(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0012773
(43) 공개일자 2025년01월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/21 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61P 3/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/21 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0092556
(22) 출원일자 2023년07월17일
심사청구일자 2023년07월17일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)
(72) 발명자
이원종
세종특별자치시 나성북1로 51, 603동 2003호(나성동, 나릿재마을6단지)
이정현
경기도 김포시 봉화로 90-3, 101동 501호(북변동, 동변마을아파트)
강수진
경기도 안산시 상록구 안산천서로4길 14, 402호(월피동, 중앙맨션)
(74) 대리인
특허법인지평

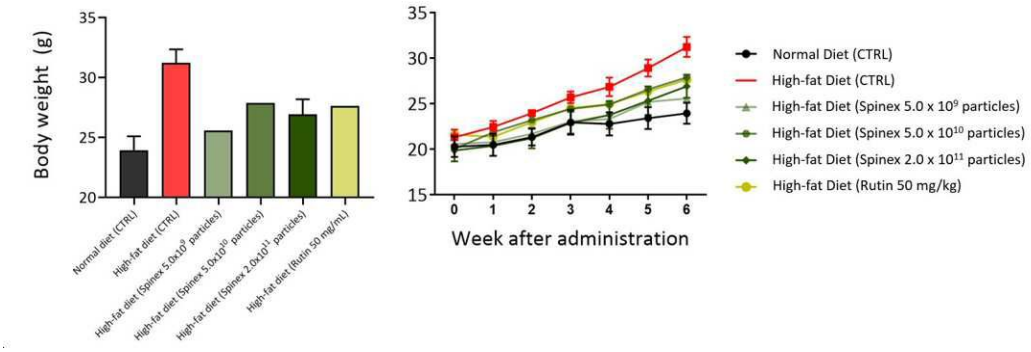
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체를 포함하는 항비만 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체를 유효성분으로 포함하는 비만의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 시금치속 유래 세포밖 소포체는 식용 식물에서 유래한 천연물질로, 부작용없이 지방세포 분화 및 지방 축적을 억제하여 다양한 항비만 예방, 개선, 치료용 조성물로 활용 가능한 장점을 갖는다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
A61P 3/04 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/332 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711188699
과제번호	2022R1A2C1091989
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업-개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	식물 세포밖소포체 생산 공정 및 엔지니어링 플랫폼기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	인천대학교 산학협력단
연구기간	2022.09.01 ~ 2023.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

시금치 속 식물에서 유래된 세포밖 소포체를 유효성분으로 포함하는, 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 세포밖 소포체는 평균 직경이 50 내지 300 ㎚인 것을 특징으로 하는, 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 세포밖 소포체는 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 한외여과, 고분자 침전법, 초고속 원심분리법 및 접선 유동 여과법으로 구성된 군으로부터 어느 하나 이상의 방법에 의해 분리된 것을 특징으로 하는, 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 세포밖 소포체는 지방 세포 생성, 지방 세포 분화 및/또는 지방 세포 축적을 억제하는 것을 특징으로 하는, 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 세포밖 소포체는 C/EBP-α, SREBP1 및 PPAR-γ로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 발현의 감소를 통해 지방 세포 생성, 지방 세포 분화 및/또는 지방 세포 축적을 억제하는 것을 특징으로 하는, 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 약학으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제 및/또는 완충제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 경구 또는 비경구 제제인 것을 특징으로 하는, 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

시금치 속 식물에서 유래된 세포밖 소포체를 포함하는, 비만 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 식품 조성물은 식품 첨가제, 음료 또는 음료 첨가제인 것을 특징으로 하는, 비만 예방 또는 치료용 식품 조성물.

청구항 10

시금치 속 식물에서 유래된 세포밖 소포체를 포함하는, 비만 예방 또는 개선용 의약외품 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 의약외품 조성물은 과립, 분말, 정제, 제피제, (마이크로) 캡슐, 시럽 또는 에멀젼인 것을 특징으로 하는, 비만 예방 또는 개선용 의약외품 조성물.

청구항 12

시금치 속 식물에서 유래된 세포밖 소포체를 포함하는, 비만 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 화장료 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스쳐 로션, 영양로션, 마사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 스프레이, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징 로션, 클렌징 크림, 바디 로션, 바디 크림, 바디 오일, 바디 세정제, 샴푸, 연고 및 패취로 구성된 군에서 선택되는 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는, 비만 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체를 유효성분으로 포함하는 비만의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 세포밖 소포체는 다양한 크기를 가지며, 특히 이중 크기가 가장 작은 엑소좀(exosome)은 50 내지 150 nm의 작은 세포막성 소포이다. 세포밖 소포체는 인간과 동물은 물론, 곤충, 식물 세포 및 미생물에서 분비된다. 특히 이들은 세포가 갖고 있는 단백질, 핵산, 지질, 탄수화물 등 특정 분자들을 포함하고 있으며, 지질이중층으로 둘러싸여 있어 이들 분자들을 안정적으로 보호하면서, 분비 후 다른 세포로 이들을 전달할 수 있는 특징이 있다. 생체 내 혈액, 소변, 침 등과 같은 체액에서 고농도로 발견되는 세포밖 소포체는 이런 특징으로 인해 새로운 생물학적 소재로서 가능성을 갖고 있다.

[0004] 상기 세포밖 소포체는 1) 천연물질로 부작용 이슈가 매우 적으며; 2) 경구투여를 통해 대장 도달이 가능할 뿐 아니라; 3) 음식으로 직접 식용하는 것에 비해 편의성이 높아 유아나 소아 대상으로 적용이 가능하고; 4) 식물로부터 대량 생산이 가능하여 건강기능식품의 새로운 패러다임을 선도할 수 있으며; 5) 약리성분을 탑재하여 대장까지 전달할 수 있는 효율적인 약물 전달체로 적용이 가능하다는 장점이 있다.

[0005] 하지만, 이런 이점에도 불구하고, 아직 식물 유래 세포밖 세포체의 생물학적 기능 및 응용에 대한 연구는 체계적으로 이뤄지지 않고 있는 실정이다.

[0006] 한편, 비만이란, 건강을 해칠 정도로 지방조직에 비정상적인 또한 과도한 지방이 축적된 상태로 정의된다. 비만

은 제2형 당뇨병, 고지혈증, 인슐린 저항성 등과 같은 대사질환의 발병 위험을 증가시킬 뿐 아니라 일부 주요 사망 원인과 관련된 심각한 건강 문제를 야기한다. 따라서 체지방을 제어하는 것이 큰 의료적 과업 중 하나로 평가된다.

