

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 12월 8일 (08.12.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/195357 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 31/045 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/005721
- (22) 국제출원일: 2016년 5월 30일 (30.05.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0078715 2015년 6월 3일 (03.06.2015) KR
- (71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 03722 서울시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 공학원 1층, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 박태선 (PARK, Tae Sun); 03174 서울시 종로구 사직로 8길 파크팰리스 20, 101동 503호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06575 서울시 서초구 사평대로 108 3층 (반포동), 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, 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.

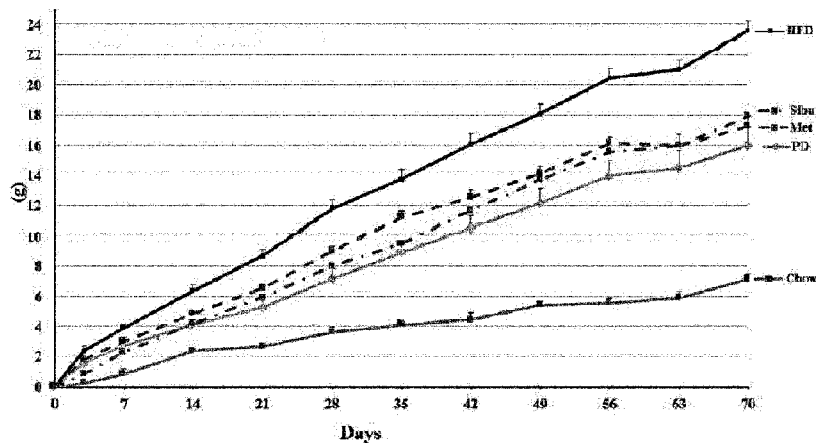
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, 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 제 21 조(3))

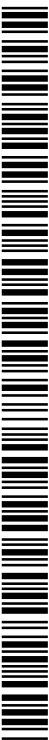
(54) Title: NOVEL USE OF PINOCARVEOL

(54) 발명의 명칭 : 피노카베올의 신규한 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition comprising pinocarveol for preventing or treating metabolic diseases, and functional food composition using the pharmaceutical composition for improving or alleviating metabolic diseases. Pinocarveol according to the present invention reduces weight, visceral fat, and cholesterol concentration, improves blood kidney function index, reduces blood sugar, and additionally inhibits a metabolic inflammation reaction, and thus can be effectively used ultimately as a medical or functional food composition exhibiting prevention or treatment activities for metabolic diseases selected from the group consisting of obesity, diabetes, dyslipidemia, and syndromes of fatty liver and insulin-resistance.

(57) 요약서: 본 발명은 피노카베올(pinocarveol)을 포함하는 대사질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 이를 이용한 대사질환의 개선 또는 완화용 기능성 식품 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 피노카베올은 체중 및 내장지방을 감소시키고, 혈중 지질농도를 감소시키며, 혈중 간기능지표를 개선시키고, 혈당을 감소시킬 뿐 아니라 대사성염증반응을 억제함으로써 궁극적으로 비만, 당뇨, 이상지질혈증, 지방간 및 인슐린 저항성 증후군으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환의 예방 또는 치료 활성을 나타내는 의약 또는 기능성 식품 조성물로서 유용하게 이용될 수 있다.



WO 2016/195357 A1

명세서

발명의 명칭: 피노카베올의 신규한 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 대한민국 농림축산식품부의 지원 하에서 과제번호 1130373에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 농림수산식품기술기획평가원, 연구사업명은 “기술산업화지원사업”, 연구과제명은 “한인진추출물을 활용한 체중조절 및 대사성질환 개선 용도의 개별인정형 건강기능식품 원료 개발”, 주관기관은 연세대학교 산학협력단, 연구기간은 2013. 12. 04 ~ 2016. 12. 03 이다.
- [2] 본 발명은 또한 대한민국 교육과학기술부의 지원하에서 과제번호 2015R1A5A6001906에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국연구재단, 연구사업명은 “선도연구센터 육성사업 이공학분야(SRC)”, 연구과제명은 “식품영양유전체연구센터”, 주관기관은 경북대학교 산학협력단, 연구기간은 2015. 03. 01 ~ 2016. 2. 28 이다.
- [3] 본 특허출원은 2015년 6월 3일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2015-0078715호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [4]
- [5] 본 발명은 피노카베올을 유효성분으로 포함하는 대사질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 대사질환 예방 또는 개선용 기능성 식품 조성물에 관한 것이다.

[6]

배경기술

- [7] 생활환경의 변화에 의해 현대인들의 내장지방형 비만이 증가하면서 당뇨병, 고혈압, 지질대사이상, 인슐린저항성 등을 수반하는 대사증후군(metabolic syndrome)의 발병이 급증하고 있다. 이들 질환은 상호간의 발생위험을 증가시키며, 노화, 스트레스 및 면역기능저하 등의 다원적인 생체대사변화와 관련이 있는 공통 질환이다. 비만은 외관상의 문제뿐 아니라, 지방간, 고혈압, 당뇨병, 심혈관계 질환 등의 만성질환을 유발한다.
- [8] 세계인구 중 약 25%에 해당하는 17억명이 현재 과체중(BMI>25)이고, 주요 시장인 미국, 유럽, 일본의 1억2천명을 포함한 서구지역의 3억명 이상이 비만환자(BMI> 30)로 분류되고 있다. OECD 국가 중에서 비만율이 가장 높은 나라는 미국으로, 전 국민의 31%가 비만환자이고, 그 다음이 멕시코(24%), 영국(23%), 그리스(22%), 호주(22%), 뉴질랜드(21%), 헝가리(19%), 캐나다(14%), 스페인(13%), 아일랜드(13%), 독일(13%), 포르투갈(13%), 핀란드(13%), 터키(12%), 벨기에(12%)의 순으로 전체 인구 중 비만환자 비율이 높게 나타나고

있다. 중국은 7천만명이 비만인구이고, 급속도로 체중조절 관련 시장이 확대되고 있으며, 총 시장규모는 100억위안 정도로 예측하고 있다. 아울러 현재 세계적으로 어린이 5명 중 1명이 소아비만에 해당되며, 그 숫자도 급속도로 증가하고 있어 소아비만이 심각한 사회문제로 대두되고 있다. 소아비만은 혈중 콜레스테롤과 중성지방의 수치가 높아 생활습관병으로 불리는 당뇨, 고혈압, 뇌졸중 등의 주요 원인이 되고, 소아비만의 80% 이상이 성인비만으로 연결되어 나이가 들수록 비만으로 인한 건강상의 문제는 더욱 심각해질 수 있다. 또한 지방이 많을수록 성호르몬 분비가 자극되어 나이에 비해 사춘기가 빨리 찾아와 성장장애를 가져올 수 있으며, 혈액순환 및 영양 공급에도 영향을 미쳐 성장저해요소의 원인이 되었다.

- [9] 비알코올성 지방간질환(non-alcoholic fatty liver disease, 이하 NAFLD)은 음주와 관계없이 간 내에 중성지방이 축적되는 질환을 의미하고, 여기에는 단순지방간(steatosis)과 비알코올성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)을 포함한다. 단순 지방간은 임상적으로 예후가 양호한 양성 질환으로 생각되고 있으나, 지방간과 함께 염증 혹은 섬유화를 동반하는 NASH는 진행성 간질환으로 간경변 또는 간암을 유발하는 전구 질환으로 인지되고 있다.
- [10] 비만과 인슐린저항성은 대표적인 비알코올성 지방간질환의 위험인자이다. 간염유증 진행의 위험인자로써 가령, 비만(BMI>30), 혈중 간기능지표 비율(AST/ALT>1) 및 당뇨를 들 수 있고, 특히 C형 간염 보균자가 비알코올지방간일 경우 간암까지 진행될 수 있어 예방 및 치료의 필요성이 대두되고 있다. 비알코올성 지방간환자의 69-100%는 비만환자이고, 비만환자의 20-40%는 비알코올성 지방간을 동반하며, 특히, 남성 비만환자의 간질환 유병율이 여성비만자에 비해 더 높게 나타난다. 서구사회에서는 비만환자뿐만 아니라 정상체중 성인의 3-30%가 비알코올성 지방간병변을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 우리와 식생활이 유사한 일본의 비알코올성 지방간 유병율은 약 20%로 추정되며, 이중 1%가 NASH로 추정된다. 비알코올성 지방간은 성인 뿐 아니라 비만아동에서도 문제가 된다. 비만아동(유럽, 미국 및 아시아 거주)의 10-77%가 비알코올성 지방간 병변을 보이는데, 이는 비알코올성 간질환의 가장 중요한 위험인자가 비만이기 때문이다.
- [11] 국내외에서 판매되는 비만치료제로는 미 FDA에서 승인을 받은 orlistat을 주원료로 하는 ‘제니칼’(대한민국로슈), sibutramine을 원료로 하는 ‘리덕틸’(일성신약) 및 녹차 카테콜 성분을 원료로 하는 ‘엑소리제’(구주제약)등이 있다. 리파아제작용을 억제하는 제니칼의 경우 지방변, 가스생성, 지용성비타민 흡수저하 등의 위장계 부작용을, 그리고 리덕틸의 경우에는 교감신경계의 세로토닌과 노르아드레날린 농도를 증가시킴으로써 두통, 구갈, 식욕부진, 불면, 변비 등의 부작용을 나타낸다. 이외에도 그동안 항비만 약제로 개발된 제품 중에는 심각한 부작용으로 인해 판매가 금지된 것들도 상당수에 이른다. 예를 들어, 아미노필린은 탁월한 체지방

분해효과에도 불구하고 정신 신경계, 순환기계, 소화기계에 걸쳐 폭넓은 부작용이 보고된 바 있고, 펜프루라민, 텍스펜플루라민, 토피라메이, 에페드린 등도 비만치료 부적합 약물로 판정되어 판매가 금지되었다. 이와 같이 종래의 합성의약품이 부작용으로 인한 한계를 보임에 따라, 안전하고 장기 복용이 가능하여 만성질환의 치료에 적합한 새로운 비만 치료용 조성물의 개발에 대한 요구가 커지고 있다.

[12]

[13] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[14]

[15] 본 발명의 선행특허 문헌으로는 대한민국 등록특허 제1078376호 및 대한민국 등록특허 제1186500호가 있다.

[16]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[17] 본 발명자들은 비만, 당뇨, 이상지질혈증, 지방간 및 인슐린 저항성 증후군 등을 포함하는 대사질환의 예방 또는 치료 활성을 갖는 화합물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 피노카베올(pinocarveol)이 체내 지방 및 혈당을 감소시키고 다양한 대사질환의 지표를 크게 개선시킴으로서 상기 대사질환에 대한 예방, 개선 및 치료효과를 가진다는 사실을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[18] 따라서 본 발명의 목적은 피노카베올을 유효성분으로 포함하는 비만, 당뇨, 이상지질혈증, 지방간 및 인슐린 저항성 증후군으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[19] 본 발명의 또 다른 목적은 피노카베올을 유효성분으로 포함하는 비만, 당뇨, 이상지질혈증, 지방간 및 인슐린 저항성 증후군으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환의 예방 또는 개선용 기능성 식품 조성물을 제공하는 데 있다.

[20] 본 발명의 또 다른 목적은 비만, 당뇨, 이상지질혈증(dyslipidemia), 지방간 및 인슐린 저항성 증후군(insulin resistance syndrome)으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환(metabolic disease)의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 데 있다.

[21]

[22] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

[23]

과제 해결 수단

- [24] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 피노카베올(pinocarveol)을 유효성분으로 포함하는 비만, 당뇨, 이상지질혈증(dyslipidemia), 지방간 및 인슐린 저항성 증후군(insulin resistance syndrome)으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환(metabolic disease)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다:
- [25]
- [26] 본 발명자들은 비만, 당뇨, 이상지질혈증, 지방간 및 인슐린 저항성 증후군 등을 포함하는 대사질환의 예방 또는 치료 활성을 갖는 화합물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 피노카베올(pinocarveol)이 체내 지방 및 혈당을 감소시키고 다양한 대사질환의 지표를 크게 개선시킴으로서 상기 대사질환에 대한 예방, 개선 및 치료효과를 가진다는 사실을 확인하였다.
- [27] 본 명세서에서 사용되는 용어 “피노카베올”은 바이사이클릭 모노터펜계 화합물로서 IUPAC 명칭은 6,6-디메틸-2-메틸렌바이사이클로[3,1,1]헵탄-3-올(6,6-dimethyl-2-methylenebicyclo[3,1,1]heptan-3-ol)이다. 구조식은 $C_{10}H_{16}O$ 이고, 분자량은 152.2 g/mol 이다. 투명한 연노랑색의 액체이며 물에는 녹지 않고 기름과 에탄올에 용해된다. 피노카베올은 착향료로 사용되며 나무향(woody), 시원한 민트향(cooling minty), 소나무향(pine-like)을 내고, 식용가능한 안전한 물질로 알려져 있으며, FEMA(Flavor and Extract Manufacturers' Association), FDA (Food and Drug Administration), KFDA (Korea Food and Drug Administration), EC (European Community), JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)에 착향료(flavor and fragrance agents) 성분으로 승인되어 있고, 산업적으로 맛과 향을 내기 위한 목적으로 이용되어 왔다. 그러나 피노카베올의 생리활성에 대한 보고는 전무한 상태이다.
- [28] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 피노카베올은 트랜스-피노카베올이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 피노카베올은 (-)-트랜스-피노카베올이다.
- [29] 본 발명의 피노카베올은 약제학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있다.
- [30] 구체적으로는, 본 발명의 피노카베올의 약제학적 허용 가능한 염은 염산염, 브롬산염, 황산염, 인산염, 구연산염, 아세트산염, 트리플루오로아세트산염, 젖산염, 주석산염, 말레인산염, 푸마린산염, 글루콘산염, 메탄설폰산염, 글리콘산염, 숙신산염, 4-톨루엔설폰산염, 글루투론산염, 엠본산염, 글루탐산염, 또는 아스파르트산염으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에서 통상적으로 사용되는 다양한 무기산 및 유기산을 이용하여

형성되는 염이 모두 포함된다. 또한, 본 발명의 화합물은 용매화물(예를 들면 수화물)의 형태로도 존재할 수 있다.

- [31] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 피노카베올 또는 이의 약제학적 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 비만, 당뇨병, 이상지질혈증, 지방간 및 인슐린 저항성 증후군으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [32] 본 발명에 따르면, 본 발명의 피노카베올은 체중 및 내장지방을 감소시키고, 혈중 지질농도를 감소시키며, 혈중 간기능지표를 개선시키고, 혈당을 감소시킬 뿐 아니라 대사성염증반응을 억제함이 확인되었다. 이에, 본 발명의 화합물은 다양한 대사질환(metabolic disease)을 다각적으로 개선하는 효율적인 예방 또는 치료 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.
- [33] 본 명세서에서 사용되는 용어“당뇨”는 포도당-비관용(intolerance)을 초래하는 인슐린의 상대적 또는 절대적 부족으로 특징되는 만성질환을 의미한다. 본 발명의 당뇨병은 모든 종류의 당뇨병을 포함하며, 예를 들어, 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병 및 유전성 당뇨병을 포함한다. 제1형 당뇨병은 인슐린 의존성 당뇨병으로서, β -세포의 파괴에 의해 주로 초래된다. 제2형 당뇨병은 인슐린 비의존성 당뇨병으로서, 식사 후 불충분한 인슐린 분비에 의해 초래되거나 또는 인슐린 내성에 의해 초래된다.
- [34] 본 명세서에서 사용되는 용어 “이상지질혈증”은 고지혈증을 포함하는 개념으로, 혈액내의 지방수치 증가로 나타나는 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증, 낮은 HDL-콜레스테롤혈증 외에도 지단백의 대사이상 등의 문제로 나타나는 비정상적 지질상태를 의미한다.
- [35] 본 명세서에서 사용되는 용어 “지방간”은 간의 지방대사 장애로 지방이 간세포에 과도한 양으로 축적된 상태를 말하며, 이는 협심증, 심근경색, 뇌졸중, 동맥경화, 지방간 및 췌장염 등과 같은 다양한 질병의 원인이 된다.
- [36] 본 명세서에서 사용되는 용어 “인슐린 저항성”은 혈당을 낮추는 인슐린의 기능이 떨어져 세포가 포도당을 효과적으로 연소하지 못하는 것을 말한다. 인슐린 저항성이 높을 경우, 인체는 너무 많은 인슐린을 만들어 내고 이로 인해 고혈압이나 이상지질혈증은 물론 심장병, 당뇨병 등까지 초래할 수 있다. 특히 제2형 당뇨병에서는 근육과 지방조직에서 인슐린의 증가를 알아채지 못하여, 인슐린의 작용이 일어나지 않는다.
- [37] 본 명세서에서 사용되는 용어 “인슐린 저항성 증후군”은 상기 인슐린 저항성에 의하여 유발된 질환을 총칭하는 개념으로 인슐린 작용에 대한 세포의 저항성, 고인슐린혈증 및 초저밀도지단백(very low density lipoprotein, VLDL)과 중성지방의 증가, 고밀도지단백(high density lipoprotein, HDL)의 감소 및 고혈압 등을 특징으로 하는 질환을 의미하며, 심혈관질환과 제2형 당뇨병의 위험인자로 인식되고 있는 개념이다(Reaven GM, Diabetes, 37: 1595-607, (1988)). 또한 인슐린 저항성은 고혈압, 당뇨병 및 흡연 등의 위험인자들과 함께 세포 내 산화스트레스를

증가시키고 신호전달체계를 변화시켜 염증반응을 유발하여 죽상경화증을 진행시킨다고 알려져 있다(Freeman BA et al, Lab Invest 47: 412-26, (1982)), Kawamura M et al, J Clin Invest 94: 771-8, (1994)).

