

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 11월 17일 (17.11.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/182161 A1

- (51) 국제특허분류:
A23L 33/10 (2016.01) A61K 31/366 (2006.01)
A61K 36/73 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/013365
- (22) 국제출원일: 2015년 12월 8일 (08.12.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0065355 2015년 5월 11일 (11.05.2015) KR
- (71) 출원인: 한국 한의학 연구원 (KOREA INSTITUTE OF ORIENTAL MEDICINE) [KR/KR]; 34054 대전시 유성구 유성대로 1672, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 송광훈 (SONG, Kwang-Hoon); 34048 대전시 유성구 엑스포로 501, 101 동 1404 호, Daejeon (KR). 김윤희 (KIM, Yun Hee); 13830 경기도 과천시 부림로 24-10, Gyeonggi-do (KR). 이해원 (LEE, Hye Won); 34053 대전시 유성구 전민로 71, 102 동 803 호, Daejeon (KR). 김영화 (KIM, Young Hwa); 13908 경기도 안양시 만안구 경수대로 1290 번길 15, 101 동 302 호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 최규환 (CHOI, Kyu Whan); 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (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.

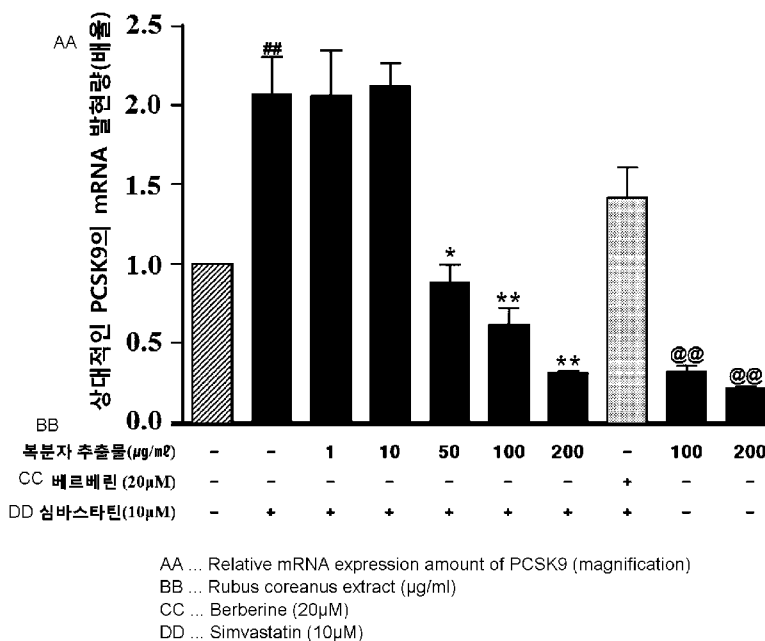
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, 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: COMPOSITION CONTAINING RUBUS COREANUS EXTRACT OR FRACTION THEREOF AS ACTIVE INGREDIENT FOR INCREASING LOW-DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR BY INHIBITING PCSK9 GENE EXPRESSION, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 PCSK9 유전자의 발현 억제제를 통한 저밀도 지단백 수용체 증가용 조성물 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a composition containing Rubus coreanus extract or a fraction thereof as an active ingredient for decreasing the PCSK9 gene expression increased by a statin-based compound or for increasing a low-density lipoprotein receptor (LDLR) decreased by the statin-based compound. The composition of the present invention can lower blood cholesterol level by improving the expression of a low-density lipoprotein receptor by means of inhibition of PCSK9 gene expression. In addition, by lowering the amount of cholesterol in blood, the composition can be utilized in prevention, alleviation or treatment of metabolic diseases such as obesity, diabetes mellitus type 2, hypertension, cardiovascular diseases and hyperlipidemia.

(57) 요약서: 본 발명은 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하며, 스타틴계 화합물에 의해 증가된 PCSK9 유전자의 발현을 감소시키거나, 스타틴계 화합물에 의해 감소된 저밀도 지단백 수용체(LDLR)를 증가시키기 위한 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 PCSK9 유전자의 발현 억제를 통한 저밀도 지단백 수용체의 발현을 증진시

김으로써, 콜레스테롤의 혈중 수치를 낮출 수 있다. 혈중 콜레스테롤의 양을 낮춤으로써, 비만, 제 2형 당뇨병, 고혈압, 심장혈관 질환 또는 고지혈증 등의 대사성 질환의 예방, 개선 또는 치료에 활용될 수 있다.

WO 2016/182161 A1

명세서

발명의 명칭: 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 PCSK9 유전자의 발현 억제를 통한 저밀도 지단백 수용체 증가용 조성물 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하며, PCSK9 유전자의 발현 억제를 통한 저밀도 지단백 수용체(LDLR)의 발현을 증가시키기 위한 조성물에 관한 것으로, 특히 스타틴계 화합물에 의해 증가된 PCSK9 유전자 발현을 복분자 추출물 또는 이의 분획물에 의해 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 경제 성장과 식생활의 서구화로 인하여 음식물에서 얻는 지방의 섭취량이 증가하고 있으며, 운동부족 등으로 인한 고지혈증, 당뇨병, 고혈압, 동맥 경화증 및 지방간과 같은 대사성 질환이 증가하고 있는 추세이다.
- [3] 고지혈증(Hyperlipidemia)은 혈액 내에 유리 콜레스테롤, 콜레스테롤 에스테르, 인지질, 중성 지방 등의 지방질이 비정상적으로 증가한 상태로, 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증 및 조합 고지혈증(고콜레스테롤혈증 및 고중성지방혈증)의 3가지 형태로 나타날 수 있다. 고지혈증은 일반적으로 그 자체가 특정 증상을 나타내는 것은 아니나, 혈액 내에 과다한 지질은 혈관 벽에 달라붙어 혈관을 좁히며, 염증 반응을 통한 동맥경화(Atherosclerosis)를 일으킨다. 이로 인해 관상동맥 심장 질환이나 뇌혈관 질환, 말초 혈관의 폐쇄 등이 발생할 수 있다. 또한 과다한 혈액 내 지질은 간 조직에 축적되게 되며 이로 인해 지방간(Fatty liver)이 유발될 수 있다.
- [4] 현재까지 혈중 지질 농도를 감소시키는 방법으로는 콜레스테롤이나 지방이 많이 함유되어 있는 음식물의 섭취를 줄이는 식이요법, 운동 요법 및 약물 요법 등이 사용되고 있다. 하지만, 식이 요법이나 운동 요법은 엄격한 관리 및 실시가 곤란하며, 그 치료 효과에 있어서도 한계가 있다. 현재까지 개발된 지질 농도를 감소시키는 약물로는 담즙산 결합수지, 콜레스테롤 생합성에 있어서 중요한 효소인 HMG-CoA 환원효소 억제제(HMG-CoA reductase inhibitors)와 같이 콜레스테롤의 양을 낮추는 약물, 피브린산 유도체, 니코틴산 등의 중성지방을 낮추는 약제들이 개발되었다.
- [5] 그 중에서 현재, 고지혈증 치료제로서 가장 흔히 사용되는 약물은 스타틴(statin) 계열의 화합물이다(Goldstein, J. L. and Brown, M. S. 2009 Arterioscler Thromb Vasc Biol 29: 431-438). 스타틴계 화합물은 세포 내 콜레스테롤 합성 과정의 속도를 조절하는 효소인 HMG-CoA 환원효소(reductase)의 활성을 억제하여 세포 내 콜레스테롤의 양을