[0007] 하지만 항비만 약물 개발은 식욕을 조절하는 분자 메커니즘을 타겟으로 하여 심혈관계 부작용, 자살위험 증가 또는 약물 의존 및 남용 가능성 증가 등의 부작용이 존재하는 것으로 알려져 있다. 또한 약물에 대한 불충분한 효능과 불확실한 안전성 그리고 약물에 대한 내성이 큰 것으로 보고되는바, 장기적인 약물 요법으로 비만을 극복하기는 상당히 어렵다 (Diabetes Metab J. 2020 Dec; 44(6): 802-818).

[0008] 본 발명에서는 식용되는 천연물 원료 소재로 고유 독성이 낮아 부작용이 낮을 것으로 예상되는 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체를 한외 여과 및 크기 배제 크로마토그래피로 분리 및 정제하였고, 이와 같이 정제된 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체를 지방 전구 세포에 처리하는 경우 지방 유사 분화를 억제할 수 있으며 지방 세포에서의 지방 축적이 억제되는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) Diabetes Metab J. 2020 Dec; 44(6): 802-818

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 시금치 속 식물에서 유래된 세포밖 소포체의 항비만 용도를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 시금치 속 식물에서 유래된 세포밖 소포체를 유효성분으로 포함하는, 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명에 있어서, 상기 세포밖 소포체는 평균 직경이 50 내지 300 nm인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0014] 본 발명에 있어서, 상기 세포밖 소포체는 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 한외여과, 고분자 침전법, 초고속 원심분리법 및 접선 유동 여과법으로 구성된 군으로부터 어느 하나 이상의 방법에 의해 분리된 것을 특징으로 할 수 있다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 세포밖 소포체는 지방 세포 생성, 지방 세포 분화 및/또는 지방 세포 축적을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0016] 본 발명에 있어서, 상기 세포밖 소포체는 C/EBP-α, SREBP1 및 PPAR-γ로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 발현의 감소를 통해 지방 세포 생성, 지방 세포 분화 및/또는 지방 세포 축적을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물은 약학으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제 및/또는 완충제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물은 경구 또는 비경구 제제인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0019] 본 발명은 또한, 시금치 속 식물에서 유래된 세포밖 소포체를 포함하는, 비만 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명에 있어서, 상기 식품 조성물은 식품 첨가제, 음료 또는 음료 첨가제인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0021] 본 발명은 또한, 시금치 속 식물에서 유래된 세포밖 소포체를 포함하는, 비만 예방 또는 개선용 의약외품 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 의약외품 조성물은 과립, 분말, 정제, 제피제, (마이크로) 캡슐, 시럽 또는 에멀젼인

것을 특징으로 할 수 있다.

[0023] 본 발명은 또한, 시금치 속 식물에서 유래된 세포밖 소포체를 포함하는, 비만 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 화장료 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스쳐 로션, 영양로션, 마사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 스프레이, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징 로션, 클렌징 크림, 바디 로션, 바디 크림, 바디 오일, 바디 세정제, 샴푸, 연고 및 패취로 구성된 군에서 선택되는 제형으로 제조되는 것을 특징으로 할 수 있다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 시금치속 유래 세포밖 소포체는 식용 식물에서 유래한 천연물질로, 부작용없이 지방 세포 분화 및 지방 축적을 억제하여 다양한 항비만 예방, 개선, 치료용 조성물로 활용 가능한 장점을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 불순물이 포함된 시금치 착즙액(좌측) 및 이를 원심분리한 상층액(우측)을 보여준다.

도 2는 시금치 착즙액을 원심분리한 상층액을 크기 배제 크로마토그래피로 정제하여 회수한 33개의 분획을 보여준다.

도 3은 시금치 유래 세포밖 소포체의 크기 분포도 및 정제도를 보여준다.

도 4는 시금치 유래 세포밖 소포체의 지방 전구 세포(3T3-L1)에 대한 세포 독성 평가 결과를 보여준다.

도 5는 시금치 유래 세포밖 소포체에 의한 지방 전구 세포(3T3-L1)의 지방 유사 세포로의 분화 및 지방 축적 억제 효과를 보여준다.

도 6은 시금치 유래 세포밖 소포체에 의한 지방 전구 세포(3T3-L1)의 지방 유사 세포로의 분화 및 지방 축적 억제 효과를 정량화 한 결과를 보여준다.

도 7은 시금치 유래 세포밖 소포체에 의한 지방 전구 세포(3T3-L1)의 지방 유사 세포로의 분화 및 지방 축적에 관여하는 전사 인자의 발현량을 확인한 결과이다.

도 8은 고지방식이 마우스에 시금치속 유래 세포밖 소포체 투여로 인한 체중 증가 억제 효과를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0030] 본 명세서에서 용어 "시금치 속(Brassica Species)" 식물은 시금치 속에 속하는 식물로, 구체적으로 시금치일 수 있으며, 상기 시금치는 포항 지역에서 재배되는 포항초, 신안 비금도에서 재배되는 섬초 및 남해 노지에서 재배된 남해초를 모두 포함할 수 있다.

[0031] 본 명세서에서 용어 "세포밖 소포체(extracellular vesicle)"는 다양한 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은 소낭을 의미하며, 대략 30-1,000 nm범위의 직경을 가지고, 다낭체와 원형질막의 융합을 통해 세포 밖 환경으로 방출된다.

[0032] 본 명세서에서 "유효성분으로 포함하는"이란 시금치 속 식물에서 유래된 세포밖 소포체의 효능이나 활성을 달성하는데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다. 본 발명은 천연식물재료인 시금치 속 식물에서 유래된 세포밖 소포체로서, 과량 투여하여도 인체에 부작용이 없으므로 상기 세포밖 소포체가 본 발명의 조성물에 포함된 양적 상한은 통상의 기술자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.

[0033] 본 발명의 상기 세포밖 소포체는 평균 직경이 40 내지 300 nm인 엑소좀일 수 있고, 바람직하게는 50 내지 200

nm, 더욱 바람직하게는 90 내지 130 nm일 수 있다.