- [38] 본 명세서에서 사용되는 용어 “대사질환”은 각종 심혈관 질환과 제2형 당뇨병의 위험 요인들이 서로 군집을 이루는 현상을 한 가지 질환군으로 개념화시킨 것으로 인슐린 저항성 및 이와 관련된 복잡하고 다양한 여러 대사이상과 임상 양상을 모두 포괄하여 의미하는 개념이다. 1988년 Reaven은 이러한 증상들의 공통적인 원인이 체내의 인슐린 작용이 잘되지 않는 인슐린 저항성임을 주장하고 인슐린 저항성 증후군이라고 명명했으나 1998년 세계보건기구(WHO)는 인슐린 저항성이 이 증상들의 모든 요소를 다 설명할 수 없기에 대사증후군 또는 대사질환이라는 용어를 도입하였다.
- [39] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 치료 또는 예방되는 이상지질혈증은 고지혈증이다.
- [40] 본 명세서에서 사용되는 용어“고지혈증”은 중성 지방과 콜레스테롤 등의 지방대사가 제대로 이루어지지 않아 혈액 중에 지방량이 많아 유발되는 질환을 말한다. 보다 구체적으로 고지혈증이란 혈액내의 중성지방, LDL 콜레스테롤, 인지질 및 유리 지방산 등의 지질 성분이 증가된 상태로 발생빈도가 높은 고콜레스테롤혈증 또는 고중성지방혈증을 포함한다.
- [41] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 치료 또는 예방되는 지방간은 비알콜성 지방간이다.
- [42] 본 명세서에서 용어“비알콜성 지방간(Non-alcoholic fatty liver, NAFL)”은 과도한 알콜의 흡수와 무관하게 간세포에 과도한 양의 지방이 축적되는 질환을 의미한다.
- [43] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 체중 또는 식이효율을 감소시킨다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 체중 또는 식이효율을 10%, 20% 또는 30% 이상 감소시킨다. 본 발명의 어떠한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 체중 또는 식이효율을 10-60%, 20-60%, 30-60%, 10-50%, 20-50%, 30-50%, 10-40%, 20-40% 또는 30-40% 감소시킨다. 하기 실시예에서 입증한 바와 같이 피노카베올을 보충 섭취시킨 군(PD)에서 고지방식이대조군(HFD)에 비해 누적체중 증가량은 32%, 식이효율은 32% 감소함을 확인하였다(도 1a-1d).
- [44] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 내장 지방을 감소시킨다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 내장 지방을 10%, 20% 또는 30% 이상 감소시킨다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 내장 지방을 10-60%, 20-60%, 30-60%, 10-50%, 20-50%, 30-50%, 10-40%, 20-40% 또는 30-40% 감소시킨다. 하기 실시예에서 입증한 바와 같이 피노카베올을 보충 섭취시킨 군(PD)에서 고지방식이대조군(HFD)에 비해 내장 지방 무게가 32% 감소함을 확인하였다(도 2a-2b). 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 내장

지방은 부고환지방, 신장주변지방, 장간막지방 및 후복강지방으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 지방이다.

[45] 따라서 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물은 고지방식이 대조군보다 체중, 식이효율 및 내장 지방을 유의하게 감소시킴으로써, 비만을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가짐이 확인되었다.

[46] 본 발명에서 사용하는 용어“간” 및 “내장”은 각각 세포 또는 조직을 포함한다.

[47] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 혈장 지질농도를 감소시킨다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 혈장 지질은 중성지방, 총콜레스테롤 및 유리지방산으로 구성되는 군으로부터 선택되는 혈장지질이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 혈장 지질농도를 10%, 20% 또는 30% 이상 감소시킨다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 내장 지방을 10-60%, 20-60%, 30-60%, 10-50%, 20-50%, 30-50%, 10-40%, 20-40%, 30-40%, 10-30%, 20-30% 또는 10-20% 감소시킨다. 하기 실시예에서 입증한 바와 같이 피노카베올을 보충 섭취시킨 군(PD)에서 고지방식이대조군(HFD)에 비해 중성지방농도 27%, 총콜레스테롤농도 16%, 그리고 유리지방산농도 39%가 각각 유의하게 감소함을 확인하였다(도 3a-3d).

[48] 따라서 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물은 고지방식이 대조군보다 혈장 지질농도를 유의하게 감소시킴으로써, 이상지질혈증, 보다 구체적으로 고지혈증을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가짐이 확인되었다.

[49] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 간무게 또는 간조직 내 지질농도를 감소시킨다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 간무게 또는 간조직 내 지질농도를 10%, 20%, 30%, 40%, 50% 또는 60% 이상 감소시킨다. 본 발명의 어떠한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 간무게 또는 간조직 내 지질농도를 10-80%, 20-80%, 30-80%, 40-80%, 50-80%, 60-80%, 10-70%, 20-70%, 30-70%, 40-70%, 50-70%, 60-70%, 10-60%, 20-60%, 30-60%, 10-50%, 20-50%, 30-50%, 10-40%, 20-40% 또는 30-40% 감소시킨다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 간조직 내 지질은 중성지방, 콜레스테롤 및 유리지방산으로 구성된 군으로부터 선택되는 지질이다. 하기 실시예에서 입증한 바와 같이 피노카베올을 보충 섭취시킨 군(PD)에서 고지방식이대조군(HFD)에 비해 간무게가 30%, 간조직의 중성지방 농도가 33%, 간조직의 콜레스테롤 농도가 31%, 그리고 간조직의 유리지방산 농도가 65% 유의하게 감소함을 확인하였다(도 4a-4e).

[50] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 혈액 내 ALT(alanine aminotransferase) 또는 AST(aspartate aminotransferase)의 활성을 감소시킨다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 ALT를 10%, 20%, 30% 또는 40% 이상 감소시킨다. 본 발명의 어떠한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 ALT를 10-70%, 20-70%, 30-70%, 40-70%, 10-60%, 20-60%, 30-60%, 40-60%, 10-50%, 20-50%, 30-50% 또는 40-50% 감소시킨다. 본 발명의 다른 구현예에

따르면, 본 발명의 조성물은 AST를 10%, 20% 또는 30% 이상 감소시킨다. 본 발명의 어떠한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 AST를 10-60%, 20-60%, 30-60%, 10-50%, 20-50%, 30-50%, 10-40%, 20-40% 또는 30-40% 감소시킨다. 하기 실시예에서 입증한 바와 같이 피노카베올을 보충 섭취시킨 군(PD)에서 고지방식이대조군(HFD)에 비해 ALT 52%, AST 34%가 각각 유의하게 감소함을 확인하였다(도 4f 및 4g).

- [51] 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물은 고지방식이 대조군보다 간무게, 간조직 내 지질농도, 혈액 내 ALT 및 AST의 양을 유의하게 감소시킴으로써, 지방간, 보다 구체적으로는 비알코올성 지방간을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가짐이 확인되었다.
- [52] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 공복 혈당 농도 또는 공복 혈중 인슐린 농도를 감소시킨다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 공복 혈당 농도 또는 공복 혈중 인슐린 농도를 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이상 감소시킨다. 본 발명의 어떠한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 공복 혈당 농도 또는 공복 혈중 인슐린 농도를 10-70%, 20-70%, 30-70%, 40-70%, 50-70%, 10-60%, 20-60%, 30-60%, 40-60%, 50-60%, 10-50%, 20-50%, 10-40%, 20-40%, 10-30% 또는 20-30% 감소시킨다. 하기 실시예에서 입증한 바와 같이 피노카베올을 보충 섭취시킨 군(PD)에서 고지방식이대조군(HFD)에 비해 공복 혈당 농도가 21%, 공복 혈중 인슐린 농도가 50% 유의하게 감소함을 확인하였다(도 5a-5d).
- [53] 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물은 고지방식이 대조군보다 공복 혈당 농도 또는 공복 혈중 인슐린 농도를 유의하게 감소시킴으로써, 당뇨, 보다 구체적으로는 제2형 당뇨를 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가짐이 확인되었다.
- [54] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 혈중 염증성 사이토카인 농도를 감소시킨다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 혈중 염증성 사이토카인 농도를 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% 또는 70% 이상 감소시킨다. 본 발명의 어떠한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 혈중 염증성 사이토카인 농도를 10-90%, 20-90%, 30-90%, 40-90%, 50-90%, 60-90%, 70-90%, 10-80%, 20-80%, 30-80%, 40-80%, 50-80%, 60-80%, 70-80%, 10-60%, 20-60%, 30-60%, 40-60%, 10-50%, 20-50%, 30-50%, 40-50%, 10-40%, 20-40%, 30-40%, 10-30% 또는 20-30% 감소시킨다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 혈중 염증성 사이토카인은 IL-6, TNF α , MCP1 및 렙틴으로 구성된 군으로부터 선택되는 사이토카인이다. 하기 실시예에서 입증한 바와 같이 피노카베올을 보충 섭취시킨 군(PD)에서 고지방식이대조군(HFD)에 비해 IL-6는 70%, TNF α 는 28%, MCP1는 35%, 렙틴은 40% 감소하여 모두 유의하게 감소함을 확인하였다(도 6). 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물은 고지방식이 대조군보다 혈중 염증성 사이토카인 농도를 유의하게 감소시킴으로써, 비만으로 인해

- 유도된 염증 활성화를 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가짐이 확인되었다.
- [55] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 내장지방 또는 간의 UCP1(uncoupling protein 1), UCP3(uncoupling protein 3), PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha) 또는 β -카테닌 발현, 또는 AMPK(AMP-activated protein kinase) 활성화를 증가시키거나, 또는 C/EBP α (CCAAT enhancer-binding protein), PPAR γ (Peroxisome proliferator activated receptor gamma), CD36(Cluster of Differentiation 36), FAS(Fatty acid synthase), 렙틴, SREBP1C(Sterol regulatory element binding factor 1c), LXR α (Liver X receptor alpha), LPL(Lipoprotein Lipase) 또는 ACC(Acetyl-CoA carboxylase)의 발현을 감소시킨다. 하기 실시예에서 입증한 바와 같이 HFD군의 경우 정상식이군에 비해 열발생 관련 유전자(즉, UCP1, UCP3 및 PGC-1 α)들의 발현이 모두 유의하게 감소하였으나, PD는 고지방식이 섭취에 의해 감소하였던 상기 유전자 발현을 모두 유의하게 다시 증가시켰다(도 7a). 또한, HFD군의 경우 정상식이군에 비해 지방조직생성(adipogenesis)에 관여하는 C/EBP α , PPAR γ 2, CD36, FAS 및 렙틴의 발현이 모두 유의하게 증가하였으나, PD는 고지방식이 섭취에 의해 감소하였던 상기 유전자 발현을 모두 유의하게 다시 감소시켰다(도 7b). 더불어, 지방생성을 조절하는 상위 신호전달물질인 β -카테닌 단백질 발현량도 PD군에서 HFD군에 비해 유의하게 증가하였다(도 7c). 또한, HFD군의 경우 정상식이군에 비해 지방생성(lipogenesis)에 중요한 SREBP, LXR α , LPL, FAS 및 ACC 발현이 모두 유의하게 증가하였으나, PD군은 이들의 발현이 모두 다시 유의하게 감소하였고(도 8a), PD군은 지방산 산화를 촉진하는 신호전달물질인 AMPK 활성화(p-AMPK/AMPK 비율)이 유의하게 증가하였다(도 8b). 따라서 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물은 내장지방조직에서 지방생성에 중추적 역할을 하는 핵전사인자 및 이의 타겟 유전자발현을 감소시키고, β -카테닌 단백질발현을 증가시킴으로써 내장지방 축적을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가지며, 간조직에서 지방합성에 중추적 역할을 하는 핵전사인자 및 이의 타겟 유전자발현을 감소시키고, 지방산 산화를 촉진하는 신호전달물질의 활성화를 증가시킴으로써 비만으로 인해 유도된 지방간을 예방, 개선 또는 치료하는 효과가 있음을 확인하였다.
- [56] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제,

현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences*(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

- [57] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 구체적으로는, 본 발명의 약제학적 조성물은 경구투여될 수 있다.
- [58] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 예컨대 0.0001-1000 mg/kg이다.
- [59] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성매질 중의용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [60] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 피노카베올을 유효성분으로 포함하는 비만, 당뇨, 이상지질혈증, 지방간 및 인슐린 저항성 증후군으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환의 예방 또는 개선용 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [61] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 피노카베올을 유효성분으로 포함하는 비만, 당뇨, 이상지질혈증, 지방간 및 인슐린 저항성 증후군으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [62] 본 발명의 기능성 식품 또는 식품 조성물은 상술한 약제학적 조성물과 유효성분(즉, 피노카베올)을 공통으로 하기 때문에, 상기 약제학적 조성물과의 관계에서 공통된 내용은 본 발명의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재 생략한다.
- [63] 본 발명의 조성물이 기능성 식품 조성물 또는 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로서 본 발명의 피노카베올 뿐만 아니라, 기능성 식품 또는 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등); 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로오스 등); 올리고당; 폴리사카라이드(예컨대, 덱스트린, 시클로덱스트린 등); 및 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리쓰리톨 등)을 포함한다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어

레바우디오시드 A, 글리시르히진 등]) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.

[64] 예컨대, 본 발명의 기능성 식품 조성물 또는 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 유효성분인 피페로날 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[65]

[66] 본 발명의 조성물은 상술한 피노카베올을 주요 성분으로 포함하는 식물을 유효성분을 공통으로 하기 때문에, 상기 피노카베올을 유효성분으로 포함하는 조성물과의 관계에서 공통된 내용은 본 발명의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[67]

[68] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 피노카베올을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상(subject)에 투여하는 단계를 포함하는 비만, 당뇨, 이상지질혈증, 지방간 및 인슐린 저항성 증후군으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[69] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 이상지질혈증은 고지혈증이다.

[70] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 지방간은 비알콜성 지방간이다.

[71] 본 발명의 대사질환의 예방 또는 치료 방법은 본 발명의 다른 일 양태인 대사질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 이용하는 방법에 관한 것인 바, 중복되는 내용의 기재는 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 생략하도록 한다.

[72]

발명의 효과

[73] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[74] (a) 본 발명은 피노카베올을 유효성분으로 포함하는 대사질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 이를 이용한 대사질환의 예방 또는 개선용 기능성 식품 조성물을 제공한다.

[75] (b) 본 발명의 피노카베올은 체중 및 내장지방을 감소시키고, 혈중 지질농도를 감소시키며, 혈중 간기능지표를 개선시키고, 혈당을 감소시킬 뿐 아니라 대사성염증반응을 억제함으로써 궁극적으로 비만, 당뇨, 이상지질혈증, 지방간 및 인슐린 저항성 증후군으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환의 예방 또는 치료 활성을 나타내는 의약 또는 기능성 식품 조성물로서 유용하게 이용될 수 있다.

[76]

도면의 간단한 설명

[77] 도 1은 실험식이를 섭취한 마우스의 체중 증가량(도 1a) 및 식이 섭취량(도

- 1b)을 나타낸다. 각 값은 8마리 마우스 측정값의 평균±표준오차(SEM)이다. 그래프 막대 위의 문자는 일원분산분석(one-way ANOVA) 및 Duncan 다중범위검정에 의한 $P<0.001$ 에서의 유의적 차이를 나타낸다.
- [78] 도 2는 실험식이를 섭취한 마우스의 내장지방조직 사진(도 2a) 및 부위 별 내장지방 무게(도 2b)를 나타낸다. 각 값은 8마리 마우스 측정값의 평균±표준오차이다. 그래프 막대 위의 문자는 일원분산분석(one-way ANOVA) 및 Duncan 다중범위검정에 의한 $P<0.001$ 에서의 유의적 차이를 나타낸다.
- [79] 도 3은 실험식이를 섭취한 마우스의 혈중 지질농도[도 3a: 중성지방(mmol/L), 도 3b: 총 콜레스테롤(mmol/L), 도 3c: HDL-콜레스테롤(mmol/L) 및 도 3d: 유리지방산(μ Eq/L)]를 나타낸다. 각 값은 8마리 마우스 측정값의 평균±표준오차이다. 같은 열 내의 문자는 일원분산분석 및 Duncan 다중범위검정에 의한 $P<0.05$ 에서의 유의적 차이를 나타낸다.
- [80] 도 4는 실험식이를 섭취한 마우스의 비알콜성 지방간 관련 지표[도 4a: 간조직 사진, 도 4b: 간 무게(g), 도 4c: 중성지방(μ mol/g), 도 4d: 콜레스테롤(μ mol/g), 도 4e: 유리지방산(μ Eq/g), 도 4f: 알라닌 아미노기전달효소(IU/L) 및 도 4g: 아스파르트산 아미노기전달효소(IU/L)]를 나타낸다. 각 값은 8마리 마우스 측정값의 평균±표준오차이다. 같은 열 내의 문자는 일원분산분석 및 Duncan 다중범위검정에 의한 $P<0.05$ 에서의 유의적 차이를 나타낸다.
- [81] 도 5는 실험식이를 섭취한 마우스의 인슐린 저항성 관련 지표[도 5a: 경구 포도당 부하검사, 도 5b: AUC, 도 5c: 공복 시 혈당(mmol/L) 및 도 5d: 공복 시 인슐린(pg/mL)]를 나타낸다. 같은 열 내의 문자는 일원분산분석 및 Duncan 다중범위검정에 의한 $P<0.05$ 에서의 유의적 차이를 나타낸다.
- [82] 도 6은 실험식이를 섭취시킨 마우스의 혈중 염증성 사이토카인[도 6a: IL-6(pg/ml), 도 6b: TNF α (pg/ml), 도 6c: MCP1(pg/ml) 및 도 6d: 렙틴(pg/ml)] 농도를 나타낸다. 각 값은 8마리 마우스 측정값의 평균±표준오차이다. 같은 열 내의 문자는 일원분산분석 및 Duncan 다중범위검정에 의한 $P<0.05$ 에서의 유의적 차이를 나타낸다.
- [83] 도 7은 마우스 내장지방조직의 열생성(thermogenesis)(도 7a) 및 지방조직생성(adipogenesis)(도 7b) 관련 유전자 및 단백질 발현변화를 나타낸다. 상부 패널은 RT-PCR 분석의 대표적인 젤 사진이고, 하부 패널은 이들 유전자의 상대적 발현량을 나타낸다. 데이터는 GAPDH mRNA 수준을 기준으로 표준화되었고, 모든 발현 수준은 정상식이 마우스에 대한 상대적인 값으로 표시하였다. 도 7c의 상부 패널은 웨스턴 블롯 분석의 대표적인 젤 사진이고, 하부 패널은 이들 단백질의 상대적인 발현량을 나타낸다. 데이터는 GAPDH 수준을 기준으로 표준화되었고, 모든 발현 수준은 정상식이 마우스에 대한 상대적인 값으로 표시하였다. 상기 결과는 8마리 마우스의 RNA 시료 풀(pool)을 이용한 세 번의 독립적인 실험에 대한 결과를 나타낸다. 그래프 막대 위의 문자는 일원분산분석 및 Duncan 다중범위검정에 의한 $P<0.05$ 에서의 다른

식이그룹과의 유의적 차이를 나타낸다.

- [84] 도 8은 마우스 간조직의 지방생성(lipogenesis) 관련 유전자 및 단백질의 발현 변화를 보여주는 그림이다. 도 8a의 상부 패널은 RT-PCR 분석의 대표적인 젤 사진이고, 하부 패널은 이들 유전자의 상대적 발현량을 나타낸다. 데이터는 GAPDH mRNA 수준을 기준으로 표준화되었으며 모든 발현 수준은 정상식이 마우스에 대한 상대적인 값이다. 도 8b의 상부 패널은 p-AMPK 및 AMPK의 웨스턴 블롯 분석의 대표적인 젤 사진이고, 하부 패널은 간조직의 p-AMPK/AMPK 단백질 발현의 상대적 비율을 나타낸다. 데이터는 GAPDH 수준을 기준으로 표준화되었으며 모든 발현 수준은 정상식이 마우스에 대한 상대적인 값이다. 상기 결과는 8마리 마우스의 RNA 시료 풀을 이용한 세 번의 독립적인 실험에 대한 결과를 나타낸다. 그래프 막대 위의 문자는 일원분산분석 및 Duncan 다중범위검정에 의한 $P < 0.05$ 에서의 다른 식이그룹과의 유의적 차이를 나타낸다.

