사질환 모델 마우스를 제작하기 위하여 6-8주령 리지스틴 마우스의 경동맥(carotid artery)에 ligation을 하여 mechanic한 스트레스를 주어 염증, 혈전증(thrombosis), 산화적 스트레스 및 shear stress를 유발시키고, 외경동맥(external carotid, EC)의 기능과 구조를 변화시켜 죽상동맥경화증 모델(atherosclerosis model)을 제작하였다(Cho et al., 2011).

[200] 구체적으로, 고지방 식이를 1주일 한 쥐에게 경동맥 ligation을 하는 것으로, 복강 마취 후 LCA(Left common carotid artery)에 대해 ligation을 수행하였다. LCA에 있는 세 개의 branches, 외경동맥(External carotid artery, ECA), 내경동맥(internal carotid artery, ICA), 후두동맥(Occipital artery, OA) 이 세 곳의 branches를 partial ligation 해주고, 이 때 ICA와 OA를 ligation하고 ECA를 따로 ligation을 하였다. Ligation을 수행한 마우스는 심장으로 가는 혈액흐름의 양이 줄고 방향이 바뀌게 되어 죽상동맥경화증 모델을 제작하였다 (도 6a).

[201]

[202] 실시예 6-2. 심혈관대사질환 모델 마우스에서 엘리오카퍼스 페티오라투스의

심혈관대사질환 저해효과 확인

- [203] 상기 제작한 심혈관대사질환 모델 마우스에 AAV-PCSK9 Virus(1×10^{11} ifu/mL)와 엘리오카퍼스 페티오라투스($30 \mu\text{g/g/day}$)을 주사한 후 1주일 뒤에 경동맥 ligation을 수행하였다. Ligation 4주 후 모델이 완성되었는지를 확인하고, 총 플라크 이미징(gross plaque imaging), Serum에서 plasma lipid profile, 및 몸무게 변화를 측정 하였다. 실험 결과 총 플라크 이미징(gross plaque imaging) 결과에서 볼 수 있듯이 엘리오카퍼스 페티오라투스 처리 군에서 죽상동맥경화 플라크(atherosclerotic plaque)가 감소함을 확인하였다(도 6b). 또한, plasma lipid profile 결과에서 볼 수 있듯이 엘리오카퍼스 페티오라투스 처리 군에서 중성지방(triglyceride, TG), 저밀도지질단백콜레스테롤(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)이 감소 및 고밀도지질단백콜레스테롤(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)의 증가함을 확인하였다(도 6c). 또한 7주 후 몸무게 변화 비교 결과 엘리오카퍼스 페티오라투스 처리 군에서 약 10%정도 몸무게가 감소하였다(도 6d).
- [204] 상기 결과로 인하여, 죽상동맥경화 플라크(atherosclerotic plaque) 감소로 동맥경화와 같은 심혈관대사질환에 효과가 있음을 확인할 수 있었으며, 중성지방, 저밀도지질단백콜레스테롤의 감소 및 고밀도지질단백콜레스테롤의 증가효과를 확인함에 따라 동맥경화뿐만 아니라 이상지질혈증 등과 같은 심혈관대사질환에도 효과가 있음을 확인할 수 있었다.
- [205] 또한, 몸무게의 감소효과 또한 확인할 수 있어 심혈관대사질환으로 인한 비만의 예방 효과 또한 확인할 수 있었다.

[206]

- [207] 실시예 7. 엘리오카퍼스 페티오라투스와 엘리오카퍼스 가니트리스 (*Elaeocarpus ganitrus*)의 크로마토그램 비교

[208]

- [209] 엘리오카퍼스 페티오라투스(EP)와 엘리오카퍼스 가니트리스(EG) 잎 추출물(추출용매: 95% 에탄올)의 활성 지표물질의 정성분석을 위한 UPLC 분석은 BEH C18 ($2.1 \times 100\text{mm}$, 1.7mm) 컬럼관과 PDA 검출기($200\text{-}600\text{nm}$, max plot)를 장착한 ACQUITY UPLC Ultra Performance를 사용하였고, 유속은 0.4 mL/min 로 0.1% formic acid가 포함된 증류수와 acetonitrile을 사용하여 수행하였다 (표 1 및 도 7a).

[210]

- [211] 실시예 8. 엘리오카퍼스 페티오라투스와 엘리오카퍼스 가니트리스의 리지스틴에 대한 TNF- α 저해활성 비교

[212]

- [213] 엘리오카퍼스 속의 식물간의 심혈관대사질환 치료효능을 비교하기 위하여 엘리오카퍼스 페티오라투스와 엘리오카퍼스 가니트리스(*E. ganitrus*, *E. sphaericus*)의 각 추출물 및 유효분획인 부탄올 및 물층에 대한 THP-1 세포에서

리지스틴에 의한 TNF- α 생성 저해 효과를 비교해 보았다(도 7b). 상기 엘리오카퍼스 페티오라투스(EP)의 추출물 및 분획물에 대한 3개의 시료에서 모두 0.6~20 μ g/mL 농도에서 세포독성은 관찰되지 않음을 확인하였다.

[214] 또한, THP-1 세포에서 리지스틴에 의한 TNF- α 생성은 0.6~20 μ g/mL의 농도로 시료를 처리하였을 때, 엘리오카퍼스 페티오라투스(EP)의 추출물과 유효분획물 처리시 농도의존적으로 TNF- α 생성을 저해하는 반면, 엘리오카퍼스 가니트리스(EG) 추출물은 저해효과가 확인되지 않았다(도 7b).

[215] 따라서, 상기 결과를 보았을 때, 엘리오카퍼스 가니트리스 추출물보다 엘리오카퍼스 페티오라투스의 추출물 및 유효 분획물에서 리지스틴에 의한 TNF- α 저해활성 효과가 보다 현저함을 알 수 있었다.

[216] 또한, 이 결과로서 모든 엘리오카퍼스 속 식물이 동일한 효능을 나타내는 것이 아니라 특히 엘리오카퍼스 페티오라투스가 리지스틴에 의한 TNF- α 저해활성 효능을 가짐으로 인해 심혈관대사질환의 치료용도로 사용 가능함을 확인할 수 있었다.

[217]

[218] 실시예 9. 엘리오카퍼스 페티오라투스 유래 화합물과 Myricetin의 리지스틴- κ 1 결합 저해활성 비교

[219]

[220] 엘리오카퍼스 페티오라투스에서 분리한 화합물인 EP_5E2 (Myricetin 3-O-a-L-Rha)의 모체인 Myricetin(Sigma, M6760)을 구입하여 리지스틴- κ 1의 결합저해활성을 측정하였다. 그 결과, 각 시료를 25, 50, 100 μ M의 농도로 처리하였을 때, 리지스틴- κ 1의 결합을 EP_5E2 화합물은 농도의존적으로 저해하는 반면, Myricetin은 저해활성이 나타나지 않았다 (도 8).

[221] 상기 결과로서, 본 발명의 엘리오카퍼스 페티오라투스에서 분리된 화합물은 이와 모체화합물과도 구별되는 효과를 가지고 있음을 확인할 수 있었으며, 이로서 엘리오카퍼스 페티오라투스가 리지스틴에 의한 TNF- α 저해활성 효능을 가짐으로 인해 심혈관대사질환의 치료용도로 사용 가능함을 다시 한번 확인할 수 있었다.