[0034] 또한, 엑소좀은 그 막 표면에 다양한 수용체(receptor)와 단백질들이 존재하기 때문에 엑소좀과 유사한 지질 이중막(bilayer lipid)을 갖는 리포솜(liposome)보다 세포에 더 잘 흡수(uptake)되며, 독성 또한 낮은 것으로 이미 밝혀진 바 있다. 이에 따라, 엑소좀의 전달체로서의 기능은 리포솜과 다른 양상으로 일어나며, 효율에서도 차이가 크다. 또한, 리포솜에는 엑소좀의 세포막에 존재하는 다양한 리셉터 또는 단백질들이 존재하지 않기 때문에 상기한 이점을 가질 수 없다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 세포밖 소포체는 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 한외여과, 고분자 침전법, 초고속 원심분리법 및 접선 유동 여과법으로 구성된 군으로부터 어느 하나 이상의 방법에 의해 분리된 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0036] 일 양태로서, 본 발명의 세포밖 소포체는 시금치 속 식물의 조직 또는 세포를 포함하는 생물학적 시료에 대해 한외 여과 및/또는 크기 배제 크로마토그래피를 수행하여 수득한 것일 수 있다.

[0037] 본 명세서에서 용어 "생물학적 시료(biological sample)"는 생물학적 활성을 유지하는 시금치 속 식물체로부터 채취, 분리하거나, 또는 이로부터 유래한 관심 성분의 유효량을 함유하고 있는 가공되지 않거나 또는 전처리된 시료를 의미한다. 구체적으로는, 본 발명에서 이용되는 생물학적 시료는 시금치 속 식물의 착즙액이다.

[0038] 본 명세서에서 용어 "시금치 속 식물의 착즙액" 은 시금치 속 식물에 열이나 효소를 가하지 않고 기계적, 물리적인 힘을 가하여 시금치 속 식물의 내부에 포함된 유용성분을 외부로 유출시켜 얻어진 액상의 유체를 의미하는 것으로, 특별히 한정되지 않으나, 구체적으로 상기 시금치 속 식물의 착즙액은 하기의 방법으로 제조된 것일 수 있다.

[0039] 상기 시금치 속 식물의 착즙액을 제조하기 위하여, 시금치 속 식물을 준비한 후, 시금치 속 식물을 가압하여 착즙액을 제조할 수 있다. 상기 시금치 속 식물은 가압하기 전에 세척하는 과정을 추가로 진행할 수 있다.

[0040] 상기 분쇄된 시금치 속 식물을 가압하여 착즙함으로써, 상기 시금치 속 식물의 유용성분이 충분하게 침출된 시금치 속 식물 착즙액을 제조할 수 있다.

[0041] 이후, 상기 시금치 속 식물의 착즙액을 여과하여 고형물을 제거하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0042] 또한, 상기 고형물이 제거된 시금치 속 식물 착즙액의 여과물을 원심분리하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 원심분리 단계는 7,000 내지 9,000 x g로 1차 원심분리 후 이의 상층액을 19,000 내지 21,000 x g로 2차 원심분리 함으로써 수행되는 것일 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 원심분리 단계는 7,500 내지 8,500 x g로 1차 원심분리 후 이의 상층액을 19,500 내지 20,500 x g로 2차 원심분리 함으로써 수행되는 것일 수 있다.

[0044] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 시금치 속 식물 착즙액에 대해 한외여과를 수행하는 단계를 임의의 순서로 추가적으로 포함할 수 있다.

[0045] 본 명세서에서 용어 "한외여과"는 비균질 혼합용액을 구성하는 각각의 물질을 압력 또는 농도구배에 의해 반투과성 막을 따라 분리시키는 막-기반분리공정을 의미한다. 한외여과 막은 일정한 컷오프 값을 갖는 기공 크기를 갖는다. 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용하는 한외여과는 3 내지 300 kDa의 컷오프(cut-off) 값을 가진다.

[0046] 본 발명의 방법에 한외여과를 수행하는 단계가 추가적으로 포함될 경우, 이는 크기 배제 크로마토그래피 전에 수행될 수도 있으며, 크로마토그래피 완료 후에 수행될 수도 있다.

[0047] 보다 구체적으로는, 본 발명의 방법은 상기 한외여과를 수행하는 단계와 상기 크기 배제 크로마토그래피를 수행하는 단계를 순차적으로 포함한다. 이와 같이 한외여과 후 크기 배제 크로마토그래피를 수행할 경우 한외여과를 통한 농축으로 시료의 부피가 감소한 뒤 크기 배제 크로마토그래피가 적용되어 보다 효율적인 분리공정이 이루어질 수 있다.

[0048] 본 명세서에서 용어 "크기 배제 크로마토그래피(Size Exclusion Chromatography, SEC)"는 비균질 혼합물을 구성하는 각각의 물질 중 정지상의 비드 포어(bead pore) 직경보다 크기가 작은 물질은 포어에 진입하여 상대적으로 느리게 용출되고, 크기가 큰 물질은 포어에 진입하지 않고 이동상을 따라 빠르게 용출됨으로써, 이로부터 유발되는 각 물질의 크기에 따른 이동속도 차이에 기반하여 물질을 분리하는 크로마토그래피를 의미한다.

[0049] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용하는 크기 배제 크로마토그래피는 정지상(stationary phase)의 포어(pore) 평균 직경은 30 내지 75 nm인 것일 수 있다. 바람직하게 상기 정지상의 포어 평균 직경은 65 내지 75 nm인 것일 수 있다.

[0050] 구체적으로 상기 정지상은 수퍼덱스, 세파크릴, 세파덱스, 세파로오즈, 프락토겔, 토요펄 및 Bio-Gel로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 겔 여과 매질일 수 있고, 보다 바람직하게는 Izon science 사로부터 생산된 qEVoriginal(Cat.No: SP1)를 사용하였으나, 이에 제한되지 않는다.

[0051] 상기 크기 배제 크로마토그래피는 당해 업계의 통상의 방법이라면 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 하기 단계들을 통해 수행되는 것일 수 있다.

[0052] (a) 상기 시금치 속 식물 착즙액을 로딩하는 단계; 및

[0053] (b) 용리액으로 분획물을 수득하는 단계.

[0054] 시금치 속 식물 착즙액을 로딩하기 전에, 효율적인 분리공정을 위해 불순물을 제거하고 정지상과의 평형상을 형성할 수 있다.

[0055] 일 양태로서, 상기 크기 배제 크로마토그래피는 평형 완충액을 통해 평형화된 것일 수 있다.

[0056] 상기 평형 완충액과 용리액은 pH 6 내지 pH 8의 인산완충액(phosphate buffered saline; PBS)일 수 있다.

[0057] 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 크기 배제 크로마토그래피에 시금치 속 식물 착즙액을 로딩하고 용리액을 전개시키면 시금치 속 식물 착즙액 중 세포밖 소포체와 같이 큰 분자가 선택적으로 용출되고 나머지 크기가 작은 물질은 상기 크기 배제 크로마토그래피 내부에 머무르게 되어 크기가 큰 세포밖 소포체를 시료로부터 분리할 수 있다. 일반적으로 세포밖 소포체는 다른 불순물에 비해 크기가 큰 입자에 속하기 때문에 용리액에 의한 용출 과정에서 우선적으로 용리액과 함께 용출된다. 용출되는 물질의 분자량은 다공성 정지상의 크기 및 구멍 크기, 컬럼의 길이, 이동상의 유속 등에 따라 상이하며, 동일한 조건에서는 용출되는 분자의 크기가 일정하다.