[85]

발명의 실시를 위한 형태

- [86] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[87]

[88] 실시예

- [89] 실시예 1: 식이성 비만 마우스에서 피노카베올의 체중 및 내장지방 감소효능1) 실험식이 제조 및 실험동물의 사육

- [90] 본 발명에서 사용한 비만유도식은 고지방대조식이(HFD: high fat diet, 40% 지방 열량, 17 g 라드 + 3% 콘 오일/ 100 g 식이)이며, 피노카베올(80613, 씨그마-알드리치 사, CAS Number: 547-61-5, (1S,3R,5S)-6,6-디메틸-2-메틸렌바이사이클로[3,1,1]헵탄-3-올)이 보충된 식이(PD: pinocarveol-supplemented high fat diet)는 HFD와 조성이 동일하되 피노카베올이 0.2% 수준으로 포함되었다. 대조약물로 비만치료제인 메트포르민(Met: metformin) 또는 시부트라민(Sibu: sibutramin)을 0.01% 수준으로 HFD에 첨가하여 사용하였다(표 1). 정상식이군(Chow)은 상업적인 설치류 먹이(rodent chow)를 섭취시켰다. 피노카베올, 메트포르민과 시부트라민은 모두 씨그마-알드리치 사(미국)에서 구입하였다.

[91] [표1]

실험식이 조성표 (g/kg 식이)

성분	고지방대조 식이(HFD)	펠러톤 보충식이(FD)	메트포르민 보충식이(Met)	시부트라민 보충식이(Sibu)
카제인	200	200	200	200
DL-메티오닌	3	3	3	3
옥수수 전분	111	109	110	110.9
수크로오스	370	370	370	370
셀룰로오스	50	50	50	50
옥수수유	30	30	30	30
라아드	170	170	170	170
비타민 복합물	12	12	12	12
미네랄 복합물	42	42	42	42
폴린 비타르트레이트	2	2	2	2
콜레스테롤	10	10	10	10
tert-부티하이드로퀴논	0.04	0.04	0.04	0.04
실험물질	-	2	1	0.1
총합(g)	1,000	1,000	1,000	1,000
지방(% 칼로리)	39.0	39.0	39.0	39.0
총 열량, kJ/kg diet	19,315	19,315	19,315	19,315

[92]

[93] 5주령의 수컷 C57BL/6J 마우스(오리엔트, 대한민국)를 고형사료로 1주일 간 실험실환경에 적응시킨 후, 난피법에 따라 고지방식이대조군과 실험군으로 임의 배치하여, 총 10주 간 사육하였다. 식이는 매일 오전 10-11시 사이에 물과 함께 공급하였으며, 식이 섭취량은 매일, 그리고 체중은 매주 측정하였다. 사료섭취에 따른 갑작스런 체중변화를 막기 위해 사료 통을 제거하고 2시간 후에 체중을 측정하였다. 실험동물을 12시간 이상 금식시킨 후, 디에틸에테르로 마취한 상태에서 혈액, 간 및 내장지방조직(부고환지방, 신장주변지방, 장간막지방 및 후복강지방)을 채취하여 0.1 M 인산완충용액(pH 7.4)으로 세척한 후, 무게를 측정하였다. 복부대동맥으로부터 채혈한 혈액은 1,000xg에서 15분 간 원심 분리하여 혈장을 분리하였다.

[94]

[95] 2) 체중 및 내장지방 무게 변화

[96] 실험식이를 10주 간 섭취시킨 후 최종 체중 및 10주 간의 체중증가량을 살펴보면, 고지방식이대조군(HFD)에 비해 피노카베올을 보충 섭취시킨 군(PD)에서 누적체중증가량이 32% 유의하게 감소하였다(도 1a 및 1b). 피노카베올 섭취는 일일 식이섭취량에 유의한 변화를 초래하지 않았고, 따라서 실험사육기간 동안의 누적체중증가량을 총 식이섭취량으로 나눈 식이효율(food efficiency ratio) 또한 PD군에서 HFD군에 비해 32% 유의하게 감소하였다(도 1c

및 1d). 결과적으로 피노카베올의 체중감소 효능은 식욕억제에 기인한 것은 아님을 알 수 있다.

- [97] 실험식이를 10주 간 섭취시킨 후 내장지방을 구성하는 부고환지방, 신장주변지방, 장간막지방 및 후복강지방을 각각 적출하여 무게를 측정한 결과, 대조군(HFD)에 비해 피노카베올을 보충 섭취시킨 군(PD)에서 부고환지방, 신장주변지방, 장간막지방, 후복강지방무게가 유의하게 감소하였고, 이 네가지 부위를 합한 총 내장지방무게가 32% 유의하게 감소하였다(도 2). 따라서 피노카베올은 상용화된 비만치료제(시부트라민)과 당뇨치료제(메트포민)에 버금가는 매우 탁월한 체중 및 내장지방량 감소효과가 있음이 확인되었다.

[98]

- [99] 실시예 2: 식이성비만 마우스에서 피노카베올의 고지혈증 예방 및 치료 효능

- [100] 1) 혈액의 생화학분석 방법

- [101] 10주 간 사육된 실험동물의 혈장 콜레스테롤, 중성지방 및 유리지방산 농도를 평가하기 위하여 상업용 측정키트 (Bio Clinical System, 대한민국)를 이용하여 각각 2회 반복 측정하였다.

[102]

- [103] 2) 혈장 지질농도의 변화

- [104] 실험식이를 10주 간 섭취시킨 마우스의 혈장 지질농도를 살펴보면, PD군에서 HFD군에 비해 중성지방농도가 27%, 총콜레스테롤농도가 16%, 그리고 유리지방산농도가 39% 각각 유의하게 감소하였다. 한편 혈중 HDL-콜레스테롤 농도는 실험군 간에 유의한 차이가 없었다(도 3). 따라서 피노카베올은 고지방식으로 유도된 비만에서 나타나는 고지혈증을 현저히 완화시키는 효과가 있음을 알 수 있으며, 이러한 고지혈증 개선효과는 사용된 대조약물(시부트라민, 메트포민)과 유사하거나 더 우수함을 알 수 있다.

[105]

- [106] 실시예 3: 식이성비만 마우스에서 피노카베올의 비알콜성 지방간 예방 및 치료 효능

- [107] 1) 간조직의 지질농도 분석방법

- [108] 간조직의 지질성분을 Folch 등의 방법(Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957;226:497-509)에 준하여 다음과 같이 추출하였다. 간조직(0.25 g)에 1 mL의 증류수를 가한 후 폴리트론 균질기(IKA-WERKE GmbH & Co., Ultra-Turrax, Staufen, Germany)를 사용하여 균질화시켰다. 균질액에 클로로포름:메탄올 용액(2:1, v/v) 5 mL을 가하여 잘 혼합한 후, 1000xg에서 10분 간 원심 분리하여 하층액을 분리하였고, 상층액에 다시 클로로포름:메탄올 용액(2: 1, v/v) 2 mL을 첨가한 후, 동일 과정을 반복하여 간의 지질성분을 완전히 분리하였다. 이렇게 얻은 하층액에 클로로포름:메탄올:0.05% CaCl₂(3:48:47, v/v/v) 용액 3 mL을 가하여 1분 간 혼합한 후 1000xg에서 10분 간 원심

분리하였고, 최종 하층액을 취하여 질소가스로 완전히 건조시킨 후, 건조된 지질을 1 mL의 메탄올에 용해하여 지질성분 분석에 사용하였다.

- [109] 간조직 지질추출액의 중성지방, 콜레스테롤 및 유리지방산 농도는 혈장의 지질농도 분석을 위해 사용된 것과 동일한 상업용 지질분석 키트(Bio Clinical System, 대한민국)를 사용하여 측정하였다.

[110]

[111] **2) 간조직의 지질농도 및 간기능수치의 변화**

- [112] 실험식이를 10주 간 섭취시킨 마우스의 간무게를 살펴보면, PD군에서 HFD군에 비해 절대 간무게(g)가 30% 유의하게 감소하였다(도 4a 및 4b).

- [113] 간조직의 지질 농도를 살펴보면, PD군에서 HFD군에 비해 중성지방 농도가 33%, 콜레스테롤 농도가 31%, 그리고 유리지방산 농도가 65% 유의하게 감소하였다(도 4c-4d). 또한, 혈장에서 측정된 간기능 수치인 알라닌 아미노기전달효소(ALT: alanine aminotransferase) 및 아스파르트산 아미노기전달효소(AST: aspartate aminotransferase) 활성이 PD군에서 HFD군에 비해 각각 44% 및 32% 유의하게 감소하였다(도 4f 및 4g). 따라서 피노카베올은 고지방식으로 유도된 비만에서 나타나는 지방간 현상을 현저히 완화시키는 효과가 있고, 이러한 피노카베올의 지방간 개선효능은 대조약물의 효과와 비슷하거나 더 우수함을 알 수 있다.

[114]

- [115] **실시예 4: 식이성비만 마우스에서 피노카베올의 제2형 당뇨 및 인슐린저항성 증후군 예방 및 치료 효능**

[116] **1) 경구포도당 부하검사, 공복 시 혈당 및 인슐린 농도 측정방법**

- [117] 실험사육 8주 째에 실험동물을 16시간 공복시킨 후 2 g/kg 체중에 해당하는 d-글루코오스를 경구투여 하고, 15분, 30분, 60분 및 120분이 경과한 시점에 마우스의 꼬리정맥을 통해 혈액을 채취하였다. 채혈된 혈액의 글루코오스 농도는 스트립-작동 혈액 글루코오스 센서(ONETOUCH Ultra, Inverness Medical Ltd., 영국) 기기를 이용하여 측정하였다.

- [118] 한편, 10주 간 사육한 마우스로부터 채취한 공복 시 혈장의 글루코오스 농도는 생화학자동분석기(Express Plus, Chiron Diagnostics Co., 미국)를 이용하여 측정하였으며, 분석용 키트 시약은 Bio-Clinical System(대한민국)으로부터 구입하였다.

- [119] 공복 시 혈장의 인슐린 농도는 마우스 인슐린 ELISA 키트(Millipore corporation, 미국)를 사용하여 측정하였다.

[120]

[121] **2) 제2형 당뇨 및 인슐린저항성 증후군 관련 지표(경구 포도당 저항성)의 변화**

- [122] 실험 사육 8주 째(해부 2주 전)에 마우스를 대상으로 경구 포도당 부하검사를 실시한 결과, PD군에서 HFD군에 비해 당부하 후 시간대 별 혈중 포도당농도가 감소하였고, 포도당 농도 곡선 면적값(AUC: area under the curve)이 20%

유의하게 감소하였다(도 5a 및 5b). 한편, 실험사육 종료시에 채취한 공복시 혈액의 포도당 및 인슐린 농도는 PD군에서 HFD군에 비해 각각 21% 및 50% 유의하게 감소하였다(도 5c 및 5d).

[123]

[124] 실시예 5: 식이성비만 마우스에서 피노카베올의 염증활성화 개선효능

[125] 1) 혈중 염증성 사이토카인 농도 분석방법

[126] 혈장 IL-6, TNF α , MCP1 및 렙틴 농도는 Milliplex map 키트(Millipore corporation, 미국)를 사용하여 ELISA 방법으로 측정하였다.

[127]

[128] 2) 혈중 염증성 사이토카인 농도 변화

[129] 영양소 또는 대사물질 공급과잉에 의해 발생하는 염증반응에 대하여 최근 ‘metaflammation’이라는 용어가 등장하고, 비만을 ‘chronic and low-level inflammation’으로 해석하는 등, 비만과 면역체계와의 상관관계에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다. 그 예로, 고유 면역 반응(innate immune response)에 관여하는 TLR4(toll-like receptor4)의 경우 식이성지방(특히, 포화지방산)을 기질(ligand)로 사용하여 염증반응 및 인슐린저항성 경로에서 중요한 요소로 작용한다. 고지방식이에 의해 비만이 유도되면 체액에 유리지방산(특히, 포화지방산)이 증가하게 되고, TLR4에 유리지방산이 기질로 결합하면 IKK를 활성화시켜 NF- κ B를 활성화시키고, 전-염증성 사이토카인인 TNF α 및 IL-6 등의 분비를 촉진하여 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있다. 그 외에도 TNF α 및 IL-6는 SOCS3(cytokine signalling 3)과 JNK를 활성화시키므로서 IRS(insulin receptor substrate)의 세린 잔기를 인산화하여 당수송을 저해하고, 간 또는 근육 등의 말초조직에서 인슐린저항성을 유도하는 것으로 알려져 있다.

[130] 혈중에서 염증성 사이토카인 농도를 ELISA 방법에 의해 측정한 결과, PD군에서 HFD군에 비해 IL-6(70% 감소), TNF α (28% 감소), MCP1(35% 감소) 및 렙틴(40% 감소) 농도가 모두 유의하게 감소하였다(도 6). 따라서 피노카베올 섭취는 비만으로 인해 유도된 염증 활성화를 현저히 개선하는 효과가 있음을 알 수 있다.

[131]

[132] 실시예 6: 피노카베올에 의한 지방축적 및 열발생 관련 유전자 및 단백질 발현조절

[133] 1) RNA 분리 및 RT-PCR

[134] 내장지방조직 및 간조직 0.1g당 트리졸 용액 1 ml을 첨가하여 조직을 분쇄한 후, 4°C, 12,000xg에서 10분 간 원심 분리하였다. 상층액을 새 튜브로 옮긴 후 클로로포름 200 μ l을 첨가하고, 교반하였다. 이 과정을 두 번 반복한 다음, 상층액을 새 튜브로 옮긴 후 이소프로파놀과 상층액을 1:1 비율로 첨가하였다. 10회 세게 흔든 다음 실온에서 10분 동안 방치한 후, 12,000xg, 4°C에서 10분 간 원심 분리하여 상층액을 제거하고, 남은 침전물에 70% 에탄올 1 ml을 가하여

7,500×g, 4°C에서 5분 동안 원심 분리하였다. 에탄올을 제거한 후 RNA 침전물이 담긴 튜브를 실온에서 5분 동안 건조시키고, 핵산 가수분해가 없는 물(nuclease free water)을 사용하여 RNA 펠렛을 용해시켰다. UV/VIS 분광광도계(Beckman coulter, DU730, 미국)를 이용하여 260 nm 및 280 nm 파장에서 추출된 RNA 시료의 농도를 측정하고, 아가로스 젤 전기영동을 실시하여 RNA 시료의 품질(integrity)을 확인하였다.

- [135] 내장지방조직 및 간조직에서 추출된 RNA시료를 대상으로 올리고 dT 프라이머와 superscript 역전사효소(GIBCO BRL, 미국)을 이용하여 역전사를 수행함으로써 cDNA를 합성하였다. 역전사를 통해 얻은 cDNA를 주형으로 하고 증폭하고자 하는 유전자 cDNA의 5'과 3' 인접서열(flanking sequence)을 프라이머로 사용하여 PCR을 수행하였으며, 이때 사용된 프라이머 서열은 표 2에 제시된 바와 같다. 증폭된 PCR 산물 1 μ l를 1% 아가로스 젤에 전기 영동하여 DNA 밴드를 확인하였다.

[136] [표2]

반-정량적 RT-PCR 분석에 사용한 프라이머 서열

유전자	프라이머	서열(5' → 3')	어닐링 온도(℃)	PCR 산물(bp)
Peroxisome proliferator activated receptor gamma 2 (PPAR γ 2)	F	TTCGGAATCAGCTCTGTGGA	55	148
	R	CCATTGGGTGAGCTCTGTG		
CCAAT/enhancer binding protein alpha(C/EBP α)	F	TCGGTGGTCTAAGATGAGG	55	187
	R	TCAAGGCACATTTTGTCTCC		
Cluster of differentiation 36 (CD36)	F	ATGACGTGGCAAAGAACAGC	55	160
	R	GAAGGCTCAAAGATGGCTCC		
Fatty acid synthase(FAS)	F	AGGGGTGACCTGGTCCTCA	65	132
	R	GCCATGCCAGAGGGTGGTT		
Lipoprotein lipase(렙틴)	F	CTCCAAGGTTGTCCAGGGTT	55	143
	R	AAACTCCCCACAGAATGGG		
Uncoupling protein 1(UCP1)	F	GGTTTGCAACCACACTCTG	70	108
	R	ACATGGACATCGCACAGTT		
Uncoupling protein 3(UCP3)	F	ATGCTGAAGATGGTGGCTCA	55	179
	R	TTGCCCTTGTCAAACCGAG		
Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha(PGC1- α)	F	TAAATCTGCGGGATGATGGA	67	109
	R	GTTTGGTTGCACTGCGTAA		
Sterol regulatory element binding factor 1c(SREBP1c)	F	TTGTGGAGCTCAAAGACCTG	55	94
	R	TGCAAGAAGCGGATGTAGTC		
Liver X receptor(LXR)	F	TCCTACAGAGGATCAAGCG	55	119
	R	AGTGCAATGCAAAGACCTG		
Lipoprotein lipase(LPL)	F	TGCCGTGTTTTGTTTTACC	55	172
	R	TCACAGTTTCTGCTCCAGC		
Acetyl-CoA carboxylase(ACC)	F	TGATGTCAATCTCCCGCAGC	60	353
	R	TTGCTTCTCTCTGTTTTCTCCC		
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)	F	AGAACATCATCCTGCATCC	55	321
	R	TCCACCACCTGTGCTGTA		

[137]

[138] 2) 웨스턴 블롯 분석

[139] 막자사발에 일정량의 내장지방 또는 간조직을 액체질소 및 라이시스 완충액과 함께 균질화시킨 후, 13,000×g, 4°C에서 20분 간 원심분리한 후 가운데 층을 취하고 Bradford 법에 의해 단백질을 정량하였다. 50 μ g의 단백질을 SDS 폴리아크릴아마이드 겔에 전기 영동시킨 후 PVDF 하이퍼 필름에 전기블롯팅하고 해당 항체, β -카데닌, 포스포-AMPK(AMP-활성 단백질 키나아제), AMPK, GAPDH (Cell-signaling Technology, 미국)와 각각 반응시켰다. 각 단백질의 신호를 화학발광 분석 시스템(chemiluminescent detection system, Amersham, 영국)으로 가시화한 후 밴드의 두께를 Quantity One 분석 소프트웨어(Bio-Rad Laboratories, 미국)를 사용하여 정량화하였다.