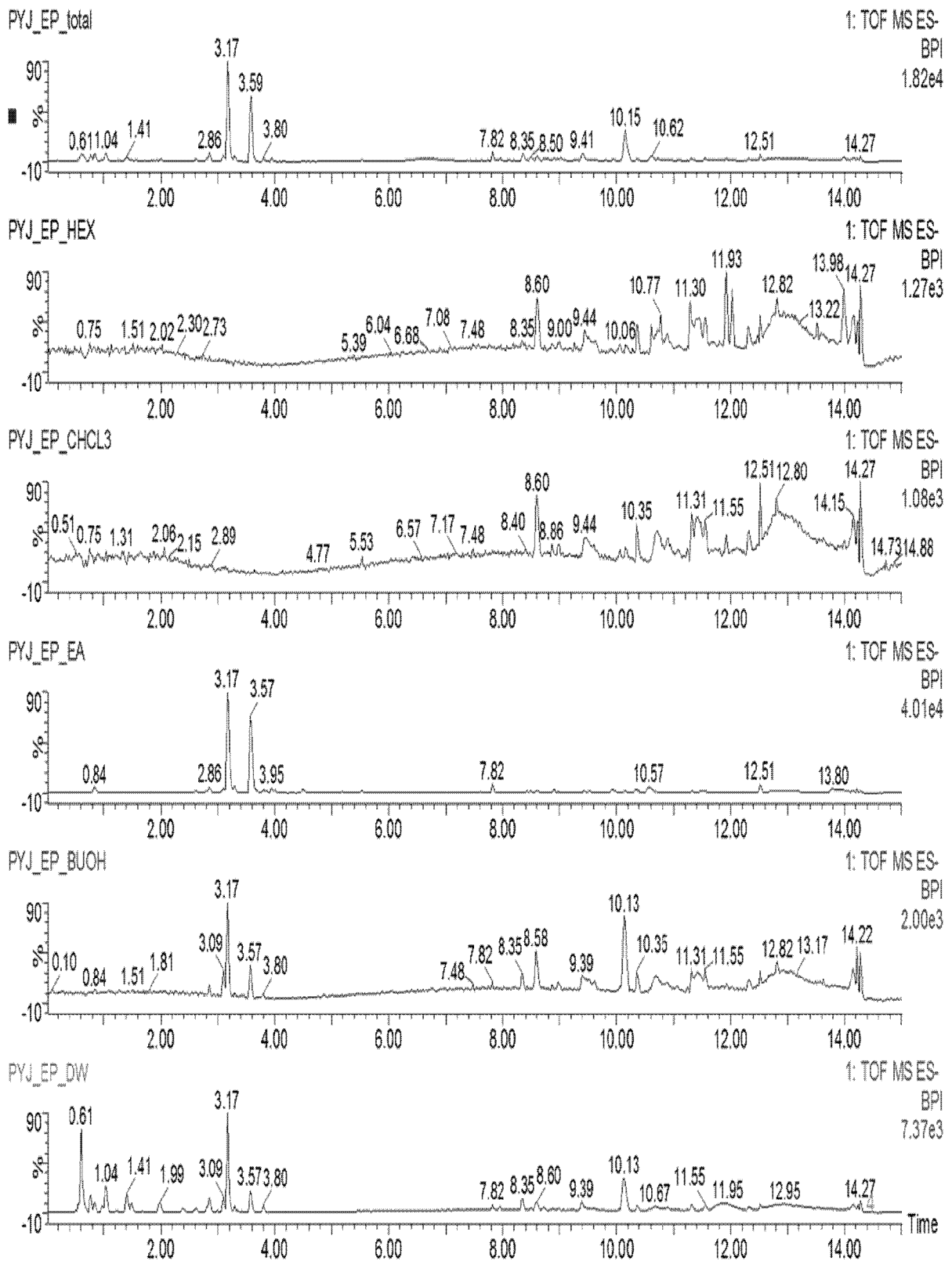
[222]

[223] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

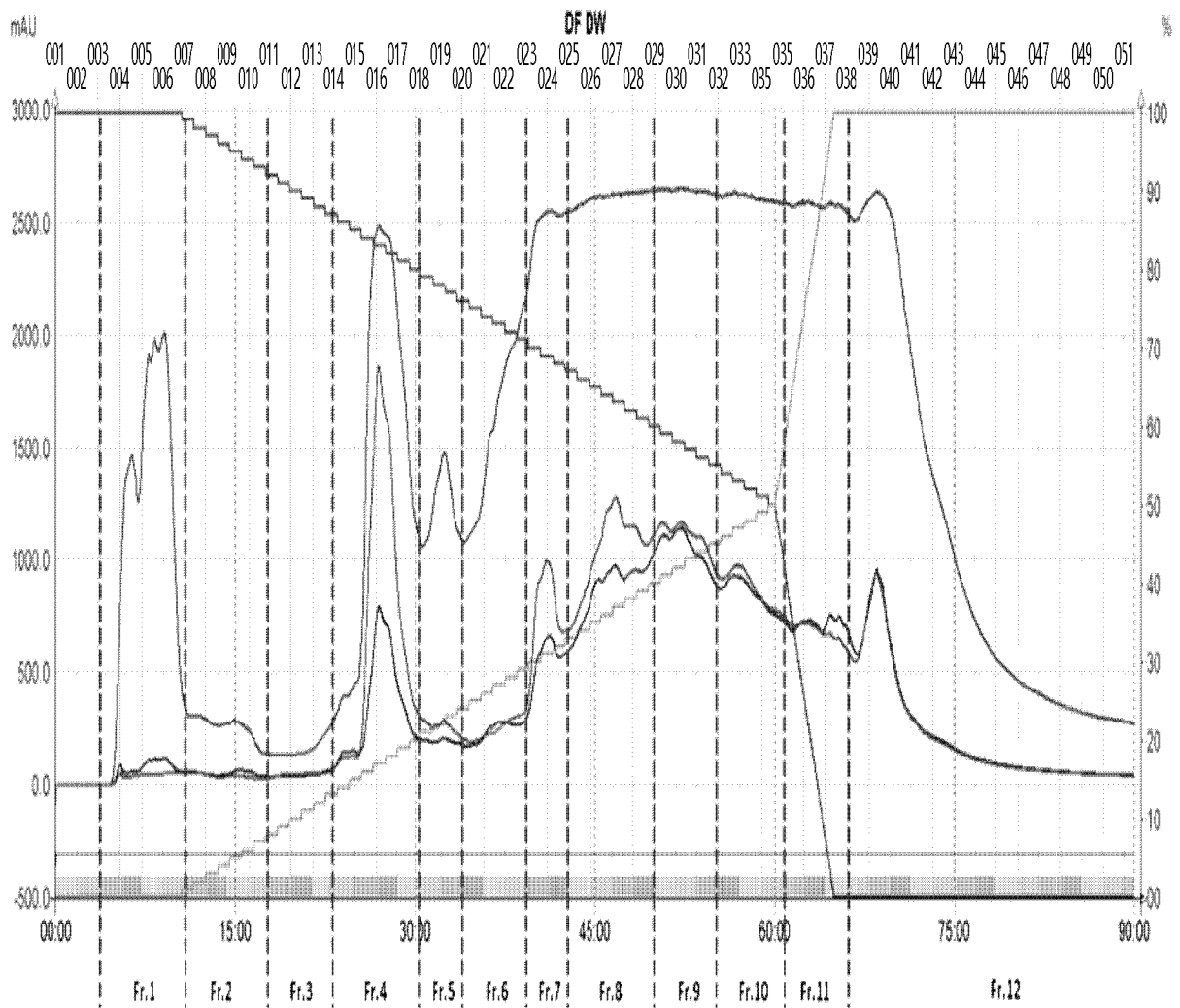
청구범위

- [청구항 1] 엘리오카퍼스 페티오라투스(*Elaeocarpus petiolatus*) 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 심혈관 대사 질환은 고혈압, 협심증, 심근경색, 뇌경색, 뇌졸중, 부정맥, 이상지질혈증, 고지혈증, 동맥경화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 엘리오카퍼스 페티오라투스 추출물은 엘리오카퍼스 페티오라투스의 잎에서 추출된 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 엘리오카퍼스 페티오라투스 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 추출하여 제조되는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 분획물은 헥산(n-hexane), 에틸 아세테이트(EA), 부탄올(n-BuOH), 물 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 분획되는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 화합물은 메틸갈레이트-O-헥소사이드(Methylgallate-O-hexoside), 미리세틴-3-O-a-L-람노사이드(Myricetin-3-O-a-L-rhamnoside), 엘라그산(Ellagic acid) 또는 이소람네틴-3-O-b-D-헥소사이드(Isorhamnetin-3-O-b-D-hexoside)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 리지스틴-캡1(Resistin-CAP1)결합을 저해하는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 TNF- α 생성을 저해하는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 전사인자 NF- κ B를 저해하는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 심혈관 대사 질환의 예방 또는 치료방법.
- [청구항 11] 엘리오카퍼스 페티오라투스(*Elaeocarpus petiolatus*) 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는, 심혈관 대사 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 12] 심혈관 대사 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 엘리오카퍼스 페티오라투스 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도.