[0058] 본 발명의 세포밖 소포체는 평균 직경이 500 nm 이하일 수 있고, 바람직하게는 50 nm 내지 300 nm, 더욱 바람직하게는 50 내지 150 nm일 수 있다.

[0059] 따라서 상기 세포밖 소포체의 분리효율을 극대화하기 위해서는 용리된 분획물의 입도를 분석하여 상기 평균 직경을 갖는 분획물을 선택하여 회수하는 것이 보다 바람직하다.

[0060] 본 발명의 일 실시예에서는 Izon science 사로부터 제조된 qEVoriginal로 채워진 컬럼(70 nm)에 인산완충액(1 X PBS, pH 7.4)을 첨가하여 평형시킨 정지상에, 시금치 속 식물 착즙액을 로딩하고, 해당 컬럼에 인산완충액(1 X PBS, pH 7.4)을 용리액으로 주입하여 분획물을 0.5 mL씩 회수한 다음, 나노입자추적분석(Nanoparticle tracking analyzer, NTA)로 분석하였다.

[0062] 한편, 본 발명에서는 지방 전구 세포의 분화시 상기와 같이 분리 및 정제된 시금치 유래 세포밖 소포체를 처리한 결과, 지방 전구 세포의 지방 유사 세포로의 분화를 억제하고 지방 축적도 억제하는 것을 확인하였다.

[0063] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 시금치 속 식물에서 유래된 세포밖 소포체를 유효성분으로 포함하는, 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0064] 본 발명에 있어서, 상기 세포밖 소포체는 평균 직경이 50 내지 300 nm인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0065] 본 발명에 있어서, 상기 세포밖 소포체는 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography) 및/또는 한외여과로 분리된 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0066] 본 발명에 있어서, 상기 세포밖 소포체는 지방 세포 생성, 지방 세포 분화 및/또는 지방 세포 축적을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0067] 즉, 본 발명에 따른 세포밖 소포체는 지방 생성, 축적과 관련되어 성숙한 지방세포에서 발현되는 유전자 중 하나 이상의 유전자 발현의 감소를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0068] 구체적으로 본 발명에 따른 세포밖 소포체는 상기 유전자로서 C/EBP-α, SREBP1 및 PPAR-γ로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 발현의 감소를 통해 지방 세포 생성, 지방 세포 분화 및/또는 지방 세포 축적

을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0069] 본 발명의 용어 "예방"이란, 본 발명의 세포밖 소포체를 포함하는 조성물의 투여로 비만의 증상을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0070] 본 발명의 용어 "치료"란, 본 발명의 세포밖 소포체를 포함하는 조성물의 투여로 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다.

[0071] 본 발명의 조성물은 시금치 속 유래 세포밖 소포체를 포함하는 유효성분이 비만 질환을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 이들 질환 치료의 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 상기 질환에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 "치료" 또는 "치료제"는 "치료 보조" 또는 "치료 보조제"의 의미를 포함한다.

[0072] 본 발명의 약학 조성물은 상기 유효 성분 이외에 약학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0073] 상기 약학 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약학 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0074] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 이때, 개체는 본 발명의 조성물을 투여하여 비만 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.

[0075] 상기 약학 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다.

[0076] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0077] 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0078] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여이다.

[0079] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약학 조성물의 1일 투여량은 0.001 내지 10 g/kg, 바람직하게는 10 내지 300 mg/kg, 더욱 바람직하게는 100 내지 200 mg/kg을 1일 1 내지 4회 투여할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0080] 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0081] 한편, 본 발명의 세포밖 소포체의 1일 투여량은, 10 내지 1,000 mg/kg일 수 있으며, 바람직하게는 20 내지 500 mg/kg일 수 있고, 더욱 바람직하게는 50 내지 500 mg/kg일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 100 내지 500 mg/kg일

수 있고, 더욱 바람직하게는 100 내지 300 mg/kg 또는 200 내지 500 mg/kg일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 200 내지 400 mg/kg일 수 있고, 가장 바람직하게는 200 내지 300 mg/kg일 수 있다.

[0083] 본 발명은 또 다른 관점에서, 시금치 속 식물에서 유래된 세포밖 소포체를 포함하는, 비만 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0084] 본 발명의 용어 "개선"이란, 본 발명의 세포밖 소포체를 포함하는 조성물의 투여로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 것을 의미한다.

[0085] 본 발명에 있어서, 상기 식품 조성물은 식품 첨가제, 음료 또는 음료 첨가제인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0086] 본 발명의 식품 조성물 내지 건강기능식품은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태의 식품에 대한 조성물을 포함한다. 상기 유형의 식품 조성물 내지 건강기능식품은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다. 예를 들면, 건강식품으로는 유산균이 함유된 껌, 발효유, 기능성 음료, 비타민 복합체, 차, 주스 및 드링크 형태로 제조할 수 있으며, 락토바실러스 람노서스 IDCC 3201을 유효성분으로 하는 식품 조성물을 과립화, 캡슐화 또는 분말화하여 섭취할 수 있다.

[0087] 본 발명의 식품 조성물 내지 건강기능식품은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함할 수 있다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0088] 식품 조성물 내지 건강기능식품은 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, pH조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 추출물을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0089] 다른 예로, 식품 조성물 내지 건강기능식품의 제형은 산제, 과립제, 환, 정제, 캡슐제의 형태뿐만 아니라 일반 식품 또는 음료의 형태 어느 것이나 가능하다.

[0090] 식품의 종류에는 특별히 제한은 없고, 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸콜렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함할 수 있다.

[0091] 식품 조성물에서 시금치 유래 세포밖 소포체의 함량은 0.001 내지 50 중량%, 0.01 내지 50중량%, 0.1 내지 50중량%, 0.1 내지 20중량% 또는 1 내지 50중량%일 수 있다.

[0092] 건강기능식품에서 시금치 유래 세포밖 소포체의 함량은 0.1 내지 100중량%, 0.1 내지 50중량%, 0.1 내지 30중량%, 0.1 내지 10중량% 또는 1 내지 10중량%일 수 있다.

[0093] 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 시금치 유래 세포밖 소포체의 함량은 0.1 내지 50중량%, 0.1 내지 20중량% 또는 0.1 내지 10중량% 포함될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있다.