[140]

[141] **3) 내장지방조직의 유전자 및 단백질 발현 변화**

[142] RT-PCR을 이용하여 내장지방조직에서 열발생에 관여하는 유전자(UCP1, UCP3) 및 전사조절인자(PGC-1 α)의 발현을 측정한 결과, HFD군의 경우 정상식이군에 비해 이들 열발생 관련 유전자들의 발현이 모두 유의하게 감소하였다. 피노카베올의 보충섭취는 고지방식이 섭취에 의해 감소하였던 UCP1, UCP3 및 PGC-1 α 유전자 발현을 모두 유의하게 다시 증가시켰다(도 7a).

[143] 또한 HFD군의 경우 정상식이군에 비해 지방조직생성(adipogenesis)에 중요한 역할을 담당하는 핵전사인자인 C/EBP α 와 PPAR γ 2, 그리고 이들 전사인자의 타겟 유전자인 CD36, FAS, 렙틴의 발현이 모두 유의하게 증가하였다. 고지방식이를 섭취하는 마우스에게 피노카베올을 보충 섭취시킨 결과, 내장지방조직에서 고지방식이 섭취에 의해 증가하였던 핵전사인자 및 이의 타겟유전자 발현이 다시 모두 유의하게 감소하였다(도 7b). 웨스턴 블롯을 이용하여 지방생성을 조절하는 상위 신호전달물질인 β -카테닌 단백질 발현량을 내장지방조직에서 평가한 결과, PD군에서 HFD군에 비해 유의하게 증가하였다(도 7c). 따라서 피노카베올 보충섭취는 내장지방조직에서 지방생성에 중추적 역할을 하는 핵전사인자 및 이의 타겟 유전자발현을 감소시키고, β -카테닌 단백질 발현을 증가시킴으로써 내장지방 축적을 예방하였음을 알 수 있다.

[144]

[145] **4) 간조직의 유전자 및 단백질 발현 변화**

[146] RT-PCR을 이용하여 간조직의 mRNA 발현정도를 평가한 결과, HFD군의 경우 정상식이군에 비해 지방생성(lipogenesis)에 중요한 역할을 담당하는 핵전사인자인 SREBP와 LXR α , 그리고 이들 전사인자의 타겟 유전자인 LPL, FAS 및 ACC 발현이 모두 유의하게 증가하였다. 한편 피노카베올을 보충 섭취시킨 결과 고지방식이 섭취에 의해 간조직에서 증가하였던 핵 전사인자 및 이의 타겟 유전자 발현이 모두 다시 유의하게 감소하였다(도 8a). 웨스턴 블롯을 이용하여 지방산 산화를 촉진하는 신호전달물질인 AMPK 활성화(p-AMPK/AMPK 비율)를 간조직에서 평가한 결과, PD군에서 HFD군에 비해 유의하게 증가하였다(도 8b). 따라서 피노카베올 보충섭취는 간조직에서 지방합성에 중추적 역할을 하는 핵전사인자 및 이의 타겟 유전자발현을 감소시키고, 지방산 산화를 촉진하는 신호전달물질의 활성화를 증가시킴으로써 비만으로 인해 유도된 지방간을 개선하는 효과가 있음을 알 수 있다.

[147]

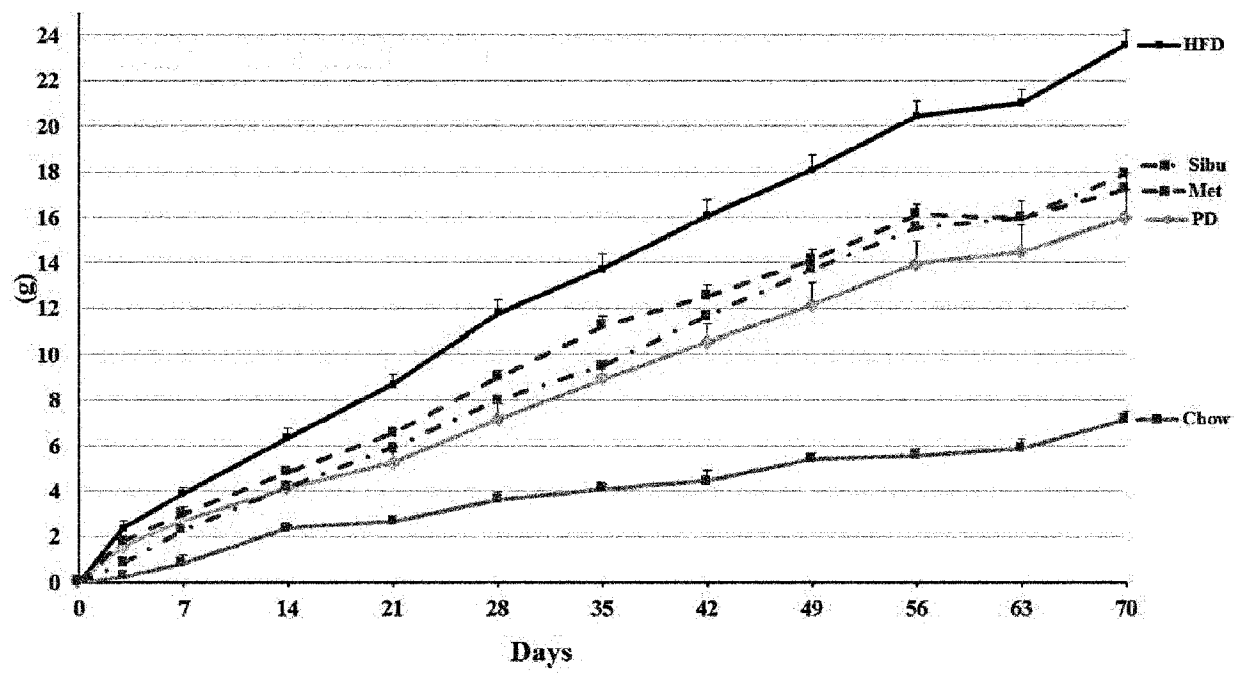
[148] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

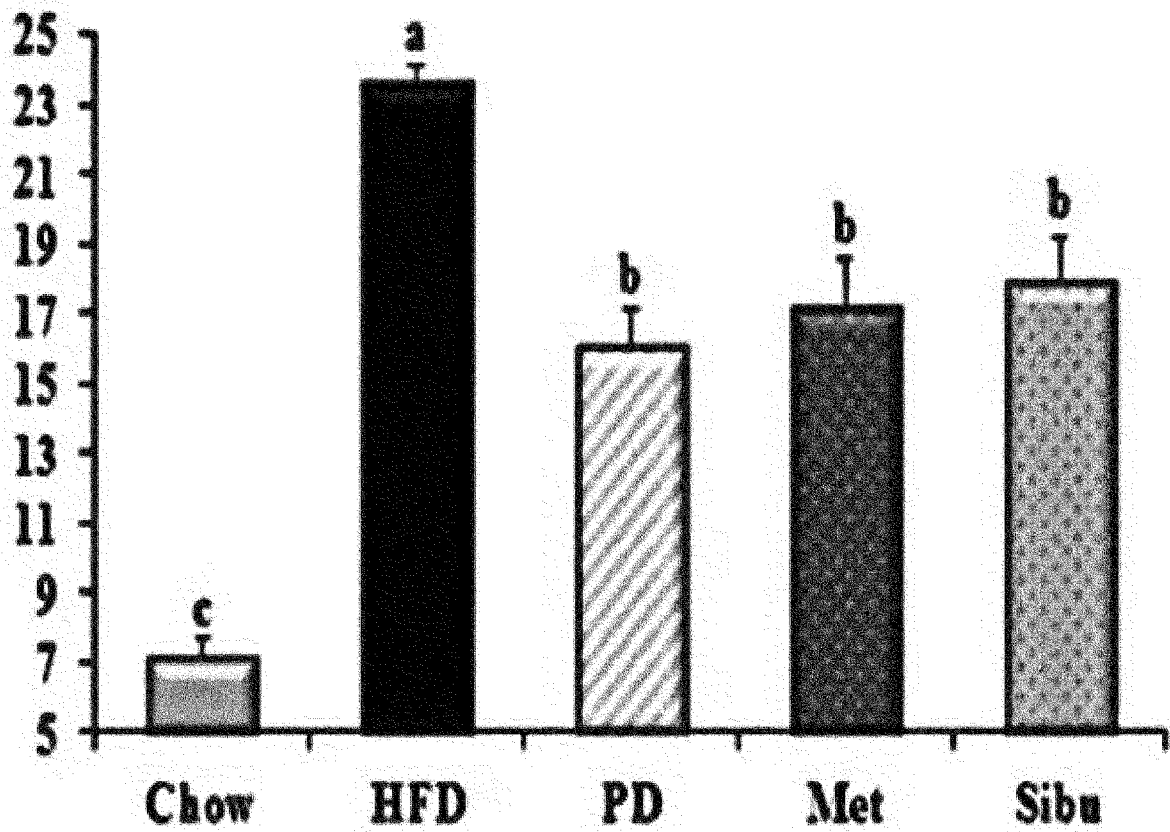
- [청구항 1] 피노카베올(pinocarveol)을 유효성분으로 포함하는 비만, 당뇨, 이상지질혈증(dyslipidemia), 지방간 및 인슐린 저항성 증후군(insulin resistance syndrome)으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환(metabolic disease)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 이상지질혈증은 고지혈증인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 지방간은 비알콜성 지방간인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 체중 또는 식이효율을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 내장 지방을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 혈장 지질농도를 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 7] 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 간무게 또는 간조직 내 지질농도를 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 8] 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 혈액 내 ALT(alanine aminotransferase) 또는 AST(aspartate aminotransferase)의 활성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 9] 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 공복 혈당 농도 또는 공복 혈중 인슐린 농도를 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 10] 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 혈중 염증성 사이토카인 농도를 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 11] 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 내장지방 또는 간의 UCP1(uncoupling protein 1), UCP3(uncoupling protein 3), PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha) 또는 β -카테닌 발현, 또는 AMPK(AMP-activated protein kinase) 활성화를 증가시키거나, 또는 C/EBP α (CCAAT enhancer-binding proteins), PPAR γ (Peroxisome proliferator activated receptor gamma), CD36(Cluster of Differentiation 36), FAS(Fatty acid synthase), 랩틴, SREBP1C(Sterol regulatory element binding factor 1c), LXR α (Liver X receptor alpha), LPL(Lipoprotein Lipase) 또는 ACC(Acetyl-CoA carboxylase)의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 12] 피노카베올을 유효성분으로 포함하는 비만, 당뇨, 이상지질혈증, 지방간 및 인슐린 저항성 증후군으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환의 예방 또는 개선용 기능성 식품 조성물.

- [청구항 13] 피노카베올을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상(subject)에 투여하는 단계를 포함하는 비만, 당뇨, 이상지질혈증, 지방간 및 인슐린 저항성 증후군으로 구성된 군으로부터 선택되는 대사질환의 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 14] 제 13 항에 있어서, 상기 이상지질혈증은 고지혈증인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 15] 제 13 항에 있어서, 상기 지방간은 비알콜성 지방간인 것을 특징으로 하는 방법.

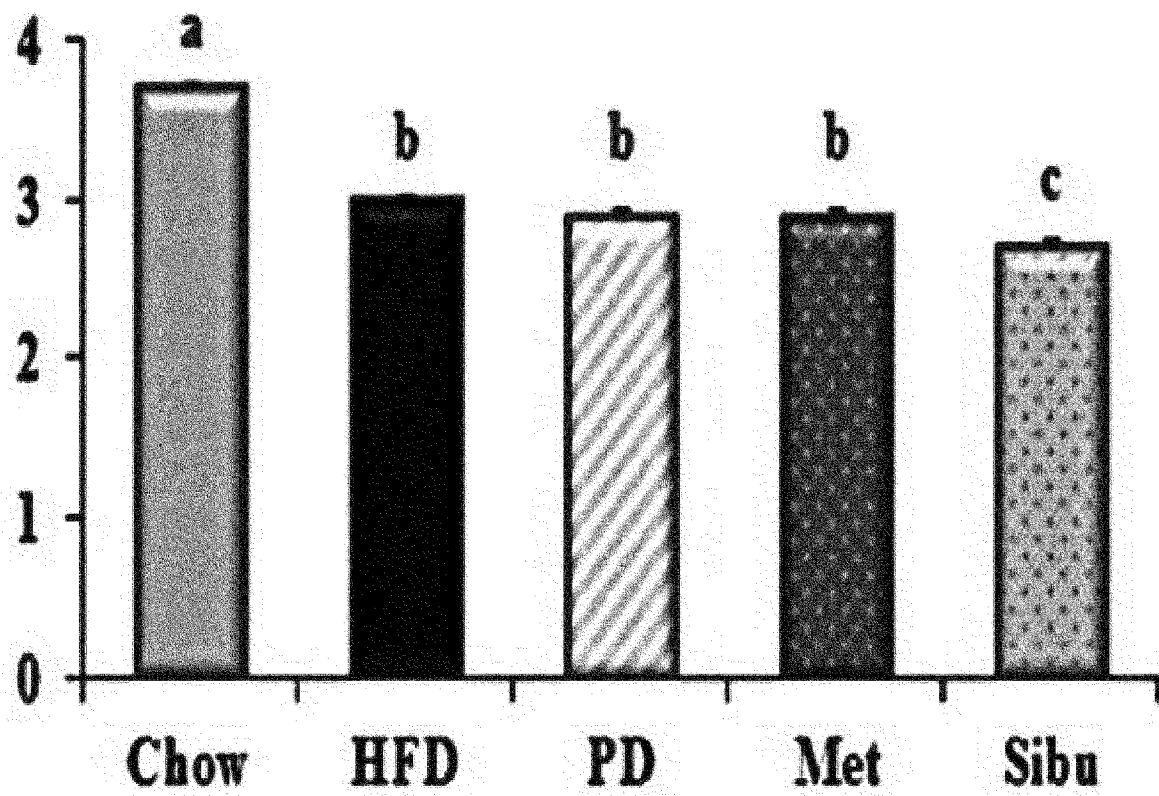
[도 1a]



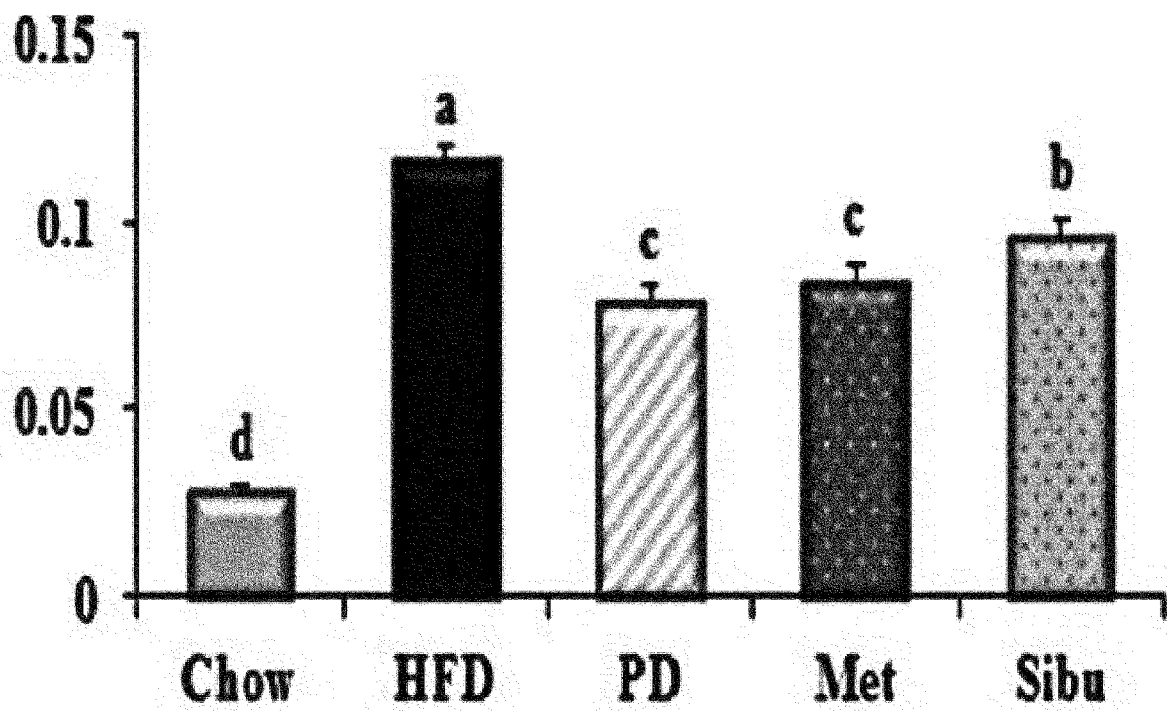
[도 1b]



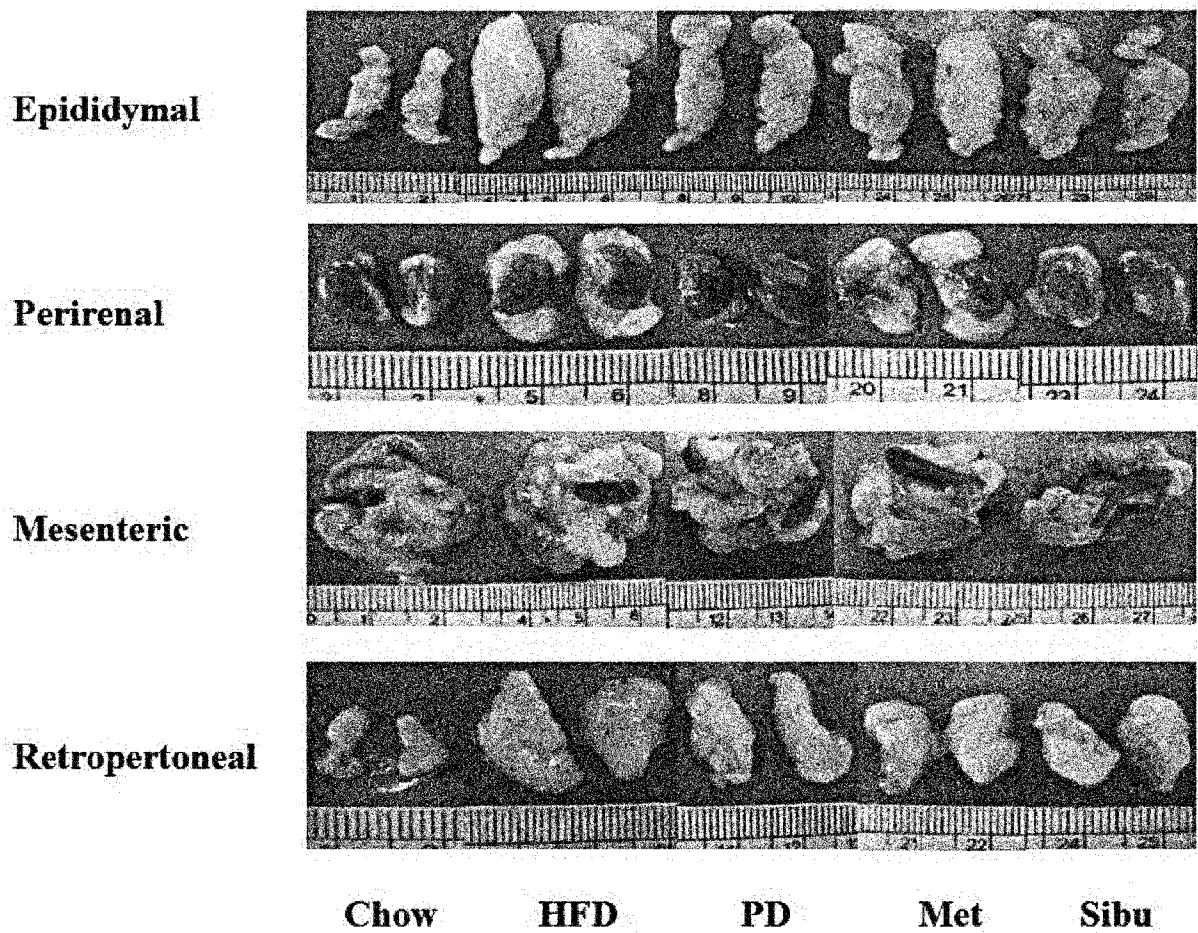
[도1c]