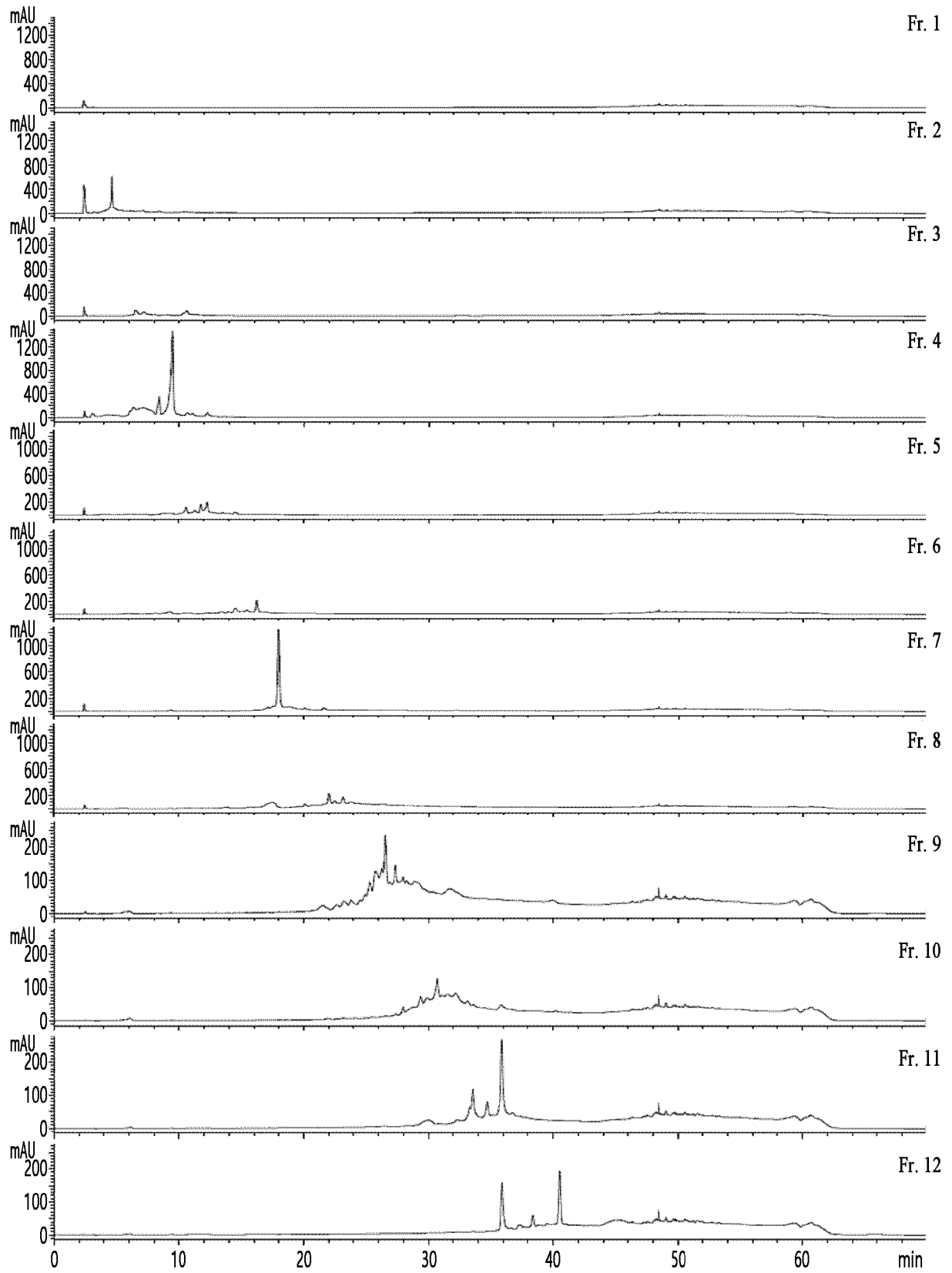
[도 1]



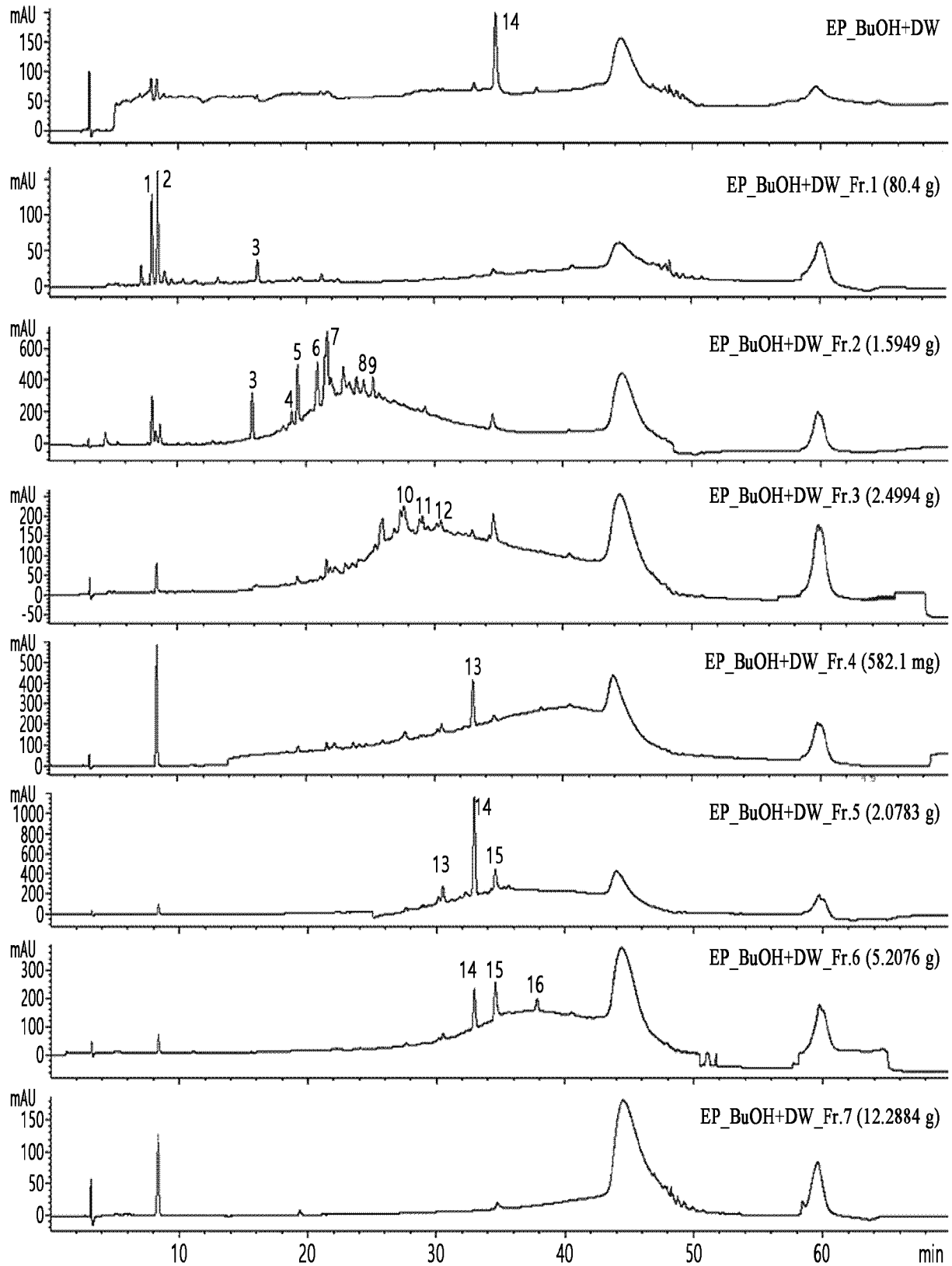
[도2a]