[0094] 일 구체예에 따른 식품 조성물 중 음료는 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0095] 상기 외에 일 구체예에 따른 식품 조성물 내지 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제를 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 식품 조성물 내지 건강기능식품은 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다.

[0097] 본 발명은 또 다른 관점에서, 시금치 속 식물에서 유래된 세포밖 소포체를 포함하는 비만 예방 또는 개선용 의약외품 조성물에 관한 것이다.

[0098] 본 발명에서 용어, "의약외품 조성물"은 사람이나 동물의 질병을 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 조성물로, 구체적으로 피부 외용제 또는 개인위생용품일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0099] 본 발명에 있어서, 상기 의약외품 조성물은 과립, 분말, 정제, 제피제, (마이크로) 캡슐, 시럽 또는 에멀젼인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0100] 시금치 유래 세포밖 소포체를 비만의 예방, 완화 또는 치료 목적으로 의약외품 조성물에 첨가할 경우, 다른 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정할 수 있다.

[0102] 본 발명은 또 다른 관점에서, 시금치 속 식물에서 유래된 세포밖 소포체를 포함하는, 비만 예방 또는 개선용 화장료 조성물에 관한 것이다. .

[0103] 본 발명에 있어서, 상기 화장료 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스쳐 로션, 영양로션, 마사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 스프레이, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징 로션, 클렌징 크림, 바디 로션, 바디 크림, 바디 오일, 바디 세정제, 샴푸, 연고 및 패취로 구성된 군에서 선택되는 제형으로 제조되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0104] 본 발명의 상기 시금치 속 유래 세포밖 소포체를 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물은 피부학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함할 수 있다.

[0105] 상기 부형제로는 이에 한정되지는 않으나 예를 들어, 피부연화제, 피부 침투 증강제, 착색제, 방향제, 유화제, 농화제 및 용매를 포함할 수 있다. 또한, 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제 및 보습제 등을 추가로 포함할 수 있으며, 물성개선을 목적으로 점증제, 무기염류, 합성 고분자 물질 등을 포함할 수 있다.

[0107] **[실시예]**

[0108] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0110] **실시예 1. 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체 분리 및 정제 방법**

[0112] 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체를 고순도, 고품질로 정제하여 불순물을 제외하고 온전한 상태의 세포밖 소포체의 효과를 확인하고자, 크기 배제 크로마토그래피 및 한외여과(ultrafiltration)를 진행하였다.

[0113] 일반 시금치와 겨울 노지 시금치로부터 각각 세포밖 소포체를 분리 및 정제하여 실험을 진행하였다.

[0114] 구체적으로, Amicon Ultra®10kDa centrifugal filter (Merck Millipore, Cat. No:UFC901024)에 착즙한 시금치 용액을 13 mL을 넣어준 후 5,000 x g로 3시간 동안 4℃에서 원심분리를 진행한 후 얻어진 상층액 0.5 mL를 200nm 시린지 필터에 가하여 Eppendorf 튜브 1.5 mL (SPL, Cat. No: 50015)에 옮겨주었다(도 1).

[0115] qEV original/70 nm(Izon science, Cat.No: SP1)을 클램프 스탠드에 고정한 후 qEV original 컬럼에 있던 PBS 용액을 제거하고 1X PBS (pH7.4) 용액 10 mL을 중력으로 평형을 진행하였다. 다음으로 이전 단계에서 여과된 시금치 착즙 용액 0.5 mL를 qEV original 컬럼에 주입하고 용액이 모두 크기 배제 크로마토그래피 비드로 넘어가게 되면 PBS 용액을 넣어주었다. 이때 크기 배제 크로마토그래피가 받는 중력의 힘을 일정하게 유지하기 위하여 PBS가 2 mL이 넘지 않도록 계속하여 주입하였다. 내려오는 용액을 하나의 Eppendorf 튜브에 0.5 - 1.5 mL씩 담

아 결과적으로 총 33개의 분획을 얻었다(도 2).

[0116] 실험 데이터에서는 일반 시금치 유래 세포밖 소포체 결과를 Spinex로 표시하고, 겨울 노지 시금치 유래 세포밖 소포체 결과를 N-Spinex로 표시하였다.

[0118] **실시예 2. 시금치 속 식물 유래 세포 밖 소포체의 크기 분포도 및 정제도**

[0120] 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체를 각각 PBS로 희석시킨 후 나노입자추적분석기(Nanoparticle tracking analyzer, NTA)를 이용하여 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체의 크기 분포도를 측정하였다.

[0121] 다음으로 크기 배제 크로마토그래피를 거친 용액의 단백질 농도를 확인하기 위하여 BCA 어세이를 통해 각 분획의 단백질 농도를 정량화하였다. 단백질의 농도희석을 두 가지로 측정하였으며, 우선 희석없이 해당 용액을 바로 찍는 과정과 PBS와 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체를 희석한 샘플을 측정하여 BSA 표준곡선 내에 들어오는 단백질의 농도를 확인하였다.

[0122] 그 결과, 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체는 50nm 내지 300nm의 크기 분포를 보이고, 실시예 1의 33개 분획 중 6 내지 11번째 분획에서 정제되는 것을 확인하였다 (도 3).

[0123]

[0124] **실시예 3. 시금치 속 식물 유래 세포 밖 소포체의 세포 독성 평가**

[0126] 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체의 세포 독성을 평가하고자 하였다. 세포 독성은 WST(water soluble tetrazolium salt)를 이용한 분석 키트인 EZ-Cytox (DoGENBio, CAT.No:EZ-3000)를 사용하여 평가하였다.

[0127] 이를 위하여 가장 먼저 96-웰 세포 배양 플레이트에 5.0×10^3 cells/cm^2으로 지방 전구 세포 (3T3-L1, 한국 세포주 은행)를 분주하고, 10% 우아혈청(BCS)과 1% 페니실린 및 스트렙토마이신이 포함된 DMEM 배지를 이용하여 37℃의 5% CO_2 조건에서 24시간 배양하여 세포의 부착 및 안정화를 유도하였다. 이후, 기존 배지를 모두 제거하고, 엑소좀이 제거된 FBS를 10%가 되도록 DMEM/F12 (1:1)에 첨가한 배지에 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체를 농도별로 처리한 후, 세포에 분주하고 48시간 배양하였다.