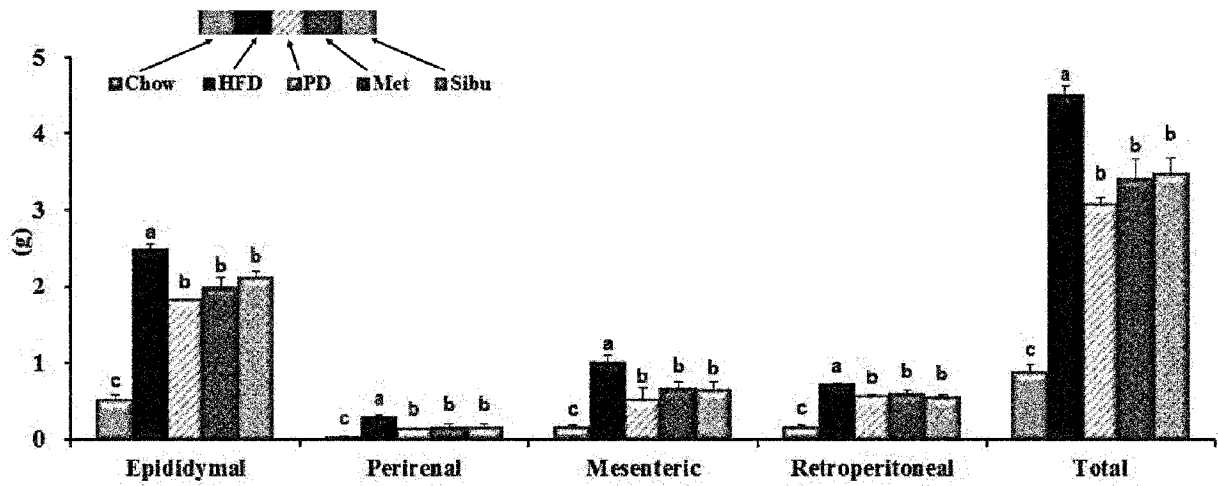
[도1d]



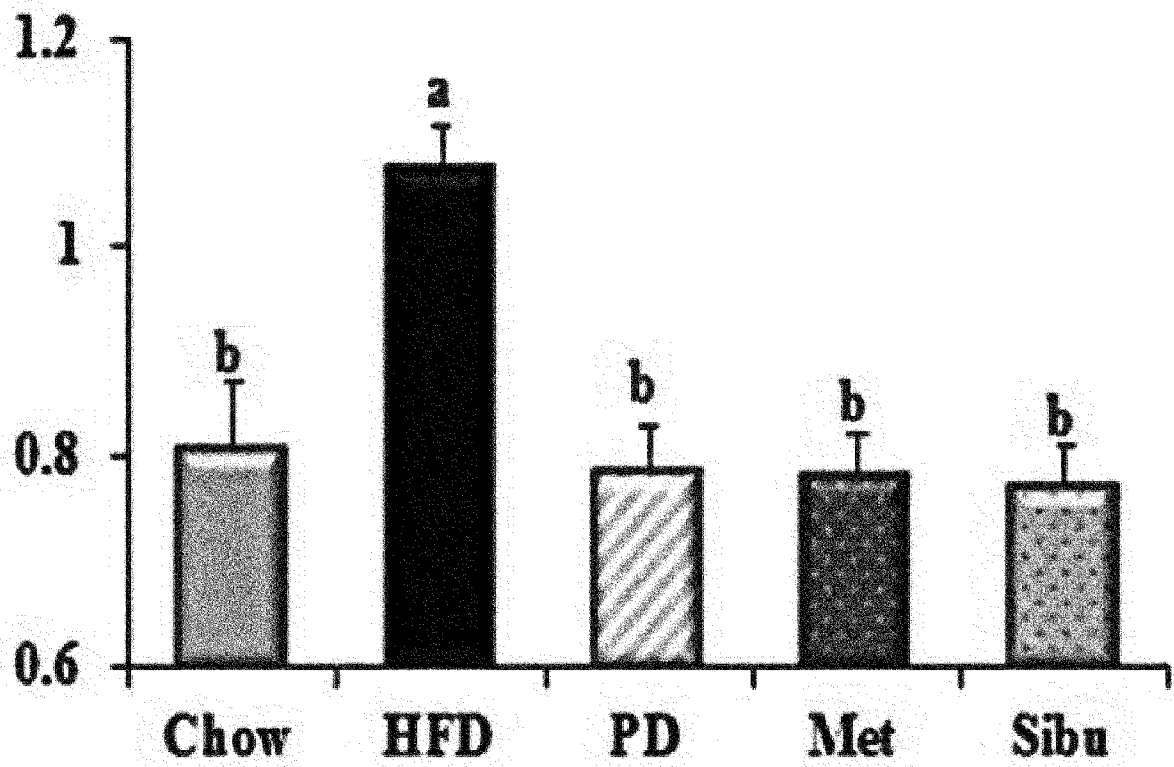
[도2a]



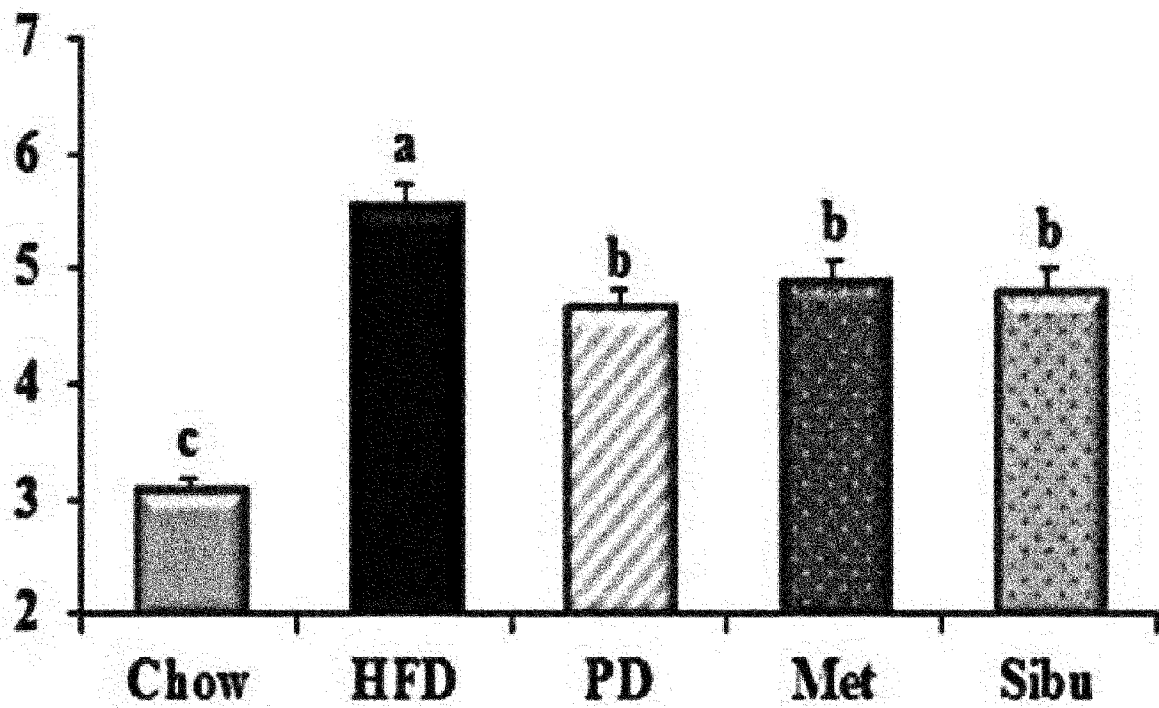
[도2b]



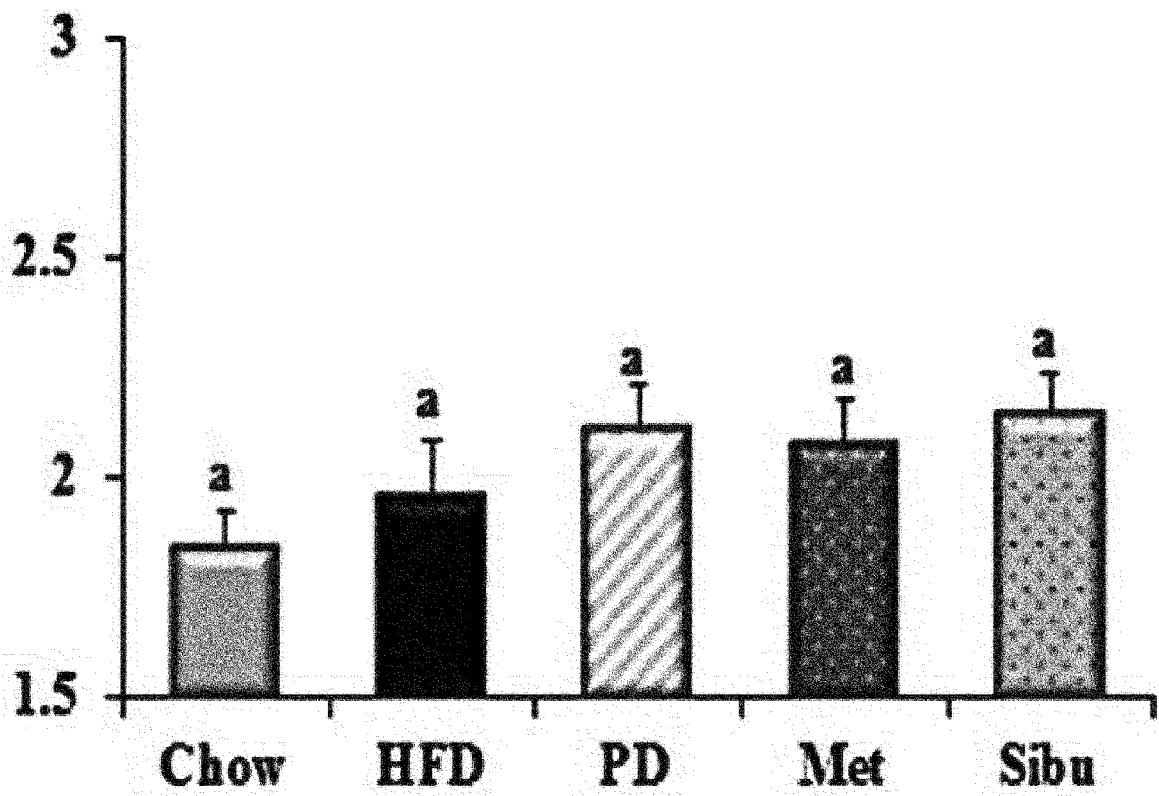
[도3a]



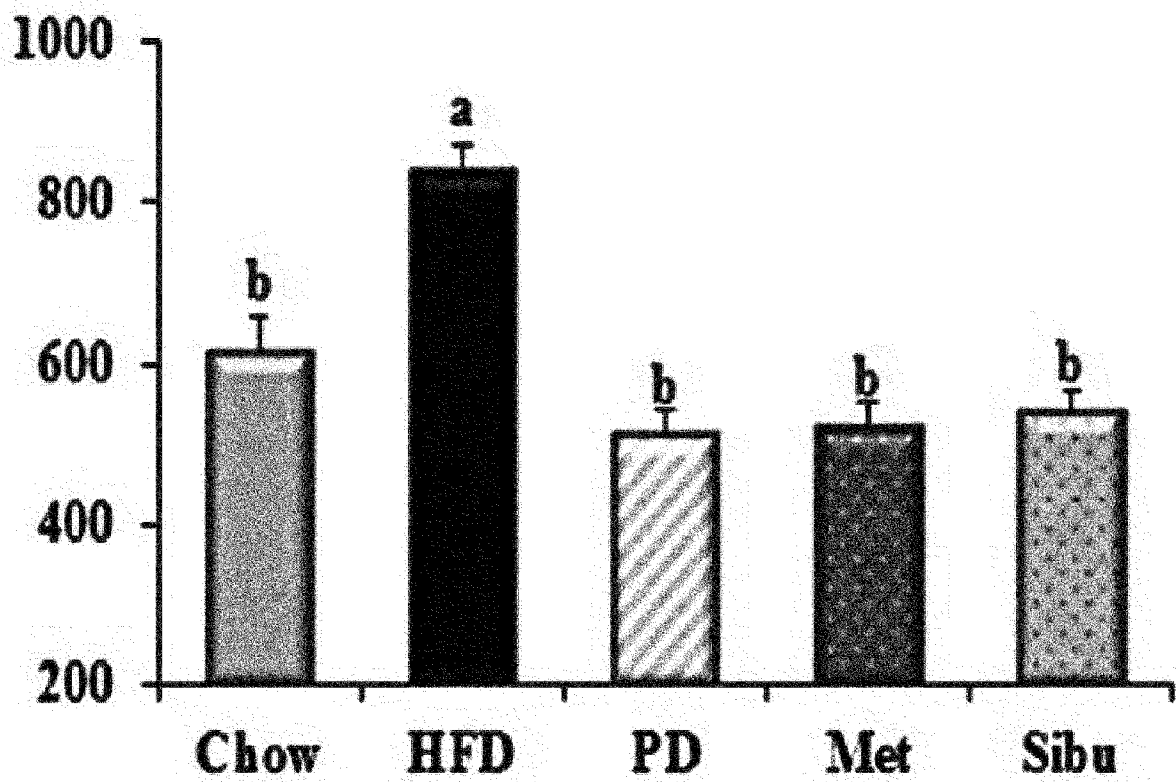
[도3b]



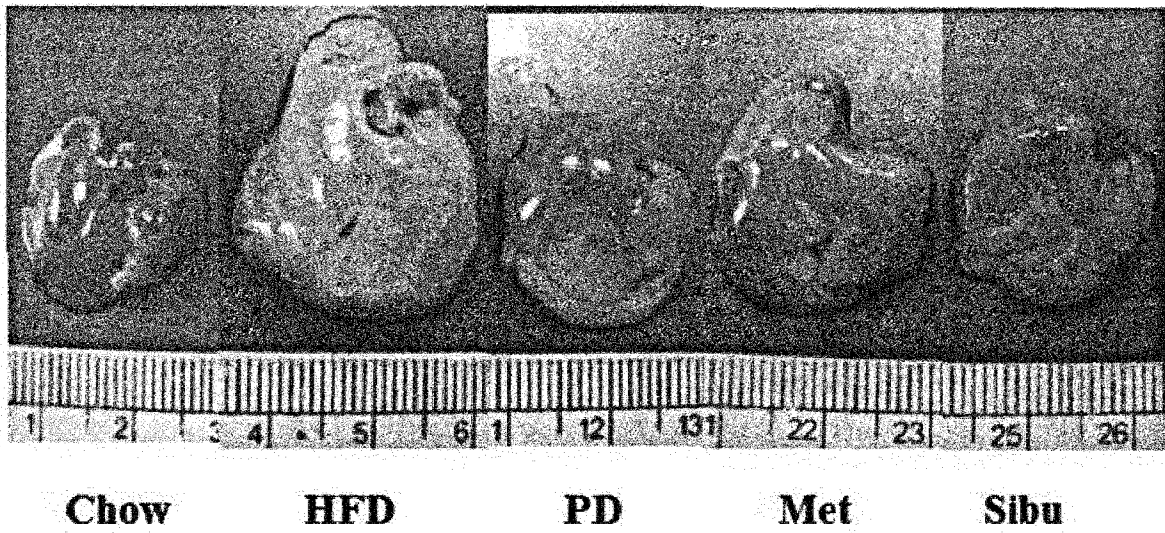
[도3c]



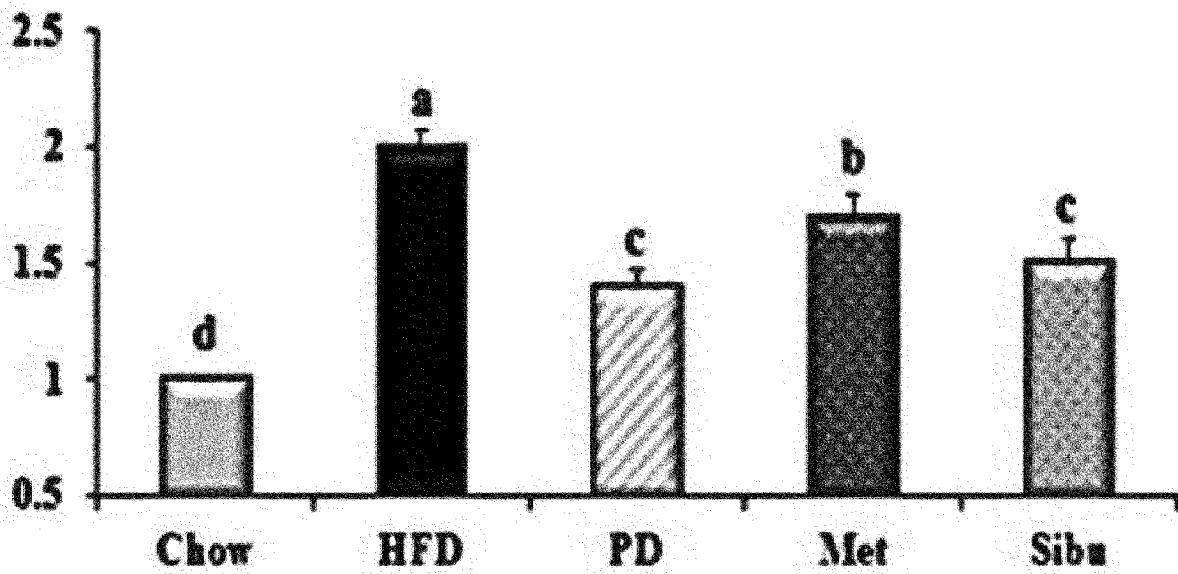
[도3d]