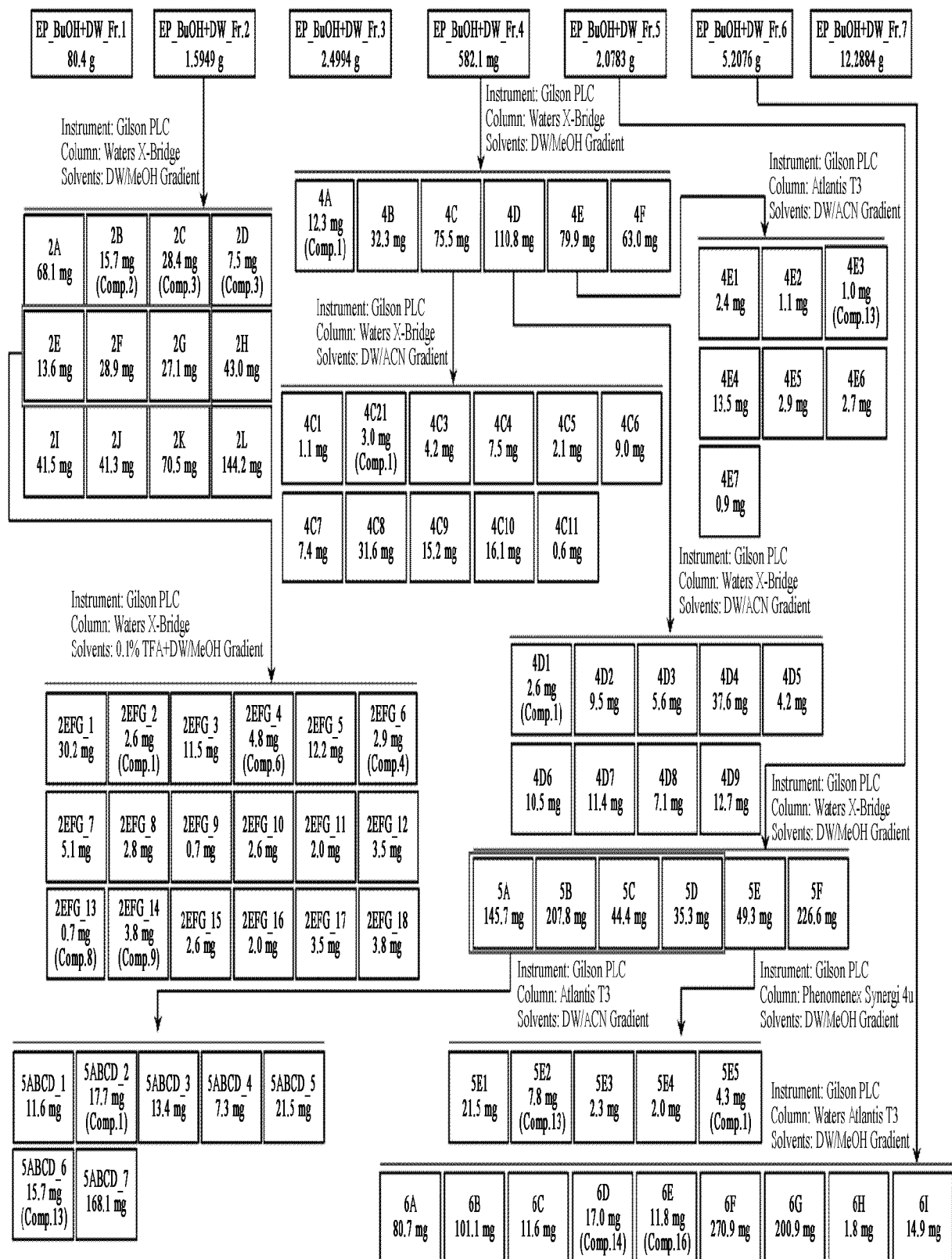
[도2b]



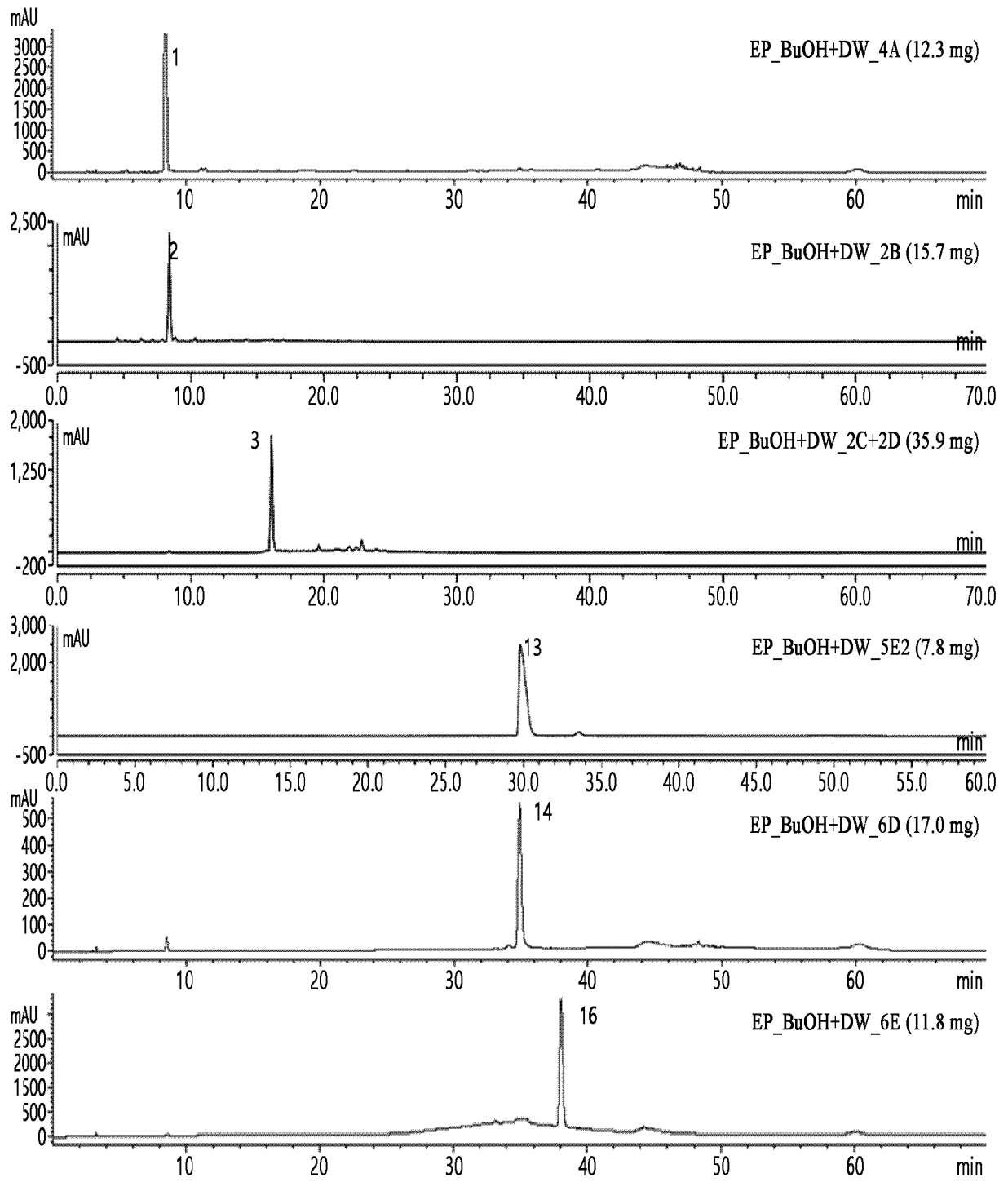
[도3]