[0128] 엑소좀이 제거된 FBS를 10%가 되도록 DMEM/F12 (1:1)에 첨가한 배지에 EZ-Cytox를 1:10으로 희석한 용액을 웰당 100 μL씩 첨가하고 37℃의 5% CO_2 및 차광 조건에서 1시간 동안 인큐베이션을 진행한 후, spectral scanning multimode reader인 Varioskan Flash (Thermo Fisher, Cat.No:5250030) 장비를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0129] 흡광도 측정 후 세포 독성 평가를 위한 세포 생존률은 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체를 처리한 그룹의 흡광도를 처리하지 않은 그룹의 흡광도로 나누고 100을 곱하여 계산하였다.

[0130] 그 결과, 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체의 농도를 1.0×10^8 - 5.0×10^{10} particles/mL로 처리한 모든 실험군에서 지방 전구 세포의 생존률에 영향을 끼치지 않는 것을 확인할 수 있었다 (도 4).

[0132] **실시예 4. 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체의 지방 유사 세포로의 분화 및 지방 생성, 축적 억제 효과**

[0134] 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체가 지방 유사 세포로의 분화 및 지방 생성, 축적을 억제하는지 확인하고자, 지방 전구 세포(3T3-L1)를 이용하여 실험을 진행하였다.

[0135] 먼저 지방 전구 세포(3T3-L1)를 24-웰 세포 배양 플레이트에 1.0×10^4 cells/cm^2으로 접종하고, 10% 우아혈청(BCS)과 1% 페니실린 및 스트렙토마이신이 포함된 DMEM 배지를 이용하여 세포가 플레이트 표면으로 완전히 덮여 단층으로 성장할 공간이 더 이상 남아 있지 않을 시점까지 배지를 교체하며 배양하였다.

[0136] 이후 지방 유사 세포로 분화를 유도할 수 있도록 3T3-L1 Differentiation Kit (abcam, Cat.No: ab287843)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 지방 전구 세포의 분화를 유도하였다. 세포 분화 배지로 교체하는 시점에서 0.5 - 1.0 x 10^{10} particles/mL의 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체를 첨가하여 3일 동안 배양하였다.

[0137] 지방 유사 세포로 분화가 유도된 3일 후 세포의 유지를 위해 세포 유지 배지로 대체하였다. 세포 유지 배지로 대체할 때 0.5 - 5.0 x 10^{10} particles/mL의 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체를 첨가하여 처리하였다. 2 - 3일마다 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체가 포함된 새로운 세포 유지 배지로 교체해주며 배양하며 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체가 세포에 총 4회 처리되도록 하였다.

[0138] 마지막 처리 후 2일 뒤에 중성 지질 염료인 Oil Red O를 이용하여 지질 방울을 염색하여 지방의 축적 정도를 확인한다. 광학 현미경을 통해 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체가 지방 전구 세포 및 지방 유사 세포에 끼친 지방 축적 정도를 관찰하였다.

[0139] 그 결과, 지방 전구 세포의 지방 유사 세포로의 분화 과정에 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체를 배지에 함께 처리한 경우, 지방 세포로의 분화가 현저히 저해된 것을 확인할 수 있었다 (도 5).

[0141] 광학 현미경을 통해 세포를 관찰한 후, 분화된 지방 유사 세포에 존재하는 상대적인 지질 함량을 정량적으로 비교하고자 하였다.

[0142] 이를 위하여 각 웰에서 PBS를 제거하고, 100% 이소프로판올을 500 μL 첨가한 후 100 μL만을 취해서 96-웰 세포 배양 플레이트에 분주한 후 spectral scanning multimode reader인 Varioskan Flash (Thermo Fisher, Cat.No: 5250030) 장비를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0143] 그 결과, 지방 전구 세포의 지방 유사 세포로의 분화 과정에 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체를 배지에 함께 처리한 경우, 지방 축적이 대조군과 비교하여 20% 이상 감소함을 확인하였다 (도 6).

[0145] **실시예 5. 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체의 지방 유사 세포로의 분화 및 축적에 관여하는 전사 인자 억제 효과**

[0147] 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체가 지방 전구 세포를 지방 유사 세포로의 분화 및 지방 세포의 지방 축적을 억제하는 기전을 이해하고자, 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체가 지방 분화 및 축적에 관여하는 전사 인자에 미치는 영향을 확인하였다.

[0148] 이를 위하여, 실시예 4에서와 같이 분화가 유도된 지방 유사 세포에서 RNA를 추출하여 real-time RT-PCR (Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction) 분석을 진행하였다.

[0149] 우선 분화가 유도된 3T3-L1 세포에서 FavorPrep™Reagent (FAVORGEN, Cat.No:FATRR 001)를 첨가하여 제조사 지침에 따라 RNA를 분리 및 정제하였다. 정제된 RNA는 제조사 지침에 따라 everTra ACE™qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, Cat.No:FSQ-301)를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA는 THUNDERBIRD™ SYBR™CR Mix (TOYOBO, Cat.No:QPS-201)를 이용하여 StepOnePlus™Real-Time PCR system (Thermo Fisher, Cat.No:4376600) 기기로 유전자 발현 정도를 측정 및 평가하였다. Internal control로 housekeeping gene인 beta-actin의 유전자 발현량을 확인하고 지방세포 분화와 관련된 인자인 CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP-α), sterol regulatory element- binding protein-1 (SREBP1), peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-γ의 유전자 발현량을 확인하였다.

[0151] PCR에 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다.

표 1

[0153]

C/EBP-α F	5'-TGCTGGAGTTGACCAGTGAC
C/EBP-α R	5'-AAACCATCCTCTGGGTCTCC
SREBP1 F	5'-GGAGACATCGCAAACAAGCTGA
SREBP1 R	5'-CAGACTGCAGGCCAGATCCA
PPAR-γ F	5'-TCGCTGATGCACTGCCTATG
PPAR-γ R	5'-GAGAGGTCCACAGAGCTGATT

[0155] 실험 결과, 지방 전구 세포에 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체를 처리하여 분화를 유도하는 경우, C/EBP-α, SREBP1, PPAR-γ 유전자의 발현이 감소된 것을 확인하였으며, 이를 통해 시금치 속 식물 유래 세포밖 소포체의 지방 세포 분화 및 지방 축적의 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다(도 7).

[0157] **실시예 6. 시금치속 식물 유래 세포밖 소포체의 체중 감소 효과 확인**

[0159] 시금치속 유래 세포밖 소포체가 체중과 체지방에 미치는 영향을 평가하기 위해 마우스에 고지방식이 후 시금치속 유래 세포밖 소포체를 6주간 경구 투여 진행하고, 체중 변화를 관찰하였다.