감소시킴으로써 혈중으로 분비되는 콜레스테롤의 양이 줄어들어 혈중 콜레스테롤의 농도를 낮춘다. 스타틴계 화합물이 저밀도 지단백 수용체(low density lipoprotein receptor)의 양을 증가시키는 것으로 알려져 있지만, 반대로 PCSK9 유전자의 발현을 전사 수준에서 증가시키는 작용도 한다(Janice Mayne et al. *Lipids in health and Disease* 2008, 7:22).

- [6] 즉, 스타틴계 화합물이 매우 효과적인 고콜레스테롤혈증의 약물이기는 하지만, 임상적으로 상기 스타틴계 화합물의 용량을 두 배 증가시켜도 용량에 비례하여 콜레스테롤을 감소시키지 못하고, 최초 용량에 의하여 감소된 정도에서 추가로 약 5~6% 더 감소하는 정도에 그친다. 그러한 이유가 스타틴계 화합물이 상기한 바와 같이 PCSK9을 증가시키기 때문이다.
- [7] 한편, PCSK9(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9)은 세포막에 존재하는 저밀도 지단백 수용체(low density lipoprotein receptor; LDLR)의 EGF-A 도메인과 결합하여 세포 내로 이동한 후, 세포 내의 라이소좀(lysosome)에서 LDLR가 분해될 수 있도록 하는 단백질이다(Horton, J. et al. 2007 *Trends in Biochemical Sciences* 32: 71-77). PCSK9 유전자의 발현이 증가할 경우, LDLR이 감소하여 혈중 콜레스테롤의 농도가 급격히 증가하며, PCSK9 활성이 증가하는 획득 형질 돌연변이(gain-of-function mutation)가 있는 환자는 상염색체 우성 가족성 과콜레스테롤혈증(autosomal dominant familial hypercholesterolemia)이 발병하고(Abifadel, M., et al. 2003 *Nat. Genet.* 34: 154-156), 반대로 PCSK9 유전자의 유전자 기능이 상실된 결실 기능 돌연변이(loss-of-function mutation)가 있는 사람에서 혈중 LDL-콜레스테롤의 농도가 정상인에 비하여 감소되어 있으며 관상동맥 질환의 발병 확률이 매우 낮은 사실이 보고되었다(Cohen, J., et al. 2005. *Nat. Genet.* 37: 161-165). 또한, PCSK9가 결실된 마우스에서 LDLR의 발현 증가가 나타나며, 혈중 LDL 콜레스테롤의 농도가 감소됨이 보고되었다(Rashid, S., et al. 2005 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 5374-5379). 따라서 PCSK9 유전자의 발현을 억제할 경우 LDLR의 양을 증가시킬 수 있으며, 혈중 콜레스테롤 농도를 감소시키게 되어 관상동맥질환의 발병률을 현저히 낮출 수 있는 고콜레스테롤혈증의 새로운 치료 표적으로 밝혀지고 있다.
- [8] 현재까지 PCSK9 유전자의 조절을 통하여 혈중 콜레스테롤 농도의 감소를 유도하는 방법으로는 siRNA를 이용하여 PCSK9 유전자의 합성을 억제하는 방법, PCSK9에 대한 항체를 이용하여 PCSK9 단백질의 양을 감소시키거나 PCSK9과 LDLR간의 결합을 방해하는 펩티드를 이용하여 PCSK9 유전자의 활성을 억제하는 방법 및 소분자 화합물(small compound)을 이용하여 PCSK9 유전자의 활성을 억제하거나 발현 양의 감소를 유도하는 방법이 있었다.
- [9] 한편, 복분자는 장미과의 복분자 딸기의 채 익지 않은 열매로 만든 약재로서 신(腎)기능을 복돋아 유정(遺精), 몽정(夢精), 유뇨(遺尿) 등에 사용하며, 시력약화에 쓰고 몸을 가볍게 하고 머리를 검게 하며 살결을 부드럽고 아름답게 한다. 약리작용으로 항염작용, 항산화작용, 항헬리코박터 파이로리 작용이

보고되고 있으며, 비만세포 활성화 억제효과, 체중 조절 효과, 혈중지질성분 변화에 효과, 항산화효과, 혈압저해효과, 항균효과 등이 보고되었다. 한방에서는 신장기능, 불임증, 음위증, 유정몽설, 강장제로 쓰였으며 혈액과 눈을 맑게 해주며, 간을 보호하는 효능이 있다고 알려져 있으며, 탄수화물 분해 효소저해작용이 다소 있고, 영양성분으로는 무기질의 인과 철, 칼륨을 많이 함유하고 있고 특히 유기산과 비타민C가 많이 포함되어 있으며, 페놀 화합물로 캄프페롤(kaempferol), 케르세틴(querccetin) 등이 보고되었다.