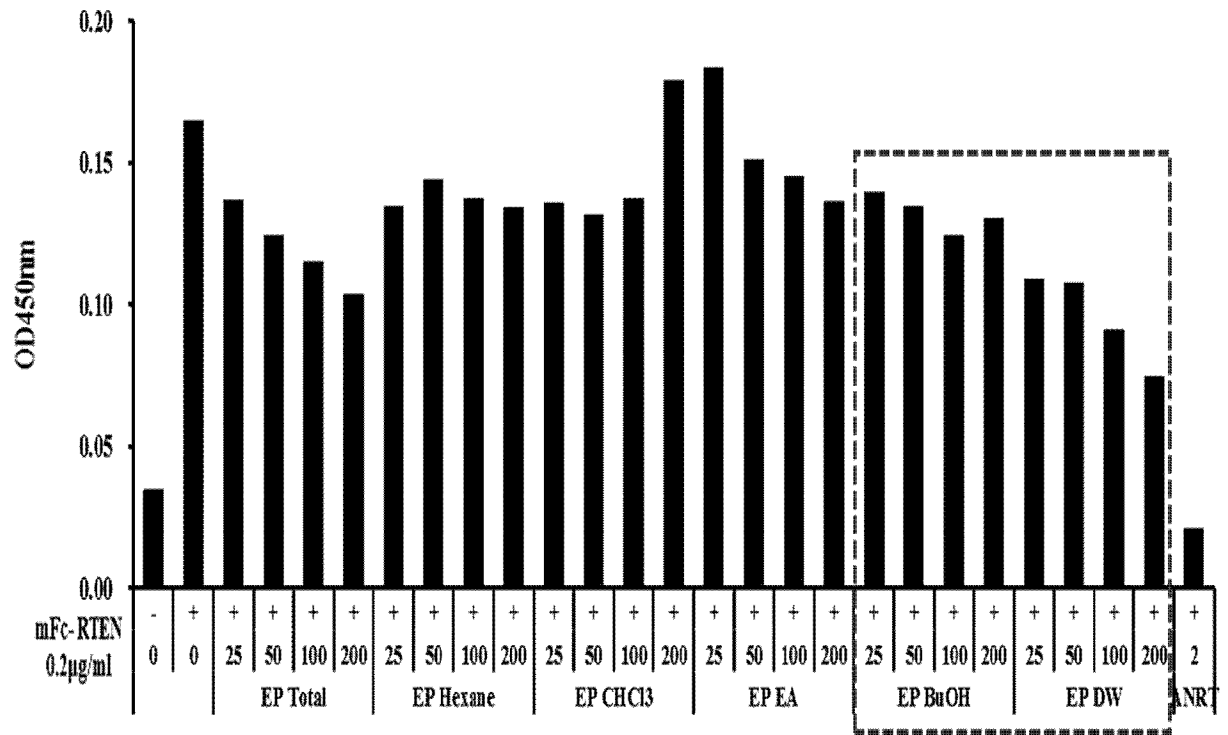
[도4a]



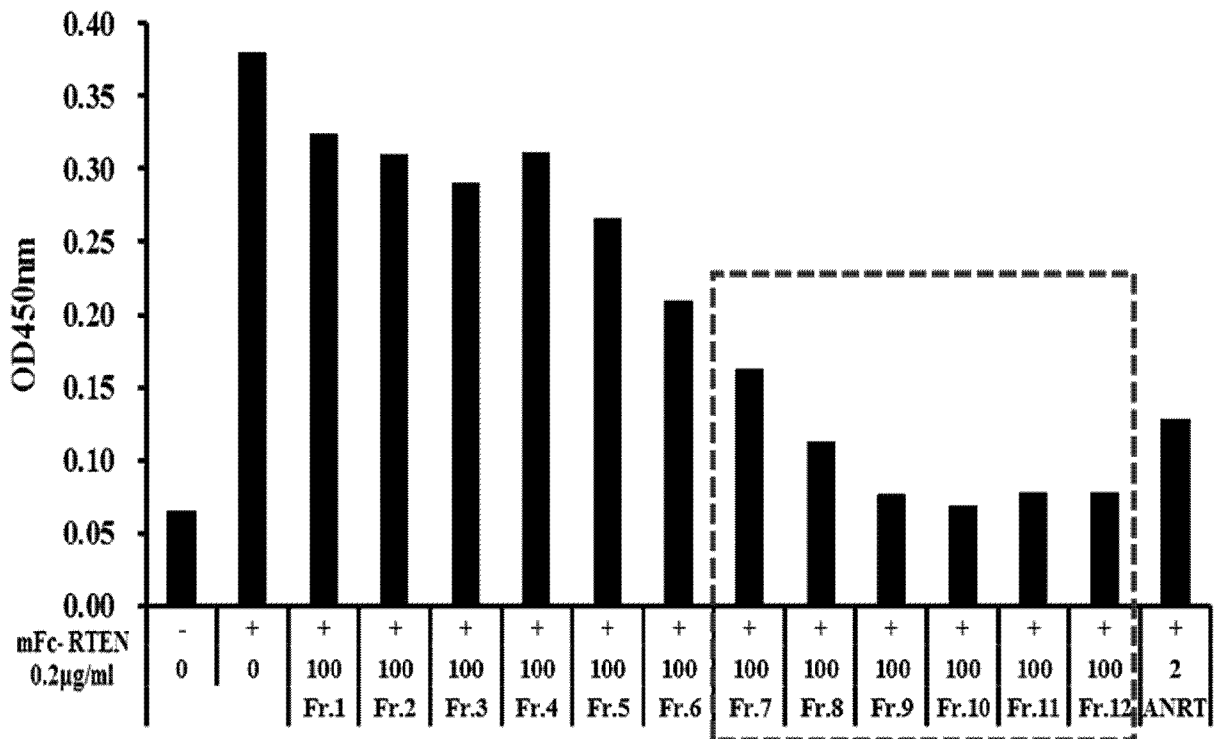
[도4b]



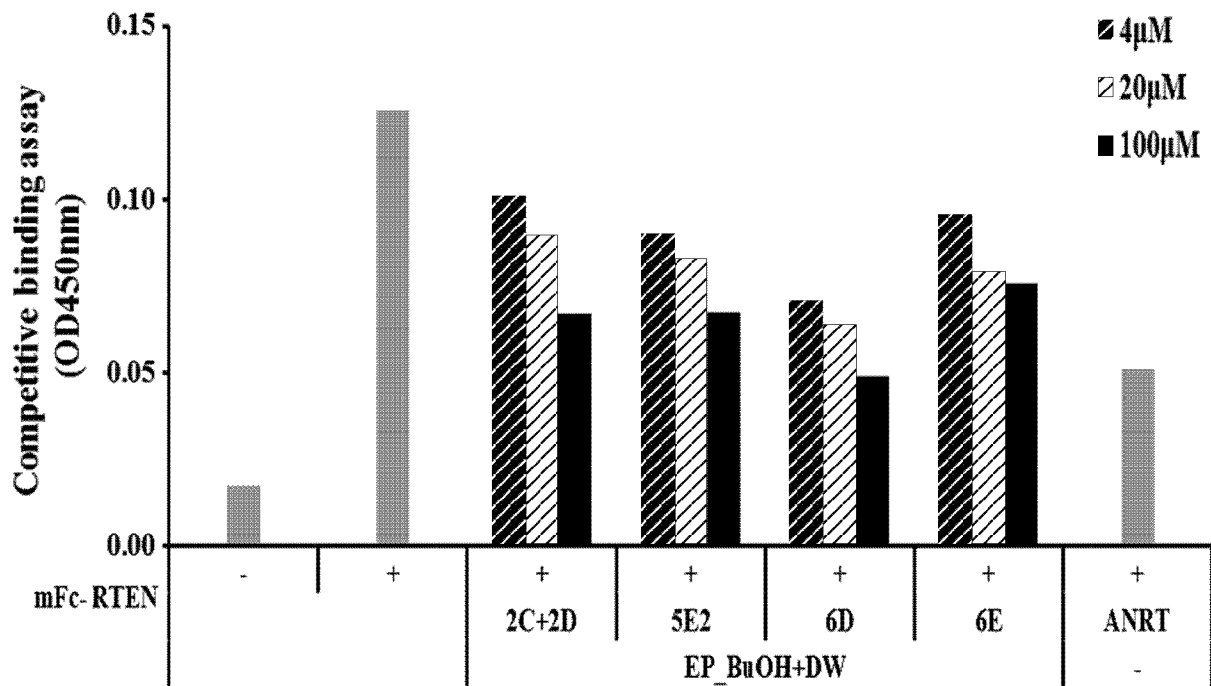
[도5a]