[0160] 이를 위하여, 20g 이내의 C57BL/6J 마우스(㈜ 디비엘) 마우스를 각 그룹당 3 마리씩 무작위로 배정하고, 정상식이(㈜ 오리엔트바이오)로 1주일의 순응 기간 후, 정상식이 유지(대조군) 또는 고지방식이(㈜ 라온바이오)를 진행하였으며, 고지방식이 마우스 실험군에 시금치속 유래 세포밖 소포체 투여를 시작하였다. 시금치속 유래 세포밖 소포체는 각각 $5.0x10^{9}$ particles, $5.0x10^{10}$ particles, $2.0x10^{11}$ particles로 고지방식이 시작 후 일주일은 매일 투여하였고 2주차부터는 이틀에 한 번씩 총 6주차 동안 투여를 진행하였다. 한편, 비만 마우스에서 항비만 및 항고지혈증 효과를 강화한다고 알려진 rutin(케이맨 화학회사)을 마우스 kg 당 50 mg을 DMSO에 녹여 양성 대조군으로 투여하였다.

[0161] 그 결과, 도 8에서와 같이, 고지방식이를 진행한 마우스의 체중이 증가하는 반면, rutin 및 시금치속 유래 세포밖 소포체를 투여한 마우스는 체중 증가 정도가 개선된 것을 확인할 수 있었다. 특히, 본 발명에 따라 시금치속 유래 세포밖 소포체를 투여한 마우스는 rutin 투여군에 비해서도 현저히 우수한 체중 증가 억제 효과를 나타내었으며, 고지방식이 마우스에서 정상식이 마우스와 유사한 수준으로까지 체중 증가를 억제할 수 있음을 확인할 수 있었다.

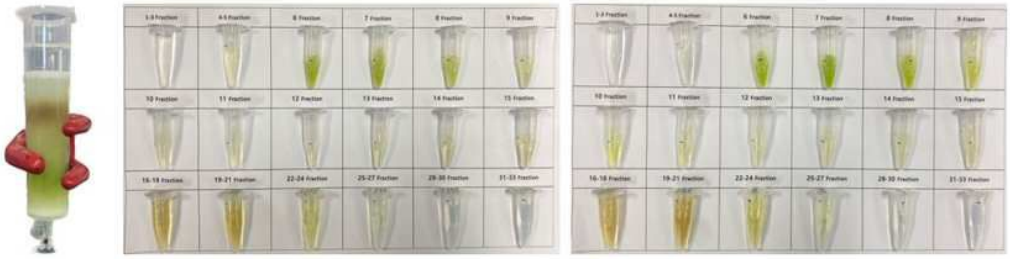
[0163] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1

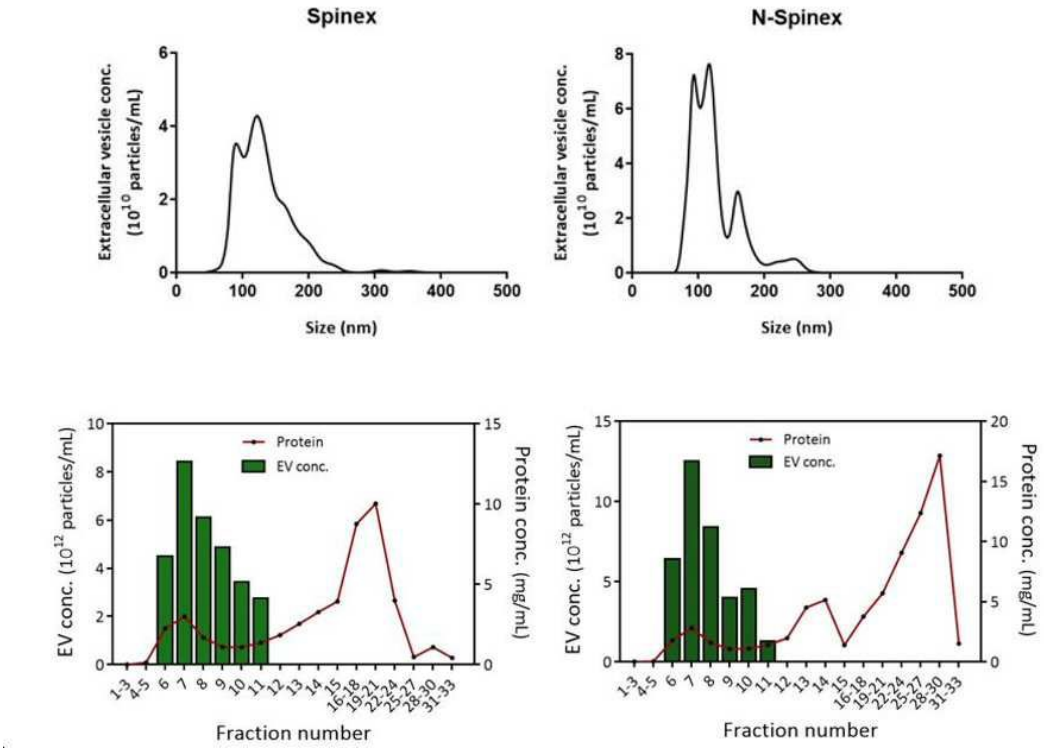


도면2

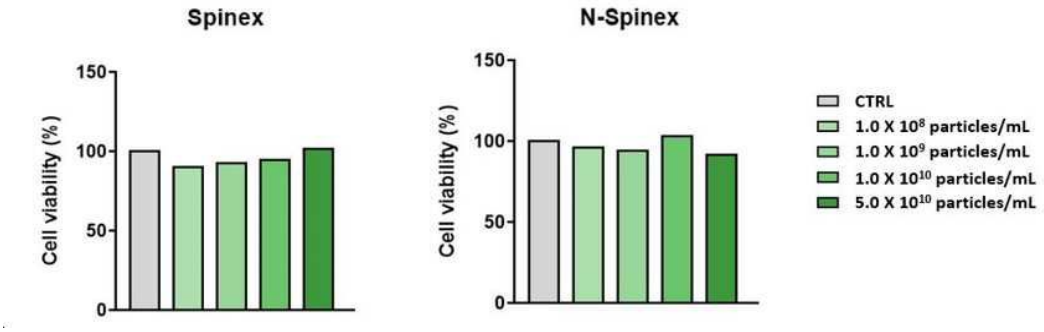


(Spinex) (N-Spinex)