- [10] 복분자 추출물 또는 이의 분획물에 관련된 종래 기술로는 한국등록특허 제1320371호에 혈중지질개선 활성을 지니는 복분자를 포함하는 건강기능식품에 관한 기술이 있으며, 한국공개특허 제2014-0031080호에 복분자 미숙과 추출물을 유효성분으로 함유하는 대사증후군 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관해 개시되어 있고, 스타틴계 화합물이 PCSK9 유전자의 발현을 증가시키는 것을 억제하는 것에 관한 기술로서 한국등록특허 제1401253호에 PCSK9 발현 억제를 통한 저밀도 지단백 수용체 증가 유도용 조성물이 개시되어 있으나, 본 발명의 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하며, PCSK9 유전자의 발현을 감소시키거나, 저밀도 지단백 수용체(LDLR)를 증가시키기 위한 조성물에 관한 기술은 보고된 바 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하며, PCSK9 유전자의 발현을 감소시키거나, 저밀도 지단백 수용체(LDLR)를 증가시키기 위한 조성물을 제공하고, 상기 조성물이 PCSK9 유전자의 발현 억제를 통한 저밀도 지단백 수용체(LDLR)를 증가시켜 간세포 내로의 저밀도 지단백(LDL)의 유입이 증가되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [12] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하며, PCSK9 유전자의 발현을 감소시키거나, 저밀도 지단백 수용체(LDLR)를 증가시키기 위한 조성물을 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하며, 스타틴계 화합물에 의해 증가된 PCSK9 유전자의 발현을 감소시키거나, 저밀도 지단백 수용체(LDLR)를 증가시키기 위한 조성물을 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하며, PCSK9 유전자의 발현 감소 또는 저밀도 지단백 수용체(LDLR) 증가용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 스타틴계 화합물 및 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하며, PCSK9 유전자의 발현을 감소시키거나, 저밀도 지단백

수용체(LDLR)를 증가시키는 것을 특징으로 하는 고콜레스테롤혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[16] 또한, 본 발명은 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 인간을 제외한 동물의 고콜레스테롤혈증의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물을 제공한다.

[17] 또한, 본 발명은 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 고콜레스테롤혈증의 예방 또는 개선용 사료 첨가제를 제공한다.

발명의 효과

[18] 본 발명은 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하며, PCSK9 유전자의 발현을 감소시키거나, 저밀도 지단백 수용체(LDLR)를 증가시키기 위한 조성물에 관한 것이다.

[19] 본 발명의 조성물은 특히, 스타틴계 화합물에 의해 증가된 PCSK9 유전자의 발현을 억제시키고, 저밀도 지단백 수용체를 증가시키는 효과가 있는 것으로, 콜레스테롤의 혈중 수치를 낮춰 대사성 질환의 예방, 개선 또는 치료에 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[20] 도 1은 루시퍼라아제 어세이 시스템의 모식도이다.

[21] 도 2는 루시퍼라아제 어세이 시스템의 작동 여부를 확인한 결과로서, (A)는 인간 PCSK9 유전자의 프로모터를 반딧불이 루시퍼라아제 리포터(Firefly Luciferase reporter)에 클로닝 한 후, HepG2 세포에 일과성 형질도입(transient transfection)하고, PCSK9 유전자 발현을 억제하는 것으로 알려져 있는 베르베린(berberine, 20 μ M) 및 베르베린을 포함하는 황련 열수 추출물(Coptis chinensis, 200 μ g/ml)을 처리한 후, 루시퍼라아제 어세이를 통해 루시퍼라아제 리포터 활성이 정상적으로 작동하는 것을 확인한 것이다. (B)는 인간 PCSK9 유전자 발현을 조절하는 것으로 알려져 있는 SREBP-1c 발현 벡터를 리포터와 co-transfection하여 프로모터 활성이 증가하는 것을 확인함으로써, 본 발명에 사용된 루시퍼라아제 리포터 활성이 정상적으로 작동하고 있음을 확인한 도면이다.

[22] 도 3은 인간 PCSK9 유전자의 프로모터(약 1.5 kb) 리포터를 HepG2 세포에 일과성 형질도입하고 24시간 후, 열수 추출 한약재 라이브러리(18종의 단미제)를 200 μ g/ml의 농도로 24시간 동안 처리하고, 루시퍼라아제 어세이를 실시한 결과이다. 양성대조군으로 베르베린(berberin, 20 μ M)을 사용하였고, 물질을 녹이는데 사용한 vehicle을 처리한 음성대조군(Con)을 기준으로 보정하였다.

[23] 도 4는 인간 PCSK9 유전자의 프로모터(약 1.5 kb) 리포터를 HepG2 세포에 일과성 형질도입하고 24시간 후, 에탄올 추출 한약재 라이브러리(18종의 단미제)를 200 μ g/ml의 농도로 24시간 동안 처리하고, 루시퍼라아제 어세이를 실시한 결과이다. 양성대조군으로 베르베린(berberin, 20 μ M)을 사용하였고,

물질을 녹이는데 사용한 vehicle을 처리한 음성대조군(Con)을 기준으로 보정하였다.