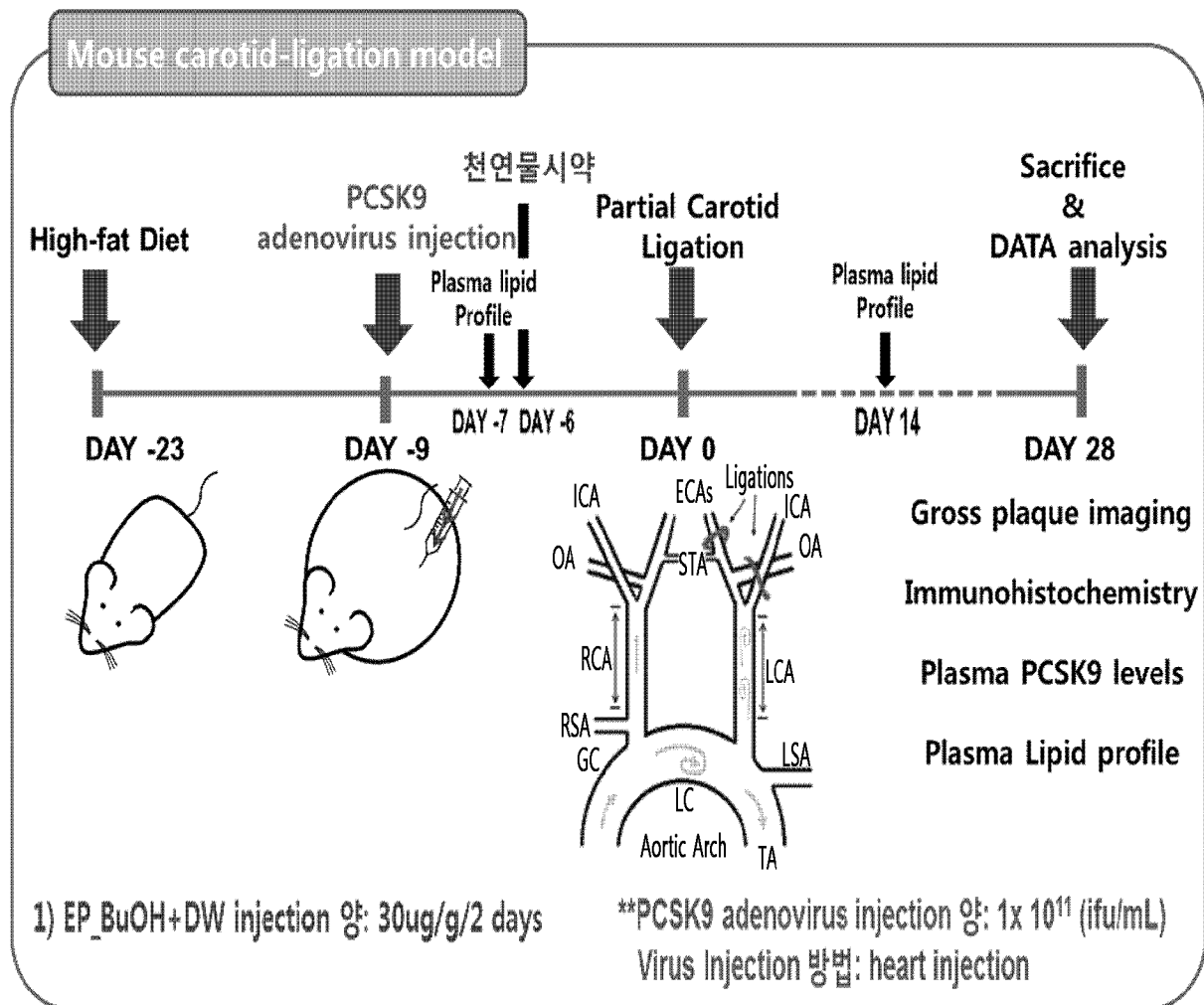
[도5b]



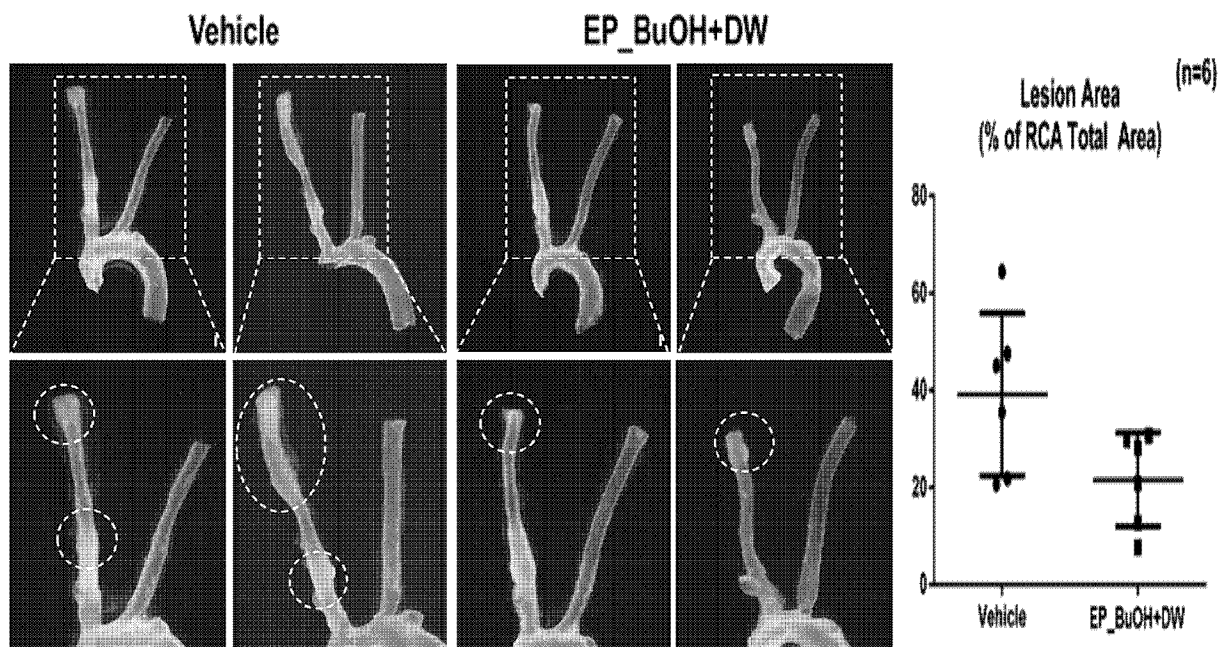
[도5c]



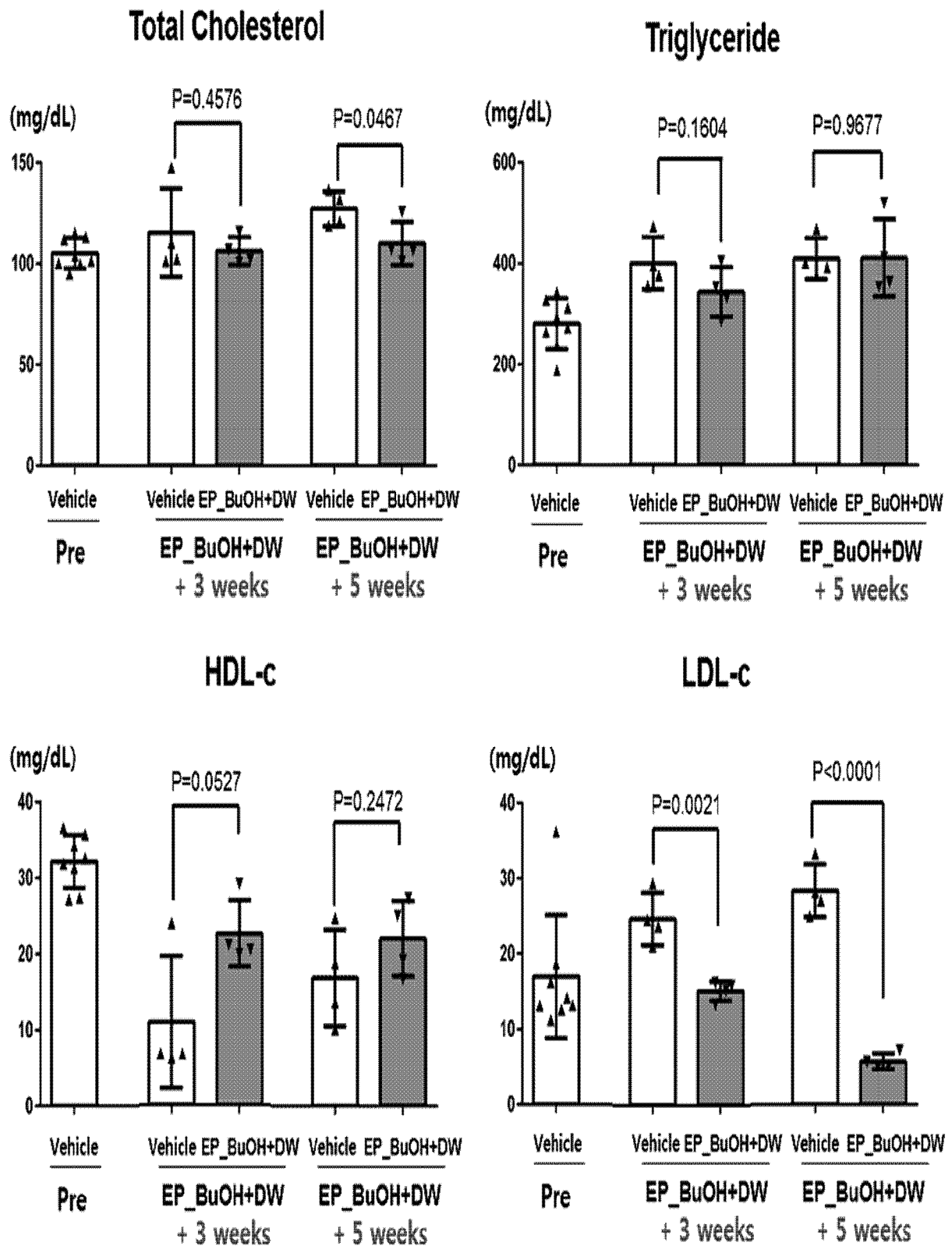
[도6a]