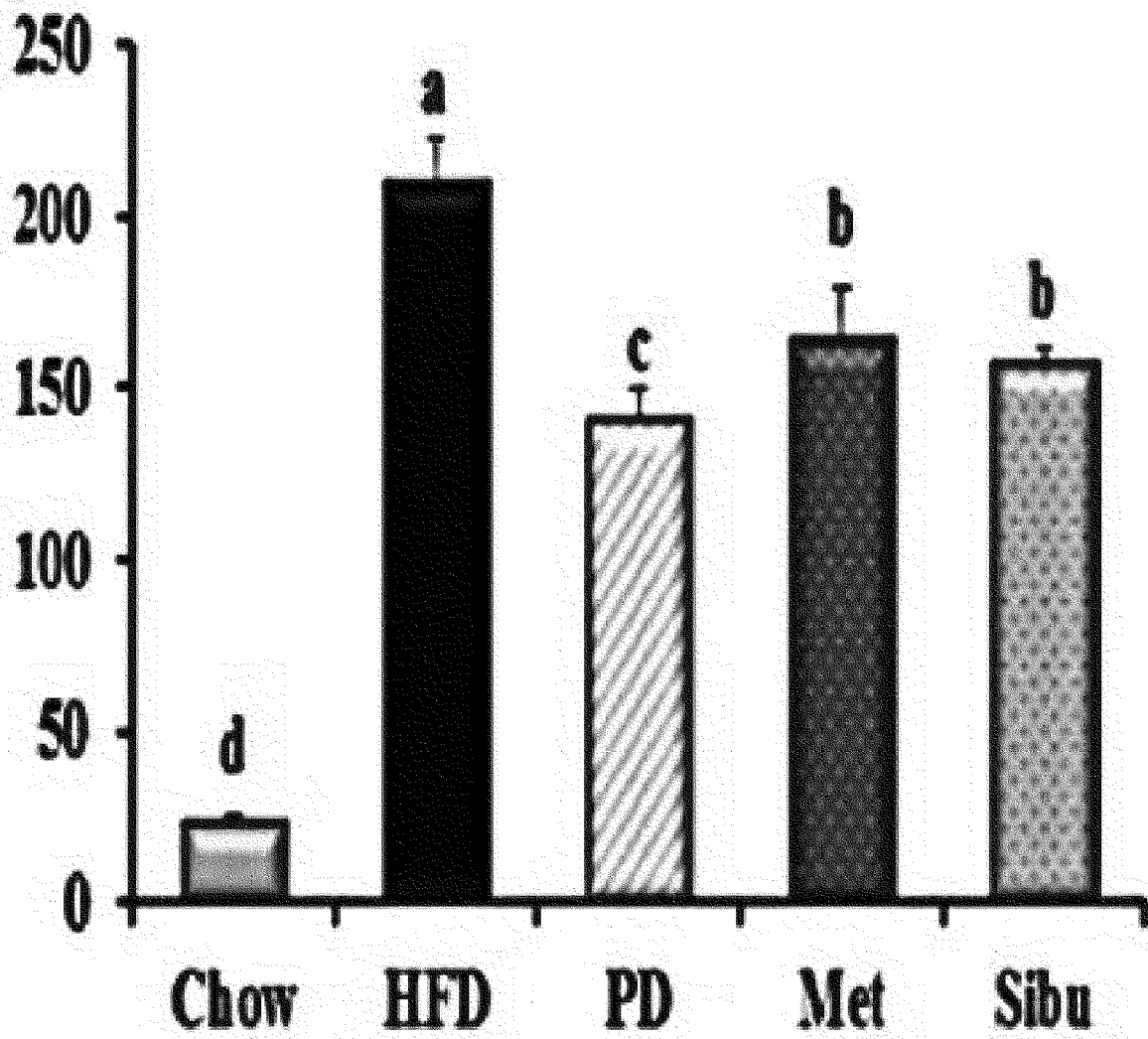
[도4a]



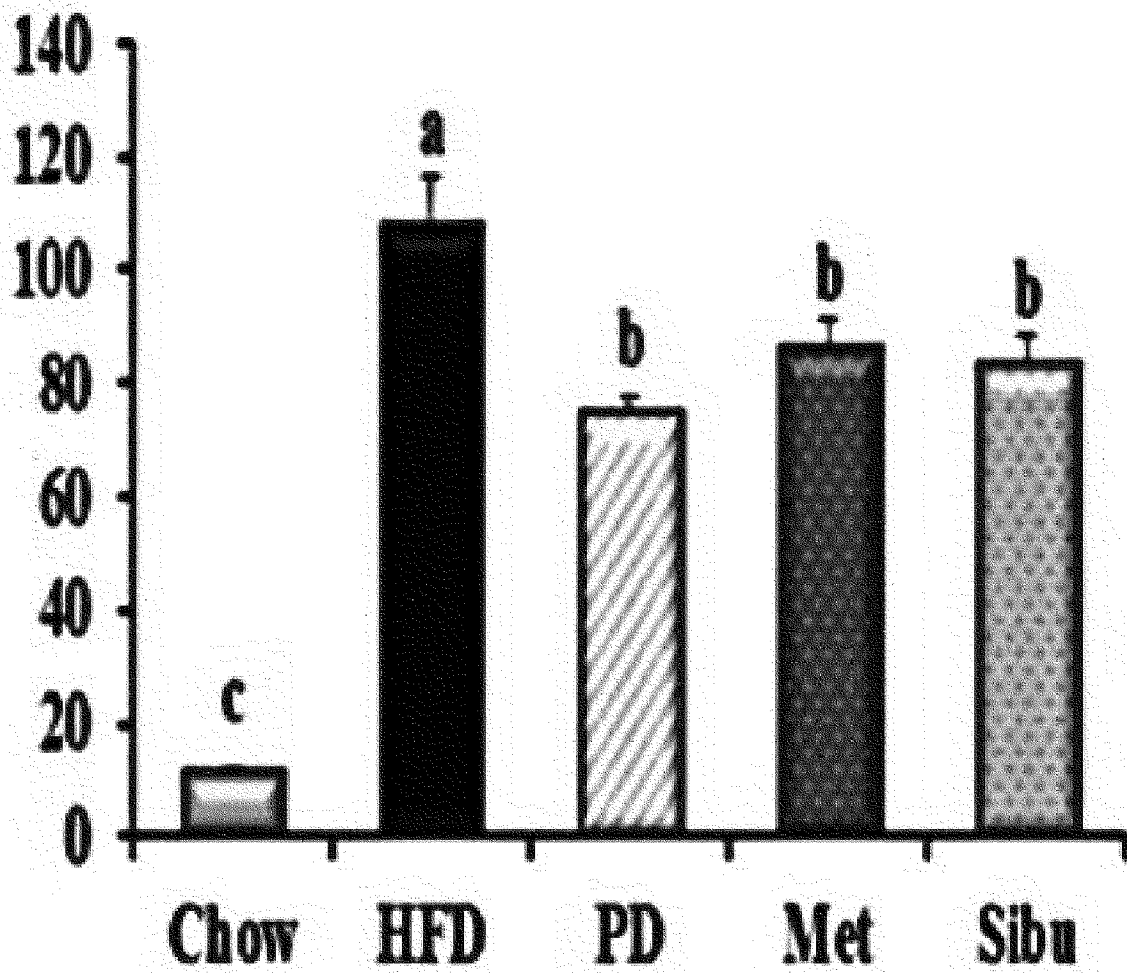
[도4b]



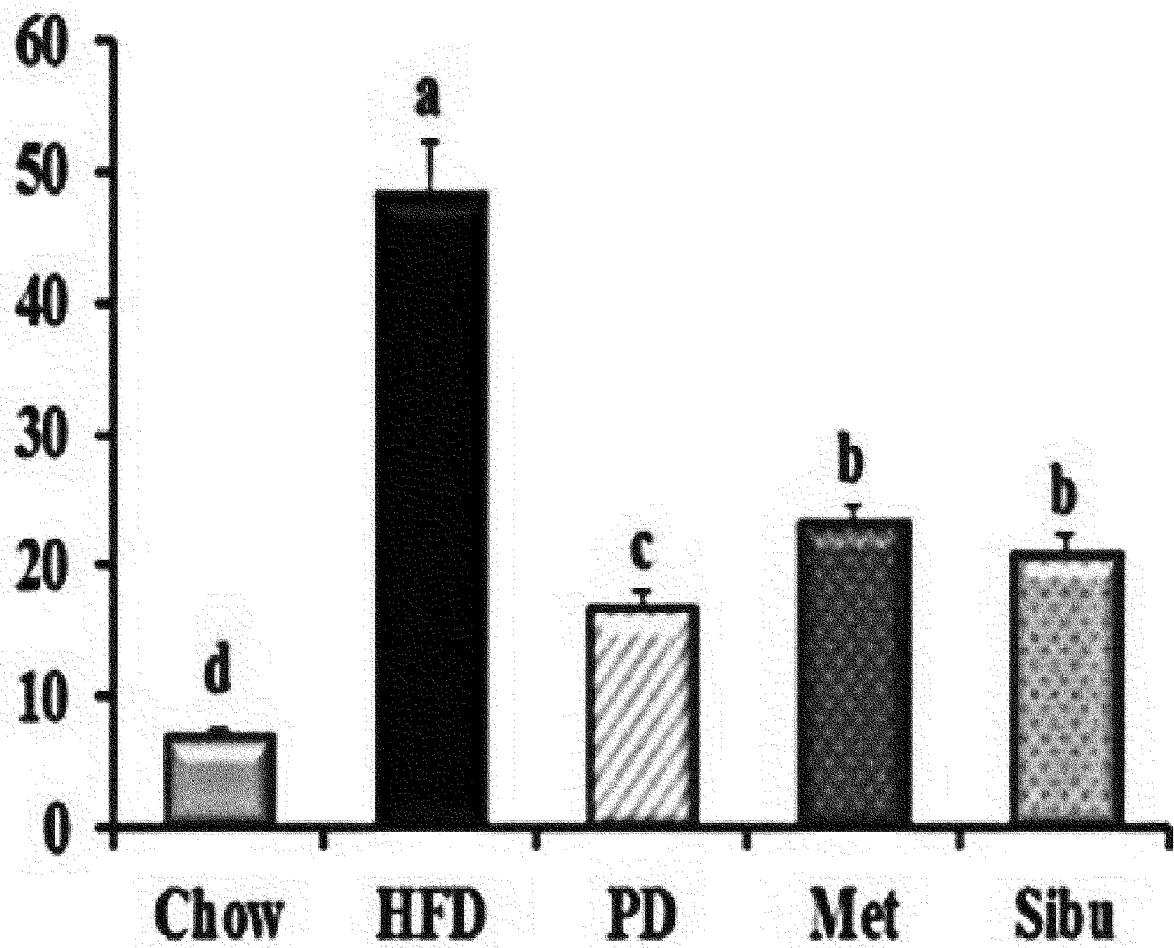
[도4c]



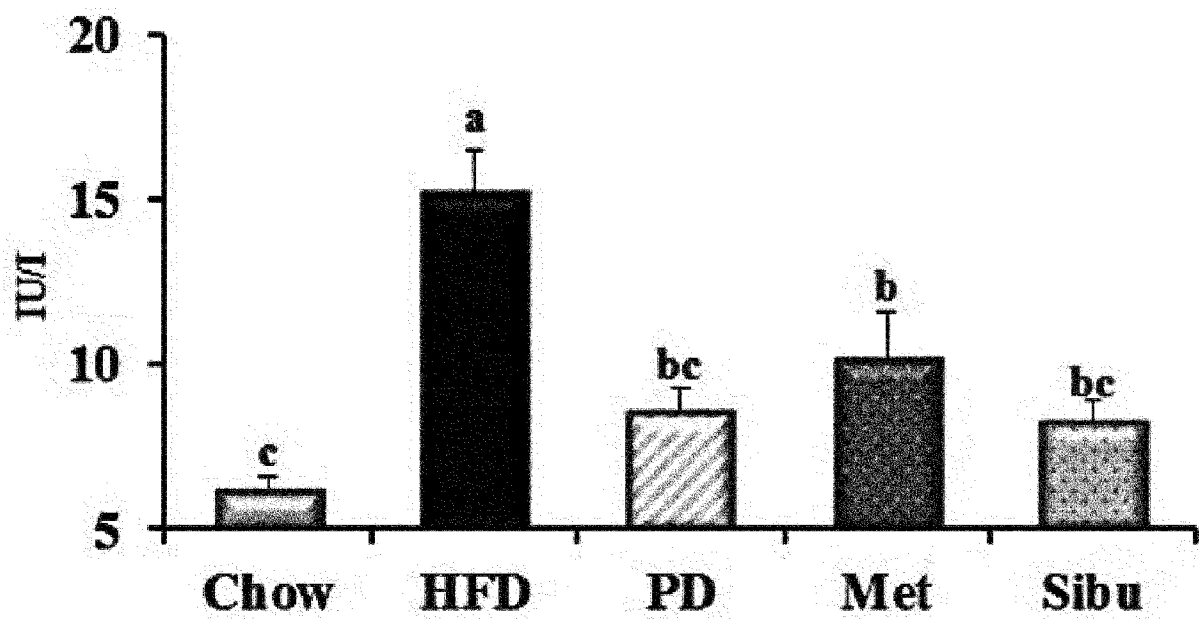
[도4d]



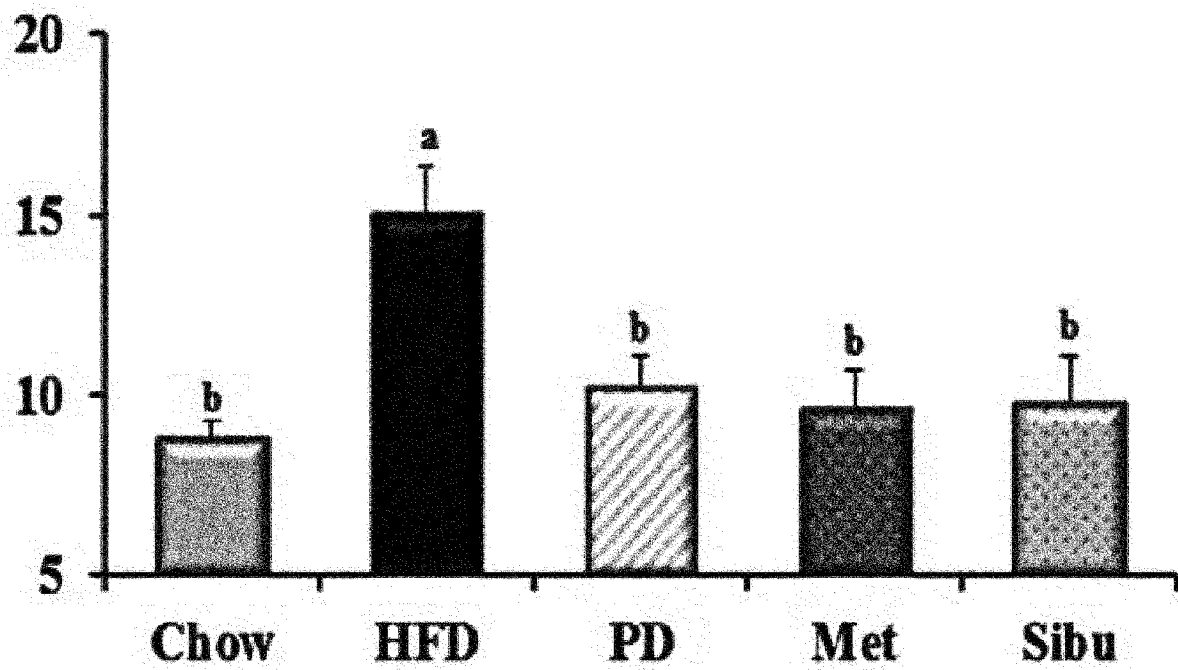
[도4e]



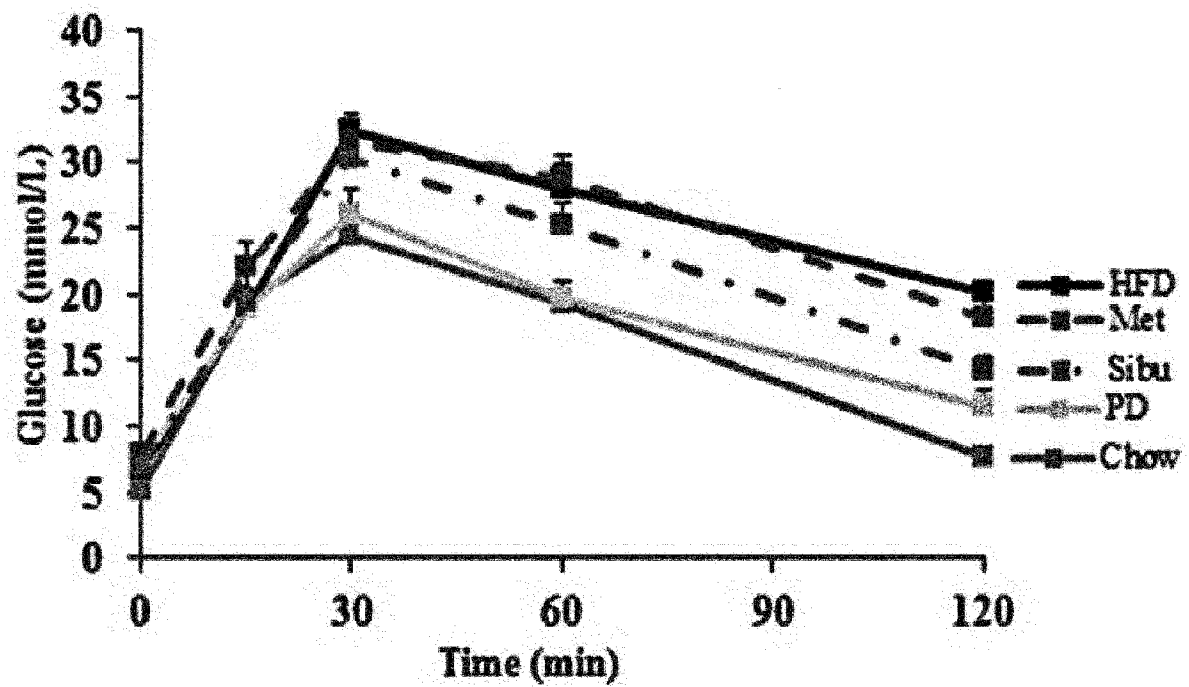
[도4f]