- [24] 도 5는 HepG2 세포에, 1 내지 200 μ g/ml의 복분자 열수 추출물을 24시간 동안 10 μ M의 심바스타틴(simvastatin)과 함께 처리하거나 단독으로 처리한 후, PCSK9 유전자의 mRNA 발현량을 확인한 도면이다.
- [25] 도 6은 HepG2 세포에, 1 내지 200 μ g/ml의 복분자 열수 추출물을 24시간 동안 10 μ M의 심바스타틴(simvastatin)과 함께 처리하거나 단독으로 처리한 후, 저밀도 지단백 수용체(low density lipoprotein receptor; LDLR)의 mRNA 발현량을 확인한 도면이다.
- [26] 도 7은 HepG2 세포에, 1 내지 200 μ g/ml의 복분자 열수 추출물을 24시간 동안 10 μ M의 심바스타틴(simvastatin)과 함께 처리하거나 단독으로 처리한 후, HMG-CoA 환원효소(HMG-CoA reductase)의 mRNA 발현량을 확인한 도면이다.
- [27] 도 8은 복분자 추출물 단독, 또는 이들을 스타틴계 화합물과 병용 처리하였을 때 세포의 LDL 유입(uptake)량 변화 분석결과를 나타낸 도면이다. *는 심바스타틴(simvastatin)을 단독 처리한 것에 대비한 심바스타틴 및 복분자 열수 추출물을 함께 처리한 것이 통계적으로 유의하다는 것을 의미하며, *는 p값이 0.05 미만임을 의미하고, #은 물질을 녹이는데 사용한 vehicle을 처리한 음성 대조군에 대비하여 복분자 추출물을 단독으로 처리한 것이 통계적으로 유의하다는 것을 의미하며, #은 p값이 0.05 미만임을 의미한다. \$\$는 물질을 녹이는데 사용한 vehicle을 처리한 음성 대조군에 대비하여 복분자 추출물을 단독으로 처리한 것이 통계적으로 유의하다는 것을 의미하며, \$\$는 p값이 0.01 미만임을 의미한다.
- [28] 도 9는 인간 PCSK9 유전자의 프로모터(약 1.5 kb) 리포터를 HepG2 세포에 일과성 형질도입하고 24시간 후, 복분자 열수 추출물의 헥산 분획물(Hx), 클로로포름 분획물(CHCl_3), 에틸아세테이트 분획물(EtAc), 부탄올 분획물(BuOH), 물 분획물(H_2O) 각각을 10, 50, 100 μ g/ml의 농도로 24시간 동안 처리하고, 루시퍼라아제 어세이를 실시한 결과이다. 양성대조군으로 베르베린(berberin, 20 μ M)을 사용하였고, 물질을 녹이는데 사용한 vehicle을 처리한 음성대조군(CON)을 기준으로 보정하였다. *, **은 물질을 녹이는데 사용한 vehicle을 처리한 음성 대조군에 대비하여 복분자 추출물의 각 분획물을 처리한 것이 통계적으로 유의하다는 것을 의미하며, *는 p값이 0.05 미만이고, **는 p값이 0.01 미만임을 의미한다.
- [29] 도 10은 HepG2 세포에, 100 μ g/ml의 복분자 열수 추출물의 헥산 분획물(Hx), 클로로포름 분획물(CHCl_3), 에틸아세테이트 분획물(EtAc), 부탄올 분획물(BuOH), 물 분획물(H_2O) 및 복분자 열수 추출물(BRE)을 24시간 동안 10 μ M의 심바스타틴(simvastatin)과 함께 처리한 후, PCSK9 유전자의 mRNA 발현량을 확인한 도면이다. CON은 음성대조군으로, 복분자 열수 추출물 또는 이의 분획물 대신에 vehicle을 처리한 것이다.

- [30] 도 11은 HepG2 세포에, 100 μ g/ml의 복분자 열수 추출물의 헥산 분획물(Hx), 클로로포름 분획물(CHCl_3), 에틸아세테이트 분획물(EtAc), 부탄올 분획물(BuOH), 물 분획물(H_2O) 및 복분자 열수 추출물(BRE)을 24시간 동안 10 μ M의 심바스타틴(simvastatin)과 함께 처리한 후, PCSK9 및 LDLR 단백질의 발현량을 웨스턴 블랏으로 확인한 도면이다. CON은 음성대조군으로, 복분자 추출물 또는 이의 분획물 대신에 vehicle을 처리한 것이며, -는 10 μ M의 심바스타틴만 처리한 것이고, β -actin은 로딩 컨트롤이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] 본 발명은 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하며, PCSK9 유전자의 발현을 감소시키거나, 저밀도 지단백 수용체(LDLR)를 증가시키기 위한 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 PCSK9 발현량의 감소시킴으로써 저밀도 지단백 수용체(LDLR)의 발현을 증가시키고, 결과적으로 혈중의 콜레스테롤 수치를 낮추는 것이므로, 비만, 제2형 당뇨병, 고혈압, 심장혈관 질환 또는 고지혈증 등의 대사성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물로 활용할 수 있다.
- [32] 또한, 본 발명은 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하며, 스타틴계 화합물에 의해 증가된 PCSK9 유전자의 발현을 감소시키거나, 스타틴계 화합물에 의해 감소된 저밀도 지단백 수용체(LDLR)를 증가시키기 위한 조성물에 관한 것이다.
- [33] 상기 스타틴계 화합물은 스타틴 계열의 화합물이라면 제한하지 않지만, 바람직한 일례로는 심바스타틴(simvastatin), 아토르바스타틴(atorvastatin), 세리바스타틴(cerivastatin), 로바스타틴(lovastatin), 피타바스타틴(pitavastatin), 로수바스타틴(rosuvastatin), 프라바스타틴(pravastatin), 플루바스타틴(fluvastatin) 및 메바스타틴(mevastatin) 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [34] 상기 복분자 추출물은 당 업계에 공지된 통상적인 추출용매를 사용할 수 있으나, 바람직한 추출용매의 일례로는 탄소 수 1 내지 4의 저급 알코올, 물 및 이들의 혼합물 중에서 선택된 하나 이상이며, 더 바람직하게는 물 또는 에탄올이고, 더욱더 바람직하게는 물이다. 상기 물을 이용하여 추출하는 열수 추출인 경우, 복분자 중량에 대하여 5 내지 10배 부피만큼 물을 넣고, 90 내지 110°C에서 2 내지 3시간 동안 가열하여 추출하는 것이다. 추출 용액을 여과지로 여과한 후, 동결건조하여 사용하는 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다. 또한, 에탄올 추출을 하는 경우, 복분자 중량에 대하여 5 내지 10배 부피만큼 80% 에탄올을 넣고, 20 내지 25°C의 상온에서 22 내지 24시간 동안 침지하여 추출하는 것이다. 추출 용액을 여과지로 여과한 후, 동결건조하여 사용하는 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.
- [35] 상기 복분자 열수 추출물의 분획물은 헥산 분획물(Hx), 클로로포름 분획물(CHCl_3), 에틸아세테이트 분획물(EtAc), 부탄올 분획물(BuOH) 및 물

분획물(H_2O) 중에서 선택한 어느 하나인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 클로로포름 분획물 또는 에틸아세테이트 분획물인 것이지만, 이에 한정하지 않는다.