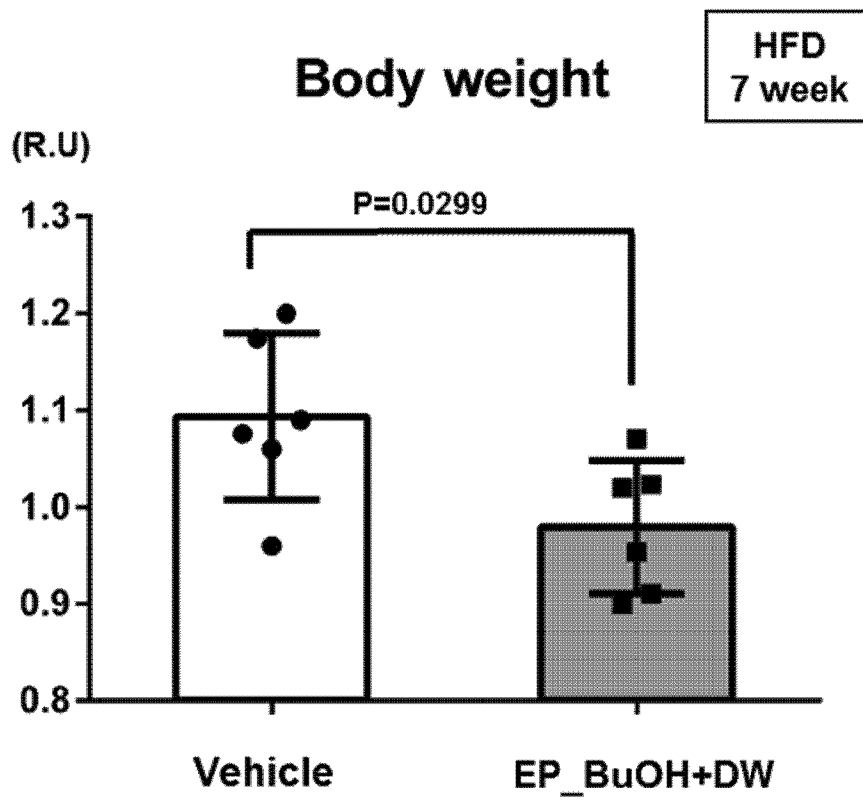
[도6b]



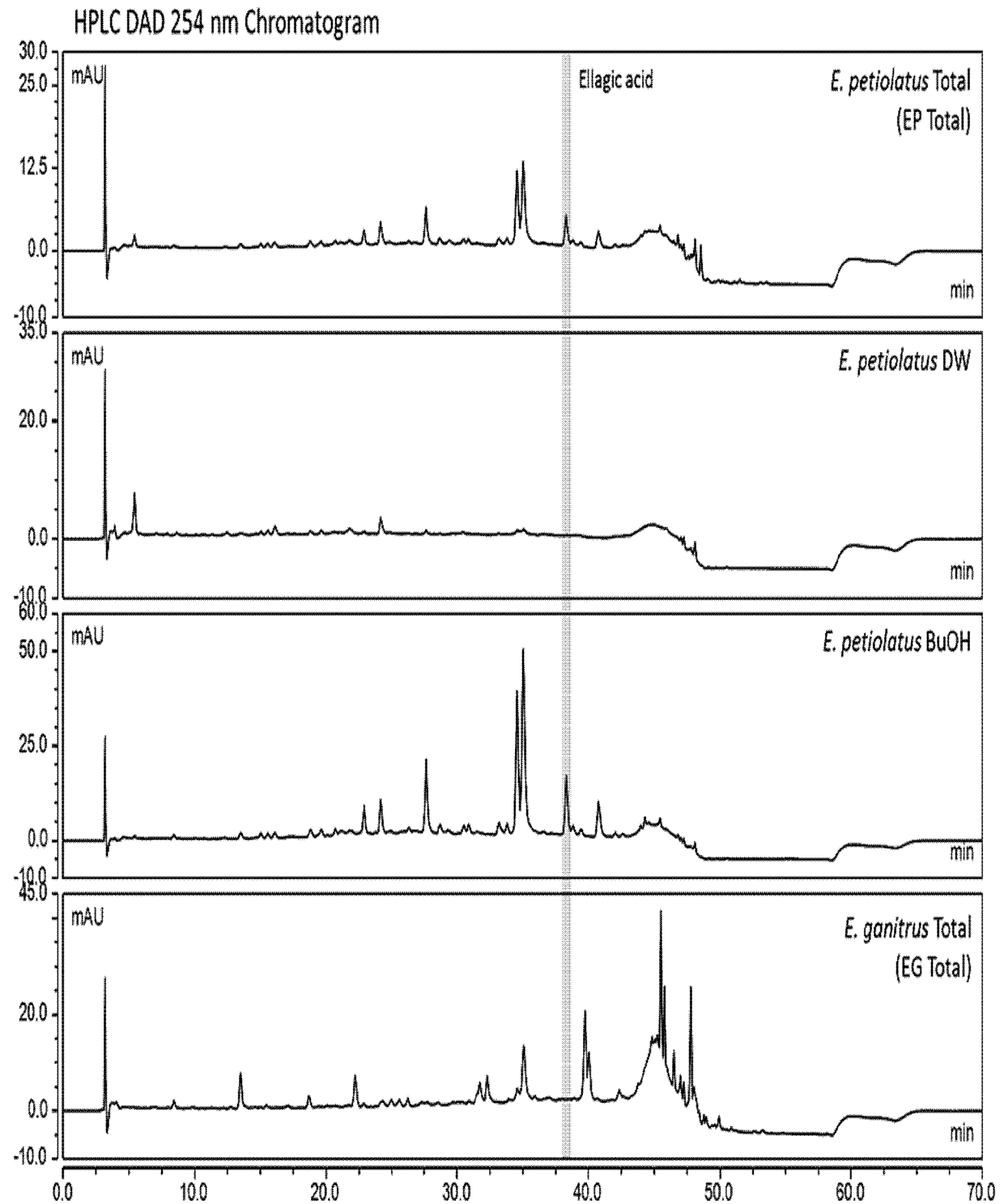
[도6c]