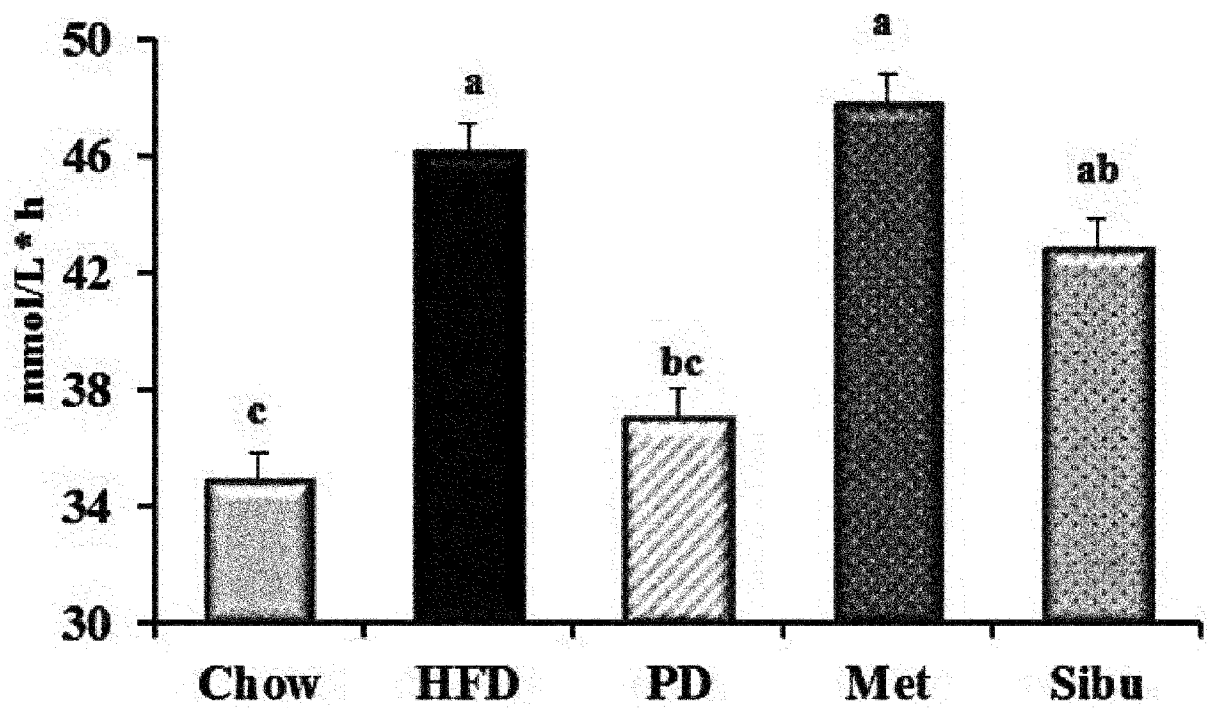
[도4g]



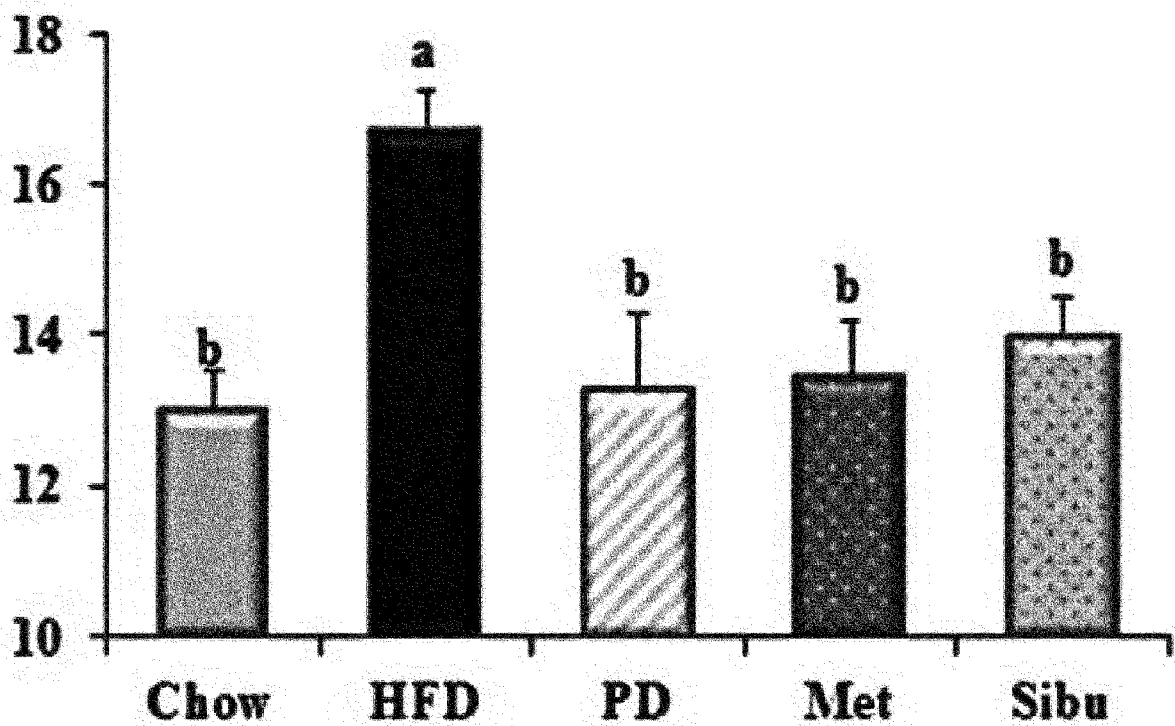
[도5a]



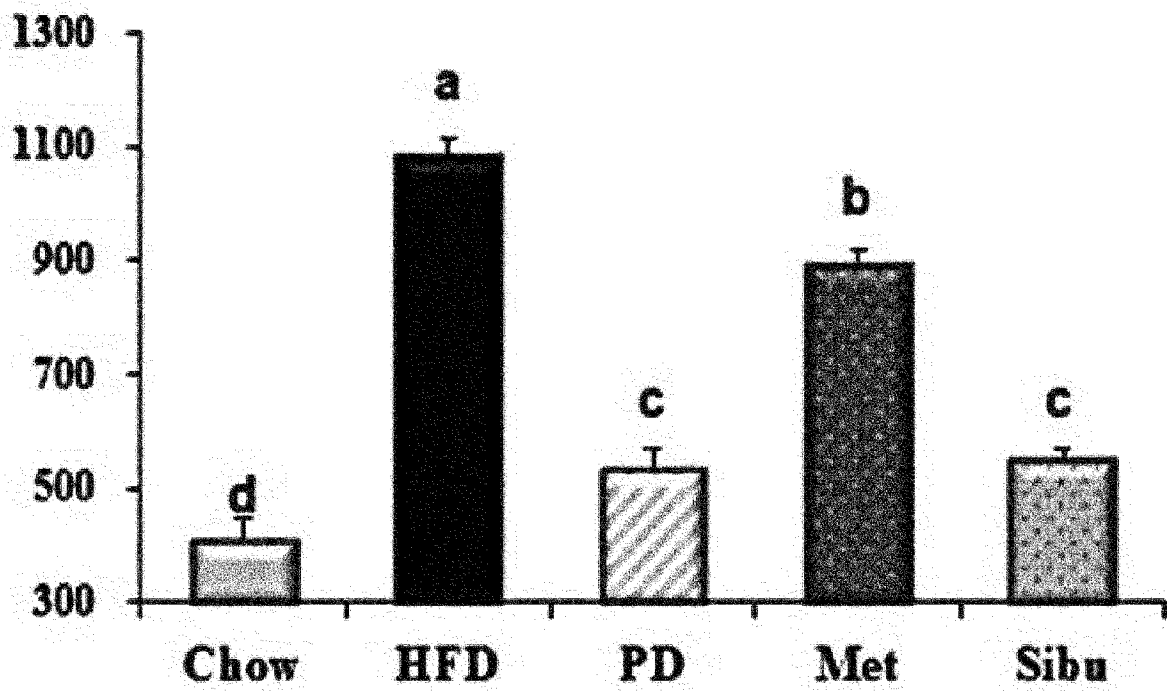
[도5b]



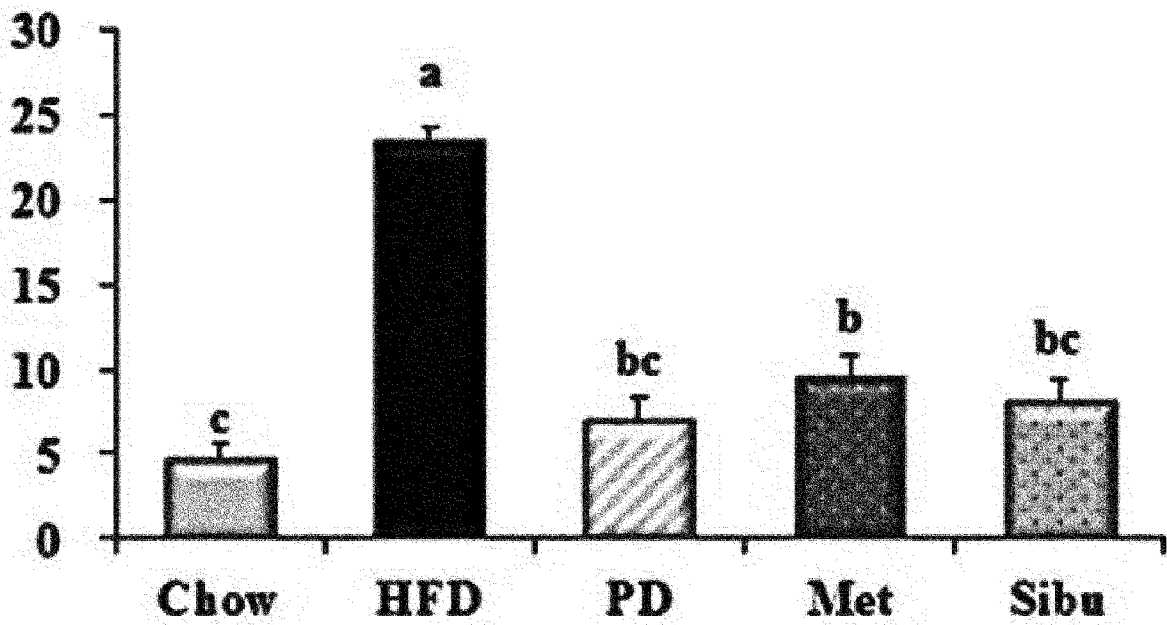
[도5c]



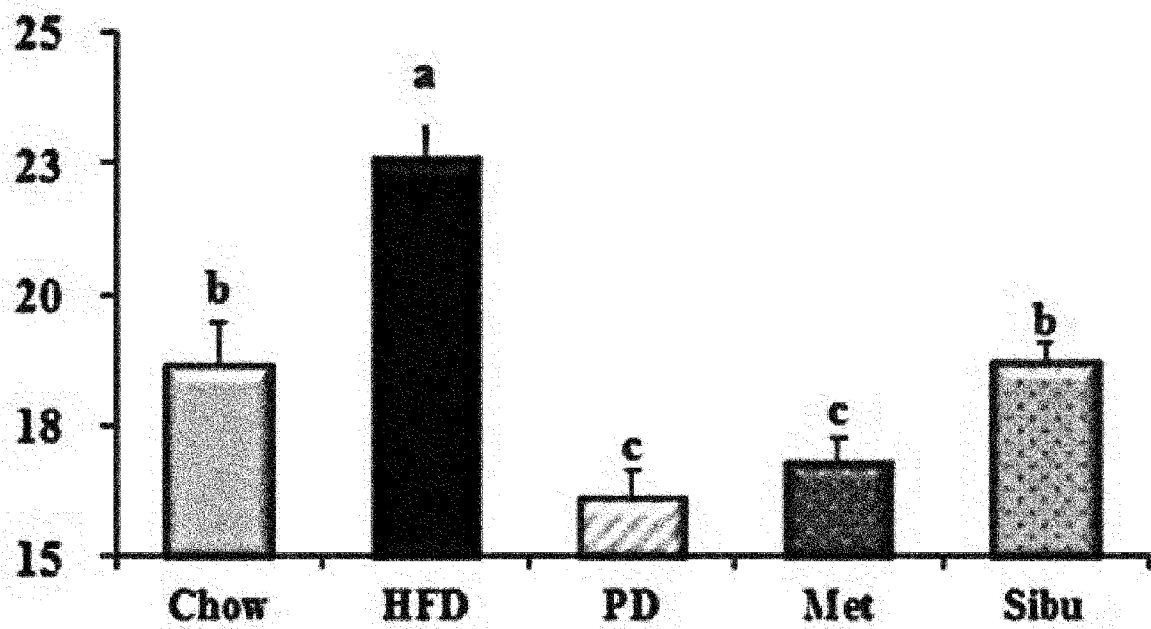
[도5d]



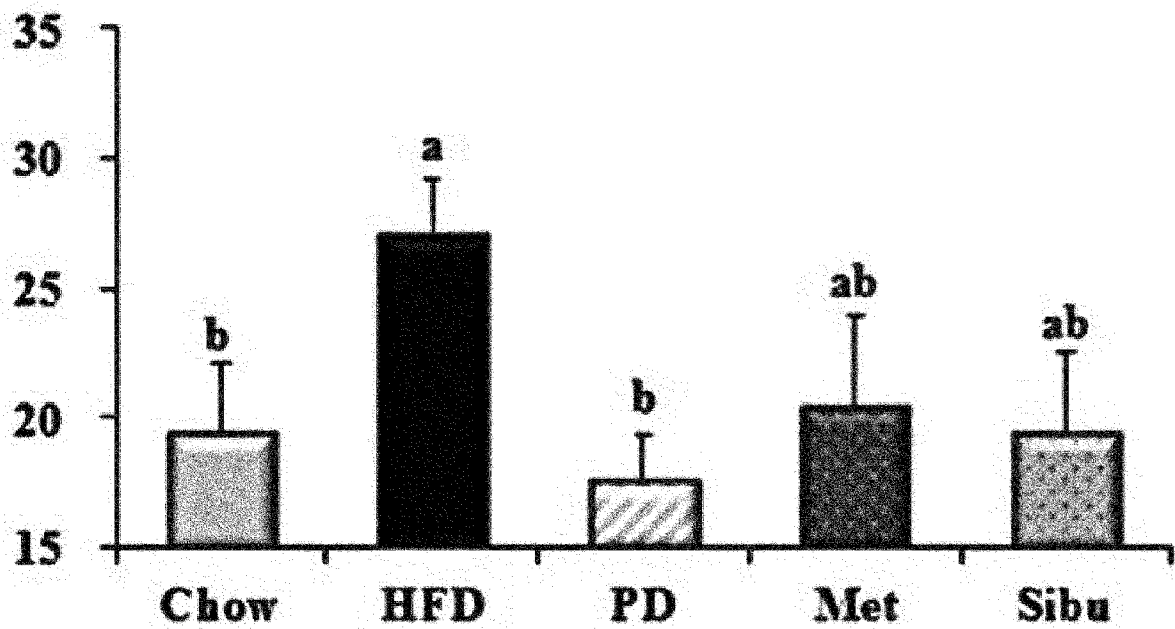
[도6a]



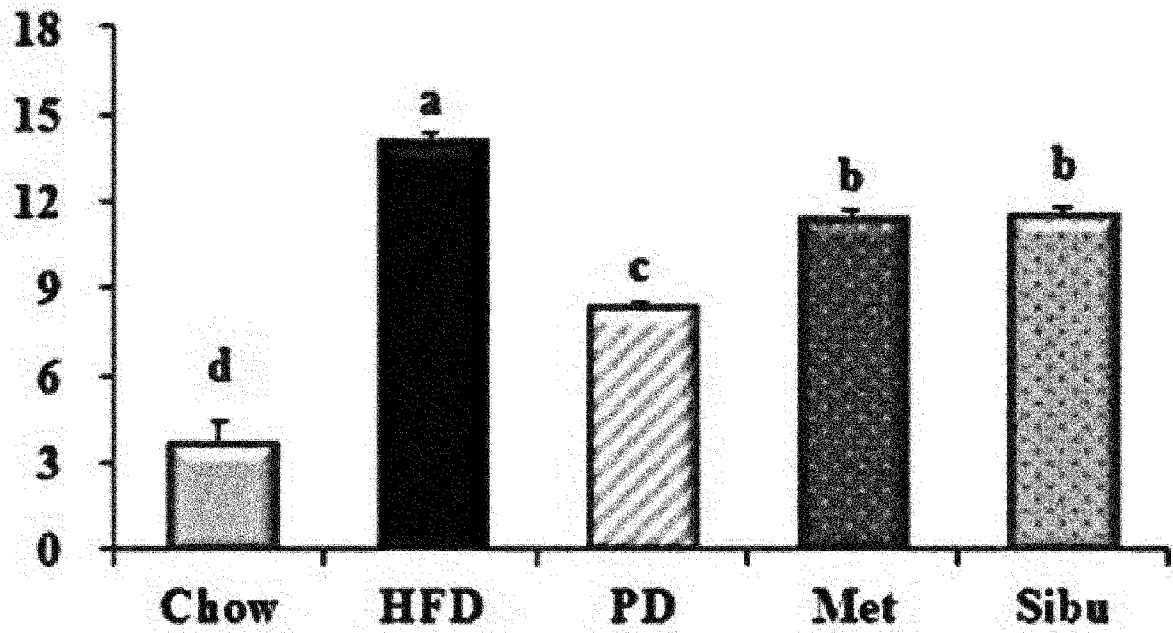
[도6b]