[36] 또한, 본 발명은 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하며, PCSK9 유전자의 발현 감소 또는 저밀도 지단백 수용체(LDLR) 증가용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[37] 상기 건강기능식품은 특별히 제한되지 않으며, 건강기능식품, 영양보조제, 영양제, 파머푸드(pharmafood), 건강식품, 뉴트라슈티칼(nutraceutical), 디자인어 푸드, 식품 첨가제 등의 모든 형태의 식품이 될 수 있는데, 바람직하게는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 될 수 있다. 이때, 첨가하는 방법은 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용되고, 첨가량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[38] 상기 조성물은 유효성분 이외의 다양한 성분을 추가로 포함할 수도 있는데, 이들 다양한 성분은 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 될 수 있다. 또한, 기호성 또는 기능성을 부가하기 위하여 천연 과일 주스, 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있으며, 이들 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[39] 또한, 본 발명은 스타틴계 화합물 및 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 고콜레스테롤혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 상기 복분자 추출물 또는 이의 분획물은 PCSK9 유전자의 발현을 억제하거나 저밀도 지단백 수용체(LDLR)의 발현을 증가시키는 것이 특징이며, PCSK9 유전자의 발현 억제 또는 지단백 수용체의 발현 증가에 의해 콜레스테롤의 혈중 수치를 낮추는 것이므로, 비만, 제2형 당뇨병, 고혈압, 심장혈관 질환 또는 고지혈증 등의 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물로 활용할 수 있다.

[40] 상기 복분자 추출물은 당 업계에 공지된 통상적인 추출용매를 사용할 수 있으나, 바람직한 추출용매의 일례로는 탄소 수 1 내지 4의 저급 알코올, 물 및 이들의 혼합물 중에서 선택된 하나 이상이며, 더 바람직하게는 물 또는 에탄올이고, 더욱더 바람직하게는 물이다. 상기 물을 이용하여 추출하는 열수 추출인 경우, 복분자 중량에 대하여 5 내지 10배 부피만큼 물을 넣고, 90 내지 110°C에서 2 내지 3시간 동안 가열하여 추출하는 것이다. 추출 용액을 여과지로 여과한 후, 동결건조하여 사용하는 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다. 또한, 에탄올 추출을 하는 경우, 복분자 중량에 대하여 5 내지 10배 부피만큼 80% 에탄올을 넣고, 20 내지 25°C의 상온에서 22 내지 24시간 동안 침지하여 추출하는

것이다. 추출 용액을 여과지로 여과한 후, 동결건조하여 사용하는 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.

- [41] 상기 복분자 추출물의 분획물은 헥산 분획물(Hx), 클로로포름 분획물(CHCl_3), 에틸아세테이트 분획물(EtAc), 부탄올 분획물(BuOH) 및 물 분획물(H_2O) 중에서 선택한 어느 하나인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 클로로포름 분획물 또는 에틸아세테이트 분획물인 것이지만, 이에 한정하지 않는다.
- [42] 상기 스타틴계 화합물은 스타틴 계열의 화합물이라면 제한하지 않지만, 바람직한 일례로는 심바스타틴(simvastatin), 아토르바스타틴(atorvastatin), 세리바스타틴(cerivastatin), 로바스타틴(lovastatin), 피타바스타틴(pitavastatin), 로수바스타틴(rosuvastatin), 프라바스타틴(pravastatin), 플루바스타틴(fluvastatin) 및 메바스타틴(mevastatin) 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [43] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [44] 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 계면활성제, 결합제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [45] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여 방식으로 적용된다. 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 다양하게 처방될 수 있다.
- [46] 본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질 중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가로 포함할 수 있다.
- [47] 또한, 본 발명은 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 인간을 제외한 동물의 고콜레스테롤혈증의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물에 관한 것이다.
- [48] 본 발명의 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 수의학적 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의

복분자 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 수의학적 조성물에 포함될 수 있는 부형제 및 희석제로는, 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, 세탄올, 스테아릴알콜, 유동파라핀, 솔비탄모노스테아레이트, 폴리소르베이트 60, 메틸파라벤, 프로필파라벤 및 광물유를 들 수 있다.

- [49] 본 발명에 따른 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 수의학적 조성물은 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향신료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있는데, 본 발명에 의한 수의학적 조성물은 동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있고, 제형은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 용액, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀, 좌제, 멸균 주사용액, 멸균 외용제 등의 형태일 수 있다.
- [50] 본 발명에 의한 수의학적 조성물은 동물의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 0.1 내지 100mg/kg의 양을 1일 1회 내지 수회 투여할 수 있고, 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [51] 또한, 본 발명은 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 고콜레스테롤혈증의 예방 또는 개선용 사료 첨가제에 관한 것이다.
- [52] 상기 사료 첨가제는 20 내지 90중량%의 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 함유하는 고농축액, 분말 또는 과립형태일 수 있다.
- [53] 본 발명의 사료 첨가제는 구연산, 후발산, 아디픽산, 젯산, 사과산 등의 유기산이나 인산나트륨, 인산칼륨, 산성피로인산염, 폴리인산염(중합인산염) 등의 인산염이나 폴리페놀, 카테킨(catechin), 알파-토코페롤, 로즈메리 추출물(rosemary extract), 비타민 C, 녹차 추출물, 감초 추출물, 키토산, 탄닌산, 피틴산 등의 천연 항산화제 중에서 선택된 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [54] 본 발명의 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 함유하는 동물사료 첨가제 및 이를 포함하는 사료는 보조성분으로 아미노산, 무기염류, 비타민, 항생물질, 항균물질, 항산화, 항곰팡이 효소, 소화 및 흡수향상제, 성장촉진제, 질병예방제 등과 같은 물질과 함께 사용될 수 있다.
- [55] 상기 사료 첨가제는 동물에게 단독으로 식용 담체 중에서 다른 사료 첨가제와 조합되어 투여될 수 있다. 또한, 상기 사료첨가제는 탑 드레싱으로서 또는 이들을 동물 사료에 직접 혼합하거나 또는 사료와 별도로, 별도의 경구 제형으로, 주사 또는 경피로 또는 다른 성분과 조합하여 쉽게 투여할 수 있다. 통상적으로, 당 업계에 잘 알려진 바와 같이 단독 일일 투여량 또는 분할 일일 투여량을 사용할 수 있다. 상기 사료 첨가제를 동물 사료와 별도로 투여할 경우,