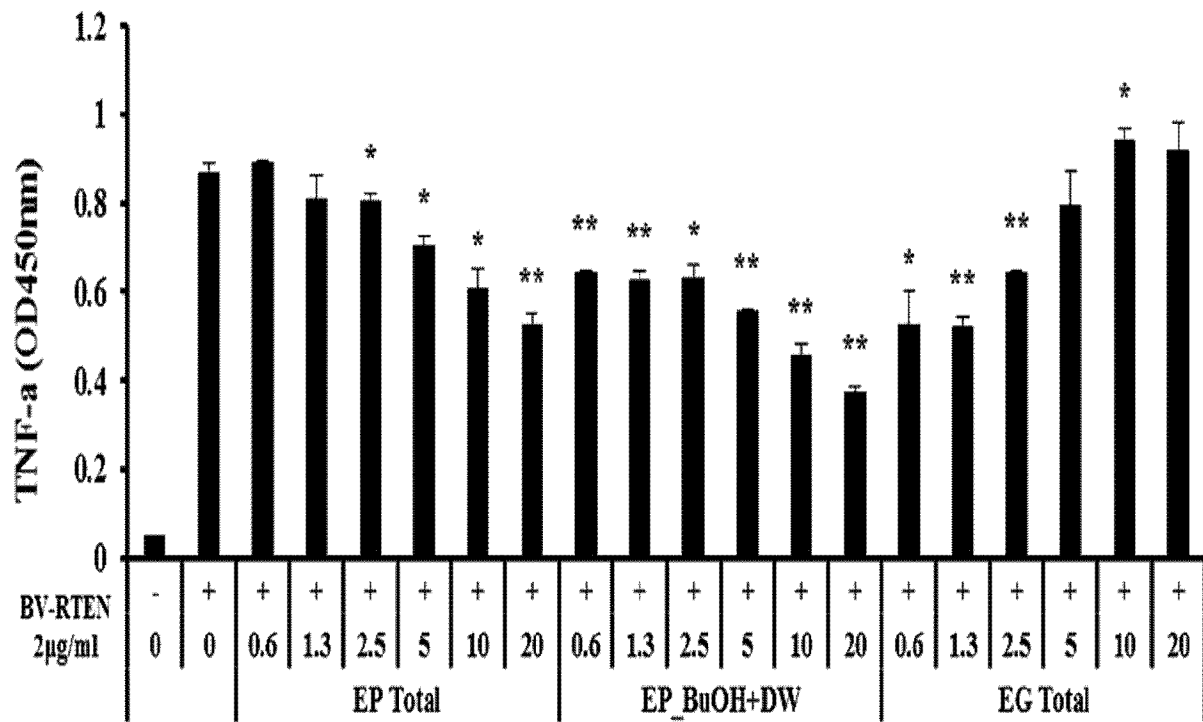
[도6d]



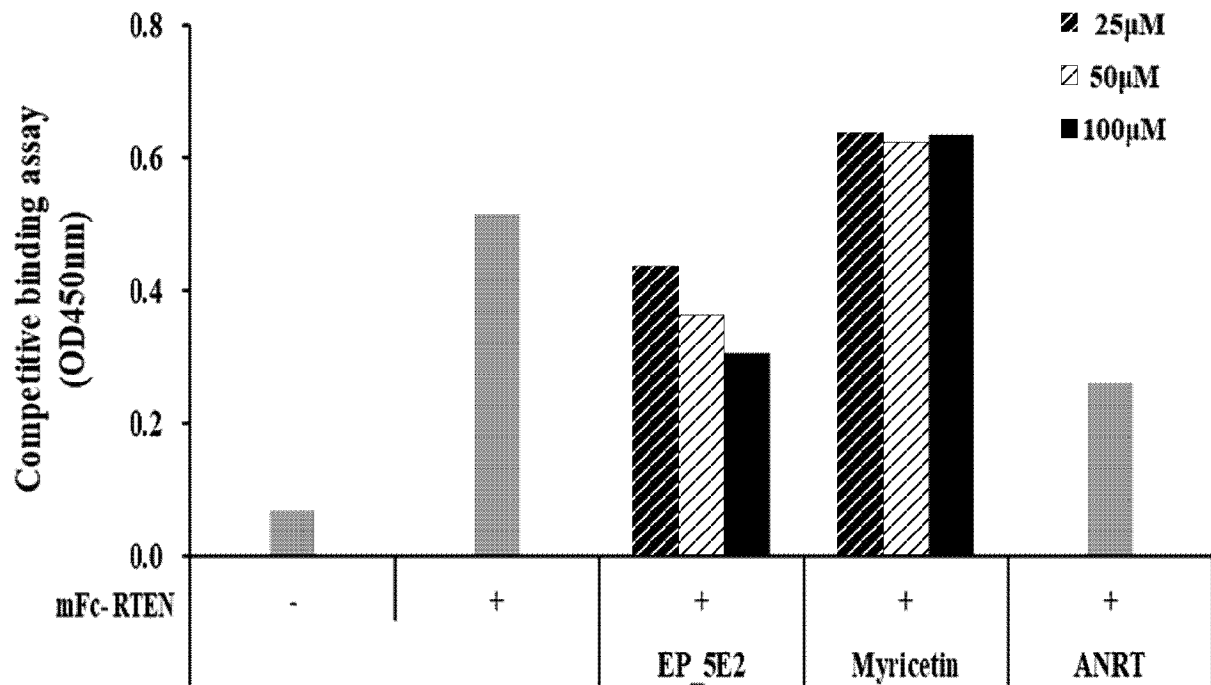
[도7a]



[도7b]



[도8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/003041

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 36/185(2006.01)i; A61K 31/7048(2006.01)i; A61P 9/00(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 36/185(2006.01); A61K 8/97(2006.01); A61P 29/00(2006.01); A61Q 19/08(2006.01); C12N 15/62(2006.01); G01N 33/68(2006.01) 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: 엘리오카페스 페티오라투스(Elaeocarpus petiolatus), 리지스틴-캡1(Resistin-CAP1), 심혈관(cardiovascular), CAP1(Adenylyl cyclase-associated protein 1)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2011-0031599 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 29 March 2011 (2011-03-29) See abstract; paragraphs [0031]-[0036] and [0067]; and claims 1-10.	1-9,11-12
Y	LEE, S. et al. Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes. Cell metabolism. 2014, vol. 19, pp. 484-497. See abstract; figure 4; and pages 485 and 493.	1-9,11-12
Y	KWON, O.-K. et al. Ethanol extract of Elaeocarpus petiolatus inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in macrophage cells. Inflammation. 2012, vol. 35, no. 2, pp. 535-544. See abstract; and pages 536 and 541-543.	1-9,11-12
Y	KR 10-2013-0018603 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) 25 February 2013 (2013-02-25) See abstract; paragraph [0045]; and claims 1-13.	1-9,11-12
☒ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 02 August 2021		Date of mailing of the international search report 02 August 2021
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/003041

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1425560 B1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 04 August 2014 (2014-08-04) See abstract; paragraph [0037]; and claim 1.	1-9,11-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/003041

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**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 10 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to a 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).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/003041

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2011-0031599	A	29 March 2011	KR	10-1167677	B1	20 July 2012
KR	10-2013-0018603	A	25 February 2013	KR	10-1473526	B1	22 December 2014
				US	2014-0171489	A1	19 June 2014
				US	9933424	B2	03 April 2018
				WO	2013-022262	A2	14 February 2013
				WO	2013-022262	A3	30 May 2013
KR	10-1425560	B1	04 August 2014	KR	10-2012-0063447	A	15 June 2012
				WO	2012-077976	A2	14 June 2012
				WO	2012-077976	A3	07 September 2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 36/185(2006.01)i; A61K 31/7048(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 36/185(2006.01); A61K 8/97(2006.01); A61P 29/00(2006.01); A61Q 19/08(2006.01); C12N 15/62(2006.01); G01N 33/68(2006.01) 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: 엘리오카퍼스 페티오라투스(<i>Elaeocarpus petiolatus</i>), 리지스틴-캡 1(Resistin-CAP1), 심혈관(cardiovascular), CAP1(Adenylyl cyclase-associated protein 1)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2011-0031599 A (한국생명공학연구원) 2011.03.29 요약, 단락 [0031]-[0036], [0067]; 청구항 1-10	1-9,11-12
Y	Lee S. 등, 'Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes', Cell metabolism. 2014, 19권, 페이지 484-497 초록; 도면 4; 페이지 485, 493	1-9,11-12
Y	Kwon O.-K. 등, 'Ethanol extract of <i>Elaeocarpus petiolatus</i> inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in macrophage cells', Inflammation. 2012, 35권, 2호, 페이지 535-544 초록; 페이지 536, 541-543	1-9,11-12
Y	KR 10-2013-0018603 A (서울대학교병원) 2013.02.25 요약, 단락 [0045]; 청구항 1-13	1-9,11-12
A	KR 10-1425560 B1 (한국생명공학연구원) 2014.08.04 요약, 단락 [0037]; 청구항 1	1-9,11-12
☐ 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 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 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 2021년08월02일(02.08.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년08월02일(02.08.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

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**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 10은 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 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.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0031599 A	2011/03/29	KR 10-1167677 B1	2012/07/20
KR 10-2013-0018603 A	2013/02/25	KR 10-1473526 B1	2014/12/22
		US 2014-0171489 A1	2014/06/19
		US 9933424 B2	2018/04/03
		WO 2013-022262 A2	2013/02/14
		WO 2013-022262 A3	2013/05/30
KR 10-1425560 B1	2014/08/04	KR 10-2012-0063447 A	2012/06/15
		WO 2012-077976 A2	2012/06/14
		WO 2012-077976 A3	2012/09/07