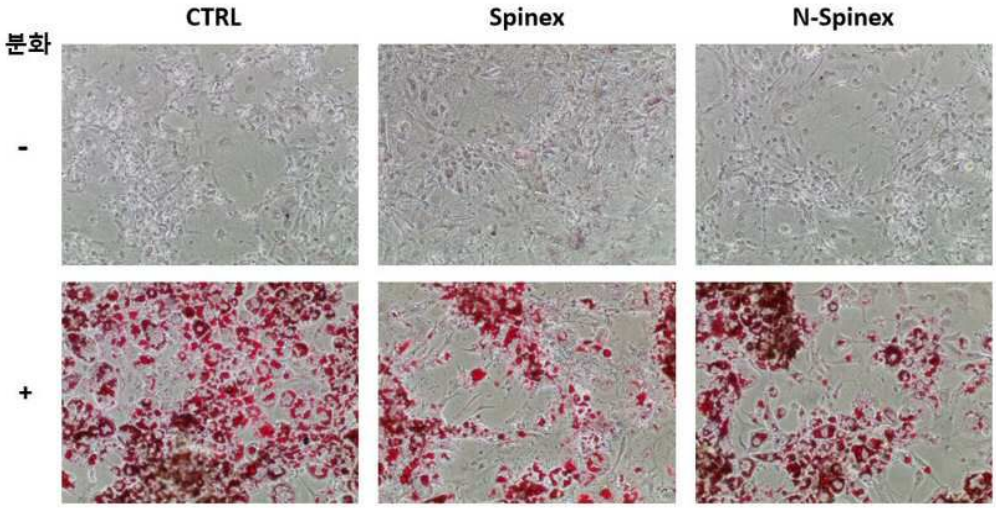
도면3


Spinex
N-Spinex
Extracellular vesicle conc. (10^{10} particles/mL)
Size (nm)
Protein
EV conc.
EV conc. (10^{12} particles/mL)
Protein conc. (mg/mL)
Fraction number

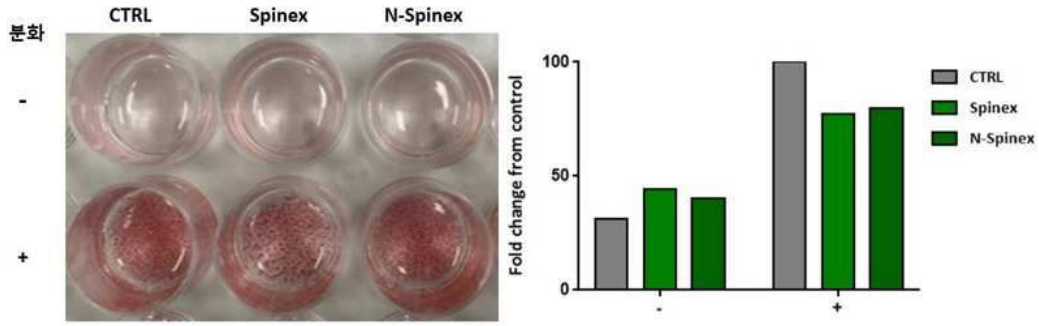
도면4


Spinex
N-Spinex
Cell viability (%)
CTRL
1.0 X 10^8 particles/mL
1.0 X 10^9 particles/mL
1.0 X 10^{10} particles/mL
5.0 X 10^{10} particles/mL

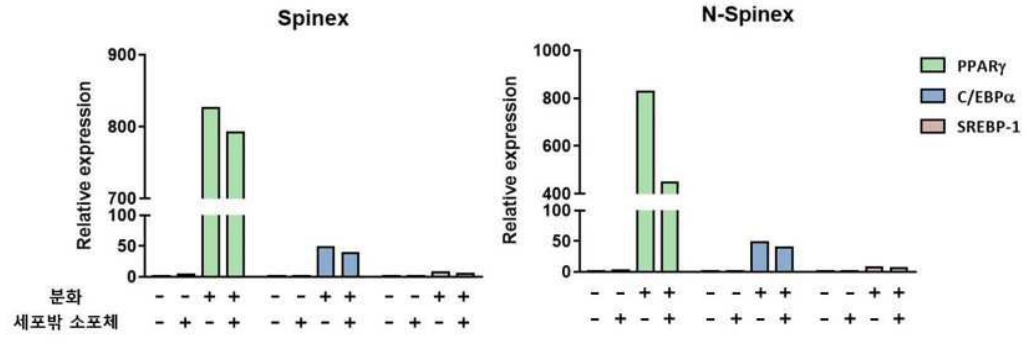
도면5


CTRL
Spinex
N-Spinex
분화
-
+

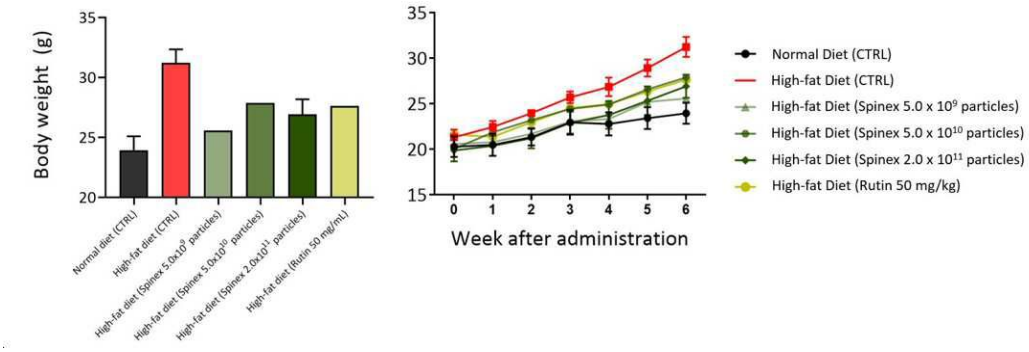
도면6


CTRL
Spinex
N-Spinex
분화
-
+
Fold change from control
100
50
0
CTRL
Spinex
N-Spinex

도면7


Spinex
N-Spinex
Relative expression
900
800
700
100
50
0
1000
800
600
400
PPARγ
C/EBPα
SREBP-1
분화
세포밖 소포체

도면8


Body weight (g)
35
30
25
20
Normal diet (CTRL)
High-fat diet (CTRL)
High-fat diet (Spinex 5.0x10^9 particles)
High-fat diet (Spinex 5.0x10^10 particles)
High-fat diet (Spinex 2.0x10^11 particles)
High-fat diet (Rutin 50 mg/mL)
35
30
25
20
15
0
1
2
3
4
5
6
Week after administration
Normal Diet (CTRL)
High-fat Diet (CTRL)
High-fat Diet (Spinex 5.0 x 10^9 particles)
High-fat Diet (Spinex 5.0 x 10^10 particles)
High-fat Diet (Spinex 2.0 x 10^11 particles)
High-fat Diet (Rutin 50 mg/kg)

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.