당 업계에 잘 알려진 바와 같이 추출물의 투여 형태는 이들을 비-독성 제약상 허용 가능한 식용 담체와 조합하여 즉석 방출 또는 서방성 제형으로 제조할 수 있다. 이러한 식용 담체는 고체 또는 액체, 예를 들어 옥수수 전분, 락토스, 수크로스, 콩 플레이크, 땅콩유, 올리브유, 참깨유 및 프로필렌 글리콜일 수 있다. 고체 담체가 사용될 경우, 추출물의 투여형은 정제, 캡슐제, 산제, 토로키제 또는 함당정제 또는 미분산성 형태의 탭 드레싱일 수 있다. 액체 담체가 사용될 경우, 연 젤라틴 캡슐제, 또는 시럽제 또는 액체 현탁액제, 에멀전제 또는 용액제의 투여 형태일 수 있다. 또한, 투여 형태는 보조제, 예를 들어 보존제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 용액 촉진제 등을 함유할 수 있다. 또한, 복분자 추출물 또는 이의 분획물이 사료 첨가제로 포함되는 동물사료는 동물의 식이 요구를 충족시키는데 통상적으로 사용되는 임의의 단백질-함유 유기 곡분일 수 있다. 이러한 단백질-함유 곡분은 통상적으로 옥수수, 콩 곡분 또는 옥수수/콩 곡분 믹스로 주로 구성되어 있다. 상기의 사료 첨가제는 침지, 분무 또는 혼합하여 상기 동물사료에 첨가하여 이용될 수 있다.

[56] 본 발명의 수의학적 조성물 또는 사료첨가제는 반려동물의 식이에 적용할 수 있다.

[57]

[58] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[59]

[60] 실시예 1. 간암 세포주(HepG2)의 배양

[61] 간암 세포주(HepG2)는 ATCC(American Type Culture Collection) 사에서 구입하여 사용하였다. 간암 세포주(HepG2)는 10% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신이 포함된 DMEM/F-12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) 배지로 배양하였다. 상기 세포는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였고, 배양된 세포는 24웰 플레이트에 일정한 수의 세포(1×10^5 cells/ 500 μ l well)를 분주하여 실험을 하였다. 24웰 플레이트에 세포를 분주한 후, 세포가 24웰에 완전히 붙어 세포의 모양을 갖춘 후 세포가 75%의 포화도(confluence)에 도달했을 때 사용하였다.

[62]

[63] 실시예 2. 복분자 추출물의 제조

[64] 1) 복분자 열수 추출물의 제조

[65] 복분자 200g에 대하여 2ℓ의 물을 가하고, 90 내지 100°C의 온도에서 2 내지 3시간 동안 가열 후, 추출물을 여과하였다. 이후에 감압농축기로 농축하고, 동결건조기를 이용하여 감압 건조하여 수득한 복분자 열수 추출물을 실험에 사용하기 위하여 10%(v/v) DMSO에 녹여 사용하였다.

[66]

[67] **2) 복분자 에탄올 추출물의 제조**

[68] 복분자 200g에 대하여 2ℓ의 80% 에탄올을 가하고, 20 내지 25°C의 상온에서 22 내지 24시간 동안 침지한 후, 추출물을 여과하였다. 이후에 감압 농축기로 농축하고 동결건조기를 이용하여 감압 건조하여 수득한 복분자 에탄올 추출물을 실험에 사용하기 위하여 10%(v/v) DMSO에 녹여 사용하였다.

[69]

[70] **실시예 3. 루시퍼라아제 어세이 시스템 구축**

[71] 도 1에 개시한 바와 같이, PCSK9 유전자의 발현량 변화를 확인하기 위해, 루시퍼라아제 어세이 시스템을 구축하고, 정상적으로 작동하는지 여부를 확인하였다.

[72] 인간 PCSK9 유전자의 프로모터(약 1.5kb)를 반딧불이 루시퍼라아제 리포터에 클로닝한 후, HepG2 세포에 일과성 형질도입(transient transfection)하고, 20μM의 베르베린(berberine)과 200μg/ml의 베르베린(berberine)을 포함하는 황련 열수추출물(*Coptis chinensis*)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후, 반딧불이 루시퍼라아제의 발광정도를 측정하여 결과를 도 2(A)에 개시하였다. PCSK9 유전자 발현을 억제하는 것으로 알려져 있는 베르베린(berberine, 20μM) 및 베르베린을 포함하는 황련 열수 추출물(*Coptis chinensis*, 200μg/ml)을 처리한 경우, PCSK9 유전자의 발현량이 물질을 녹이는데 사용한 vehicle을 처리한 음성대조군에 비해 현저하게 감소하는 것을 확인하였다.

[73] 또한, 인간 PCSK9 유전자의 유전자 발현을 조절한다고 알려져 있는 SREBP-1c 발현벡터를 리포터와 co-transfection하여 프로모터 활성이 증가하는 것을 확인함으로써, 본 발명에 사용된 루시퍼라아제 리포터 활성이 정상적으로 작동하고 있음을 알 수 있었다(도 2(B)).