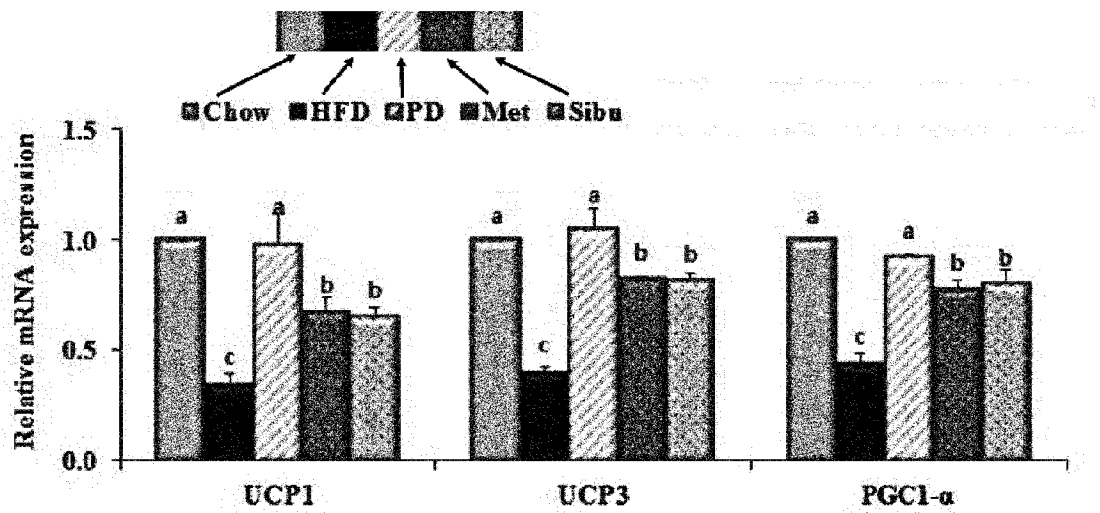
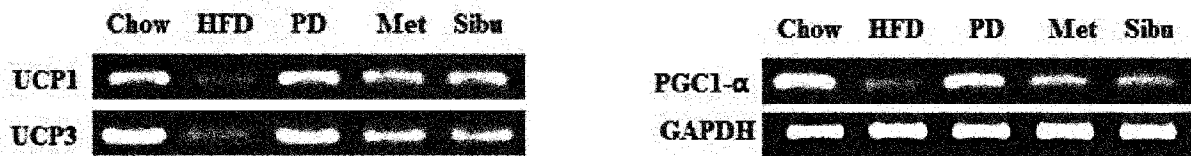
[도6c]



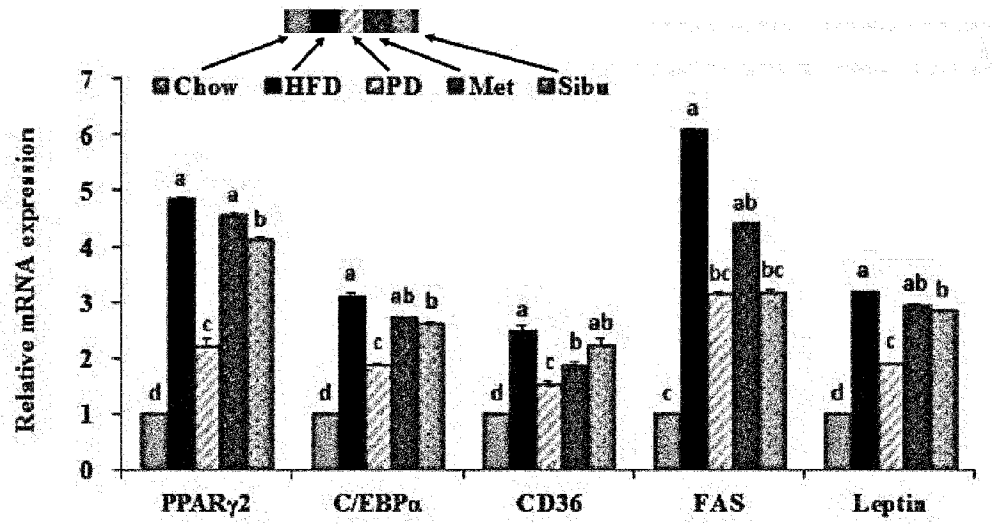
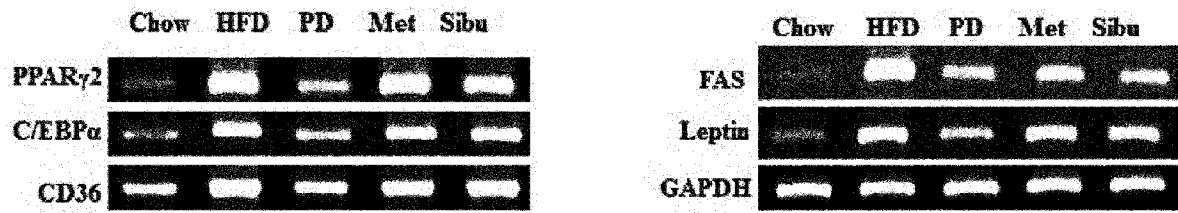
[도6d]



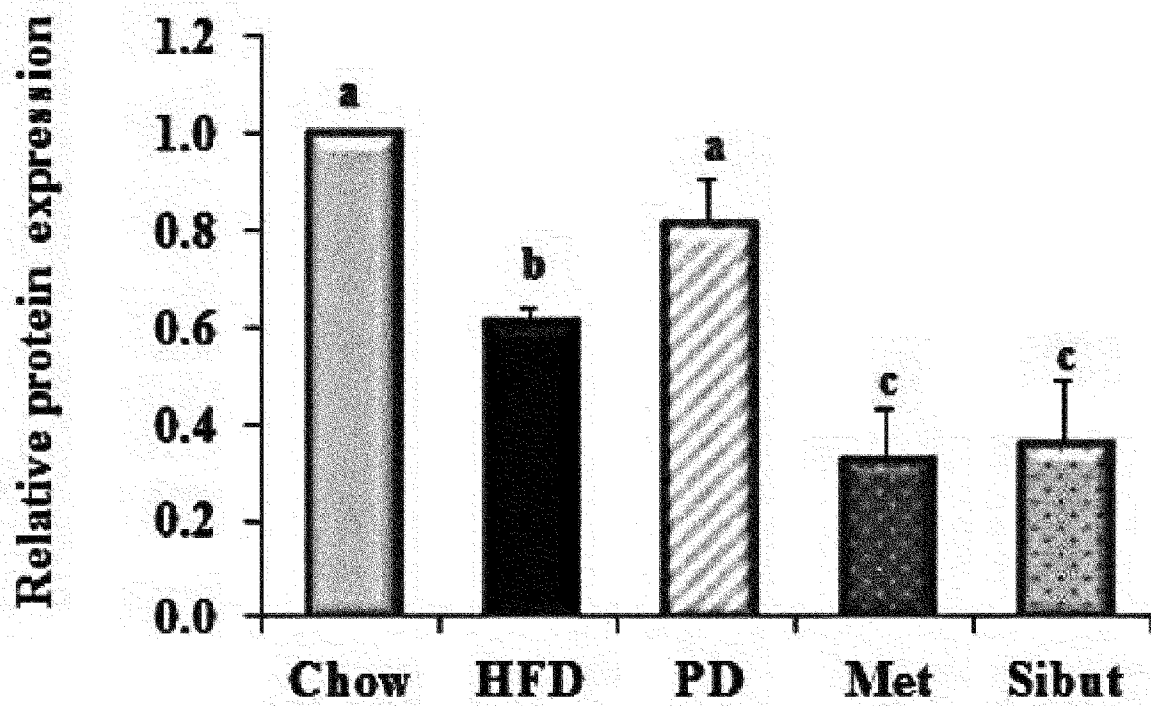
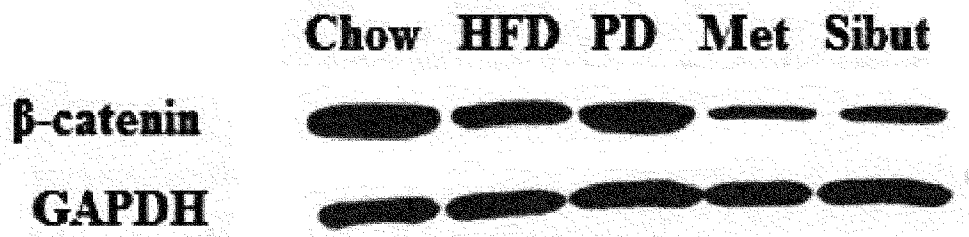
[도7a]



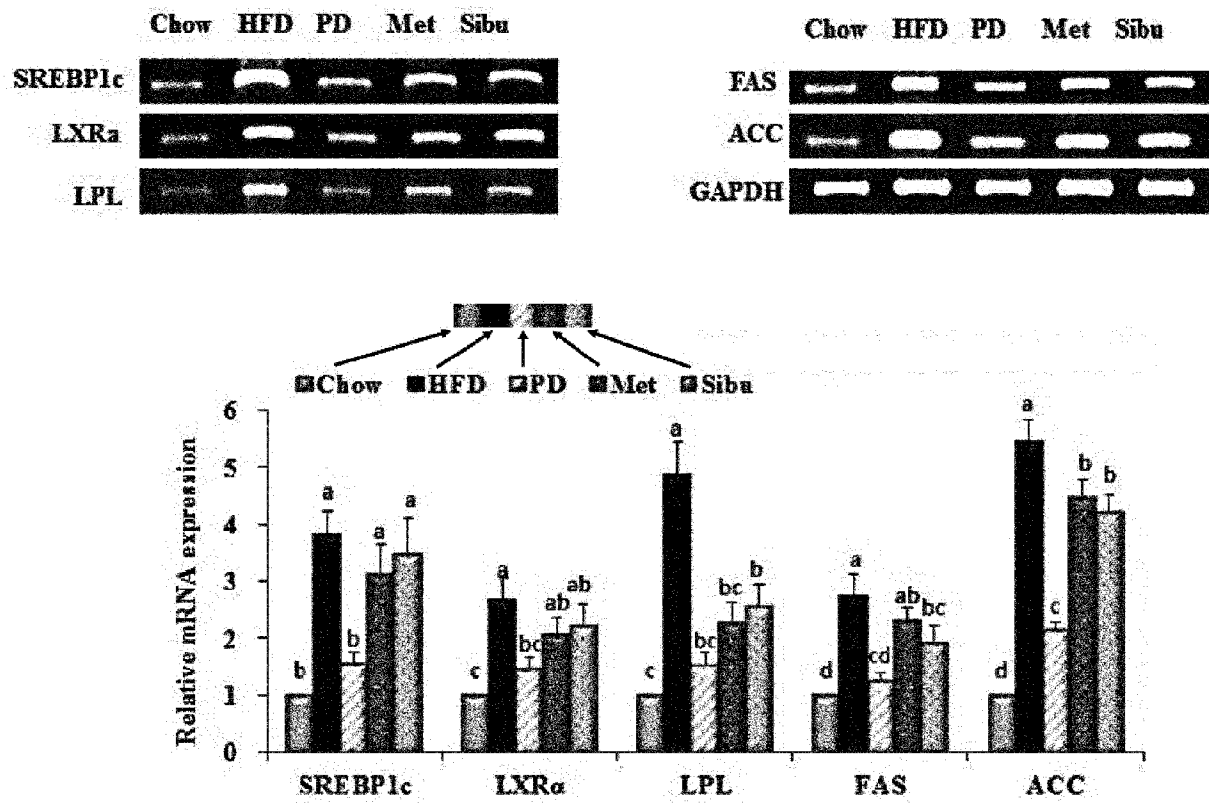
[도7b]



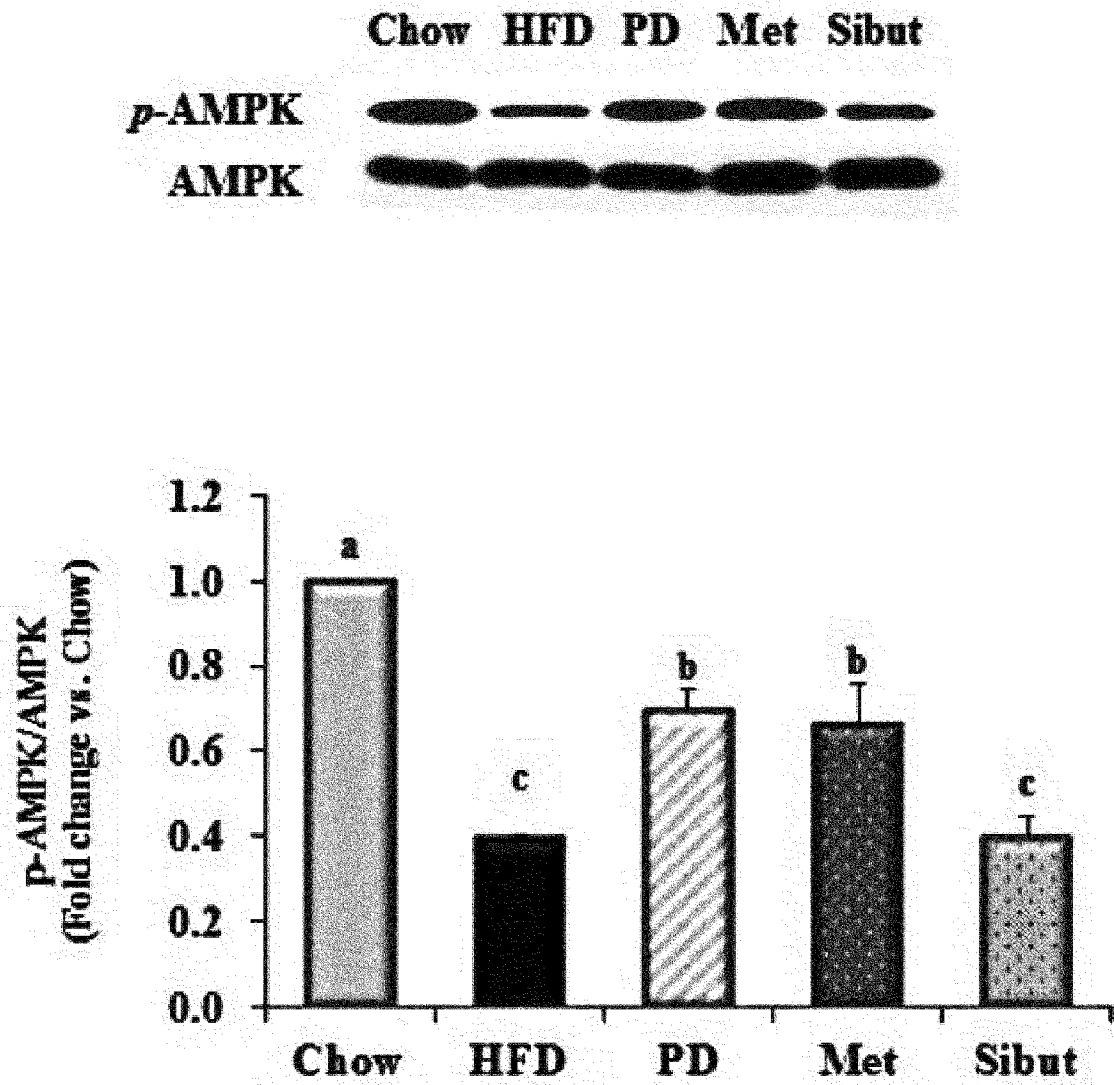
[도7c]



[도8a]



[도8b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/005721**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***A61K 31/045(2006.01)i, A23L 1/30(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 31/045; A61K 31/216; C07C 69/736; A61K 36/61; A61K 36/752; A61K 31/01; A61K 31/343; A23L 1/30

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: pinocarveol, metabolic disease, obesity, diabetes, hyperlipidemic, steatosis, insulin resistance, dyslipidemia

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2011-0045069 A1 (LEY, J. P. et al.) 24 February 2011 See abstract; paragraphs [0057], [0065], [0066], [0146]-[0149]; and claim 15.	1-12
A	SINGH, N. et al., "Phyto-pharmacotherapeutics of Cyperus Rotundus Linn. (Motha): An Overview", Indian Journal of Natural Products and Resources, 2012, vol. 3, no. 4, pages 467-476 See abstract; and page 469.	1-12
A	US 2008-0233219 A1 (KARITA, T.) 25 September 2008 See abstract; and claims 1-9.	1-12
A	US 2004-0092583 A1 (SHANAHAN-PRENDERGAST, E.) 13 May 2004 See abstract; and paragraph [0079].	1-12
A	SHAFI, P. M. et al., "Antibacterial Activity of Syzygium Cumini and Syzygium Travancoricum Leaf Essential Oils", Fitoterapia, 2002, vol. 73, no. 5, pages 414-416 See abstract.	1-12



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

"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

08 SEPTEMBER 2016 (08.09.2016)

Date of mailing of the international search report

08 SEPTEMBER 2016 (08.09.2016)

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/005721

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.: **13-15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 13-15 pertain to a method for diagnosis or treatment of the human body, 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 SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/005721

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2011-0045069 A1	24/02/2011	DE 102009027744 A1 EP 2292224 A1 US 8592621 B2	20/01/2011 09/03/2011 26/11/2013
US 2008-0233219 A1	25/09/2008	CA 2620687 A1 CN 101300020 A EP 1932532 A1 RU 2008112216 A WO 2007-026645 A1	08/03/2007 05/11/2008 18/06/2008 10/10/2009 08/03/2007
US 2004-0092583 A1	13/05/2004	AU 2002-219472 A1 EP 1351678 A2 WO 02-053138 A2 WO 02-053138 A3	16/07/2002 15/10/2003 11/07/2002 19/09/2002

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**A61K 31/045(2006.01)I, A23L 1/30(2006.01)I****B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/045; A61K 31/216; C07C 69/736; A61K 36/61; A61K 36/752; A61K 31/01; A61K 31/343; A23L 1/30

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: 피노카베올, 대사질환, 비만, 당뇨, 고지혈, 지방간, 인슐린 저항성, 이상지질혈증

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2011-0045069 A1 (LEY, J. P. 등) 2011.02.24 요약; 단락 [0057], [0065], [0066], [0146]-[0149]; 및 청구항 15 참조.	1-12
A	SINGH, N. 등, "Phyto-pharmacotherapeutics of Cyperus rotundus Linn. (Motha): An overview", Indian Journal of Natural Products and Resources, 2012, 제3권, 제4호, 페이지 467-476 초록; 및 페이지 469 참조.	1-12
A	US 2008-0233219 A1 (KARITA, T.) 2008.09.25 요약; 및 청구항 1-9 참조.	1-12
A	US 2004-0092583 A1 (SHANAHAN-PRENDERGAST, E.) 2004.05.13 요약; 및 단락 [0079] 참조.	1-12
A	SHAFI, P. M. 등, "Antibacterial activity of Syzygium cumini and Syzygium travancoricum leaf essential oils", Fitoterapia, 2002, 제73권, 제5호, 페이지 414-416 초록 참조.	1-12

☐ 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

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

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

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

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 09월 08일 (08.09.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 09월 08일 (08.09.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청

(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,

4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

이기철

전화번호 +82-42-481-3353



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: 13-15
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제13항 내지 제15항은 사람의 진단 방법 또는 치료방법에 관한 것이므로,
PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 본 국제조사기
관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니
다. 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 합
니다.
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 대상
으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발
명에 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.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2011-0045069 A1	2011/02/24	DE 102009027744 A1 EP 2292224 A1 US 8592621 B2	2011/01/20 2011/03/09 2013/11/26
US 2008-0233219 A1	2008/09/25	CA 2620687 A1 CN 101300020 A EP 1932532 A1 RU 2008112216 A WO 2007-026645 A1	2007/03/08 2008/11/05 2008/06/18 2009/10/10 2007/03/08
US 2004-0092583 A1	2004/05/13	AU 2002-219472 A1 EP 1351678 A2 WO 02-053138 A2 WO 02-053138 A3	2002/07/16 2003/10/15 2002/07/11 2002/09/19