[74] 이하 실시예에서는 본 실시예에서 구축한 루시퍼라아제 어세이 시스템을 이용하였다.

[75]

[76] **실시예 4. PCSK9 유전자의 프로모터 부위의 전사 활성의 변화를 이용한 스크리닝**

[77] 18종의 한약재 라이브러리 중에서 PCSK9 유전자의 발현량을 감소시킬 수 있는 한약재 추출물을 선별하기 위하여 루시퍼라아제 어세이를 실시하였다.

[78] 인간 PCSK9 프로모터(약 1.5kb)를 포함하는 루시퍼라아제 리포터(luciferase reporter)를 HepG2 세포에 일과성 형질도입(transient transfection) 후, 200μg/ml의 한약재 추출물 18종을 처리하고 하룻밤 동안 배양하였다. 이후, 반딧불이 루시퍼라아제 발광 정도를 측정하여 PCSK9 유전자의 발현을 감소시키는 한약재 추출물을 선정하였다. 선정된 #24의 한약재 추출물은 열수 및 에탄올 추출물 둘 다에서 효과적으로 PCSK9 유전자의 발현량을 감소시킨다는 것을 도 3 및 도 4에 개시하였다.

- [79] 도 3 및 도 4에 개시한 #24의 한약제 추출물은 복분자 추출물로 확인되었다.
- [80]
- [81] 실시예 5. 복분자 추출물 단독, 또는 스타틴계 화합물과 병용 처리되었을 때의 **PCSK9, LDLR 및 HMG-CoA reductase** 유전자의 발현량 변화 분석
- [82] 실시예 4에서 실시한 루시퍼라아제 어세이 스크리닝 결과를 확인하기 위하여 taqman probe를 활용한 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR)를 이용하여 복분자 추출물 단독 또는 스타틴계 화합물과 복분자 열수 추출물이 처리되었을 때의 PCSK9, LDLR 및 HMG-CoA reductase 유전자의 발현량 변화를 분석하였다.
- [83] 100 및 200 μ g/ml의 복분자 추출물을 단독 혹은 10 μ M의 심바스타틴과 0, 1, 10, 50, 100 및 200 μ g/ml의 복분자 추출물 혹은 베르베린(berberine, 20 μ M)을 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 이후 세포로부터 total RNA를 분리하고 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 이용해 cDNA를 합성하고, taqman probe를 활용한 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR)을 통해 PCSK9, LDLR 및 HMG-CoA reductase 유전자의 발현량 변화를 분석하였다.
- [84] 10 μ M의 심바스타틴만을 처리하였을 때, PCSK9 유전자의 발현이 증가하였고(도 5), HMG-CoA 환원효소 유전자의 발현이 증가한 것을 확인하였다. 하지만 복분자 추출물 단독 혹은 심바스타틴과 복분자 추출물을 병용 처리했을 때는 PCSK9 유전자의 발현은 감소하였고(도 5), LDLR의 발현은 증가하였으며(도 6), HMG-CoA 환원효소 유전자의 발현은 감소하는 것을 확인하였다(도 7). 본 실시예에서의 양성 대조군은 20 μ M의 베르베린(berberine)을 사용하였으며, 본 발명의 심바스타틴과 복분자 추출물을 병용처리했을 때가 베르베린 처리보다 효과적이라는 것을 확인할 수 있었다.
- [85]
- [86] 실시예 6. 복분자 추출물 단독, 또는 스타틴계 화합물과 병용 처리되었을 때의 세포의 **LDL 유입(uptake)**량 변화 분석
- [87] 실시예 4와 5의 결과로부터, 본 발명에서 제공하는 실시예 2의 PCSK9의 발현 억제와 LDLR 발현 증가 효과를 나타냄을 확인하였으므로, 이러한 효과가 세포의 LDL에 대한 흡수 수준의 변화에 영향을 미치는지를 확인하고자 형광-표지된 LDL(fluorescently-labeled LDL)을 활용하여 복분자 추출물 단독 혹은 스타틴계 화합물과 병용 처리되었을 때의 세포의 LDL uptake량 변화 분석을 실시하였다.
- [88] 구체적으로, 96웰 흰색 투명바닥 세포배양 플레이트(white clear-bottom cell culture plate)에 3~4 $\times$ 10⁴ cells/웰로 분주하고(FBS 포함 media), 24시간 배양 후, Serum-free media로 교환하여 24시간 기아상태(starvation)로 나눴다. 기아상태(starvation) 후, media 제거하고 세척을 (어세이 완충용액으로 웰 당 100 μ l씩) 3회 실시하였다. 각 웰당 10 μ l의 형광 표지된(fluorescently-labeled) LDL 및 90 μ l의 serum-free media를 분주하고, 24시간 동안 처리하였다. LDL 흡수의

특이성을 확인하기 위해, 10 μ l의 형광 표지하지 않은(unlabeled; UN) LDL을 웰에 처리하였다(UL-LDL, compete out the signal). 24시간 추가배양 후, 세척을 4회 실시하였고, 이후 어세이 완충용액을 웰당 100 μ l씩 분주하고, 유세포 분석기에 적용하여 각 세포에서 발현하는 형광을 측정(Ex/Em=540nm/575nm)하였고, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

- [89] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, HepG2 세포에서 복분자 추출물 단독 혹은 심바스타틴과 복분자 추출물을 병용 처리했을 때는 LDL의 유입을 통계적으로 유의하게 증가시키는 결과를 나타내었다.

[90]

- [91] 실시예 7. 용매의 극성에 따른 복분자 열수 추출물의 분획물 제조

- [92] 복분자 열수 추출물에 존재하는 다량의 화합물 중에서 물리화학적 성질이 유사한 화합물 군끼리 분류하기 위하여 보편적으로 이용되는 분획방법인 용매분획법을 이용하여 분획하였다.

- [93] 용매분획법은 서로 섞이지 않는 용매 사이의 분배(solvent partition)를 이용한 방법으로 대표적인 분배의 예로는 물과 헥산(hexane), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(butanol), 물과 클로로포름(chloroform)으로 이루어지는 분획법이다.

- [94] 이에, 본 발명에서는 복분자 열수 추출물에 n-헥산(n-hexane), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(butanol) 용매를 물과 동량으로 첨가한 후, 계통적으로 분획하여 각각의 용매별로 감압 농축하였다.

- [95] 그 결과, 0.66g의 n-헥산(n-hexane) 분획물, 0.08g의 클로로포름(chloroform) 분획물, 0.3g의 에틸아세테이트(ethyl acetate) 분획물, 5.0g의 부탄올(butanol) 분획물 및 7.88g의 물 분획물을 획득하였다.

[96]

- [97] 실시예 8. 복분자 열수 추출물의 분획물을 이용한 PCSK9 유전자의 프로모터 부위의 전사 활성 확인

- [98] 상기 실시예 7에서 획득한 각 분획물을 이용하여 PCSK9 프로모터(promoter) 활성 스크리닝 효능평가를 실시하였다.

- [99] 본 발명의 복분자 열수 추출물의 n-헥산(Hx) 분획물, 클로로포름(CHCl_3) 분획물, 에틸아세테이트(EtAc) 분획물, 부탄올(BuOH) 분획물 및 물 분획물(H_2O)을 이용하여 인간 PCSK9 프로모터 활성화에 미치는 영향을 루시퍼라아제 리포터 어세이를 수행하였다.

- [100] 상기 각각의 분획물을 농도별로 처리하였을 때, 다른 분획물에 비해 클로로포름 분획물과 에틸아세테이트 분획물에서 조금 더 낮은 농도에서 인간 PCSK9 프로모터 리포터의 활성을 억제하는 것을 확인하였다(도 9).

[101]

- [102] 실시예 9. 복분자 열수 추출물의 분획물을 이용한 스타틴계 화합물과 병용 처리

시, **PCSK9** 유전자의 발현량 변화 분석

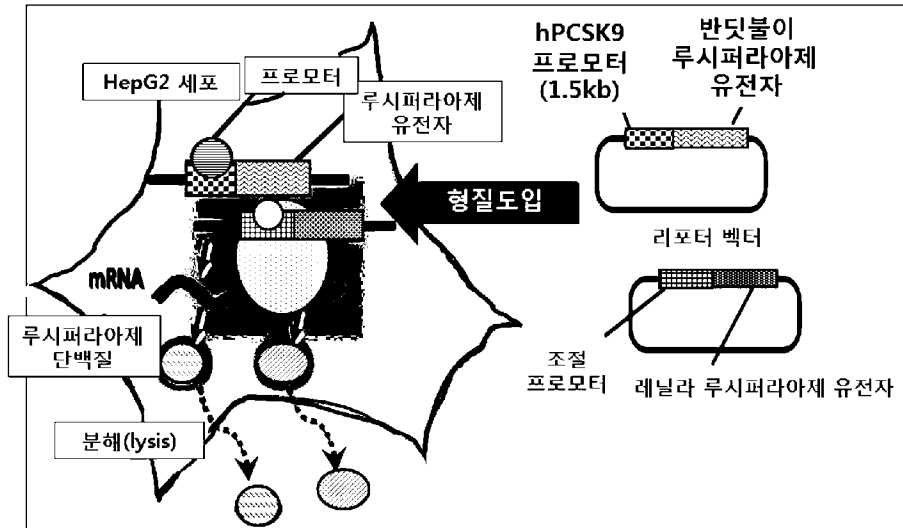
- [103] 상기 실시예 7에서 실시한 루시퍼라아제 어세이를 이용한 스크리닝 결과를 확인하기 위하여, 택맨-프로브를 활용한 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR)를 이용하여 복분자 열수 추출물의 분획물과 스타틴계 화합물을 병용처리했을 때의 **PCSK9** 유전자의 변화를 분석하였다.
- [104] 10 μ M의 심바스타틴과 100 μ g/ml의 복분자 열수 추출물의 분획물을 각각 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 이후 세포로부터 total RNA를 분리하고 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)을 이용해 cDNA를 합성하고, 택맨 프로브(taqman probe)를 활용한 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR)을 수행하여 **PCSK9** 유전자의 발현량을 확인하였다.
- [105] 10 μ M의 심바스타틴만을 처리하였을 때, **PCSK9** 유전자의 발현이 증가하였지만, 복분자 열수 추출물 분획물 중에서 CHCl_3 분획물과 EtAc 분획물을 심바스타틴과 병용 처리했을 때는 **PCSK9** 유전자의 발현이 감소하였다(도 10). 본 실시예 9에서는 양성 대조군으로 복분자 열수 추출물(BRE)을 사용하였으며, 10 μ M의 심바스타틴과 복분자 열수 추출물, CHCl_3 분획물 및 EtAc 분획물을 병용처리했을 때가 효과적이라는 것을 확인할 수 있었다.
- [106]
- [107] 실시예 10. 복분자 열수 추출물의 분획물을 이용한 스타틴계 화합물과 병용 처리 시, **PCSK9** 및 **LDLR** 단백질의 발현량 변화 분석
- [108] 복분자 열수 추출물의 분획물 및 복분자 열수 추출물(BRE)의 처리에 따른 mRNA의 발현양상이 단백질의 발현 수준에서도 조절되는지를 확인하기 위하여, 웨스턴 블랏 분석을 통해 10 μ M의 심바스타틴과 복분자 열수 추출물의 분획물의 병용처리에 의한 **PCSK9** 및 **LDLR**의 단백질 발현 양상을 확인하였다.
- [109] 10 μ M의 심바스타틴의 처리에 의해 **PCSK9** 단백질의 발현이 증가되는 것을 확인하였고, 심바스타틴과 본 발명의 복분자 열수 추출물의 클로로포름 분획물(CHCl_3) 및 에틸아세테이트 분획물(EtAc) 및 물 분획물(H_2O)을 병용처리한 경우, **PCSK9**의 발현량을 감소하였으며, **LDLR** 단백질의 발현은 증가된 것을 확인하였다(도 11).

청구범위

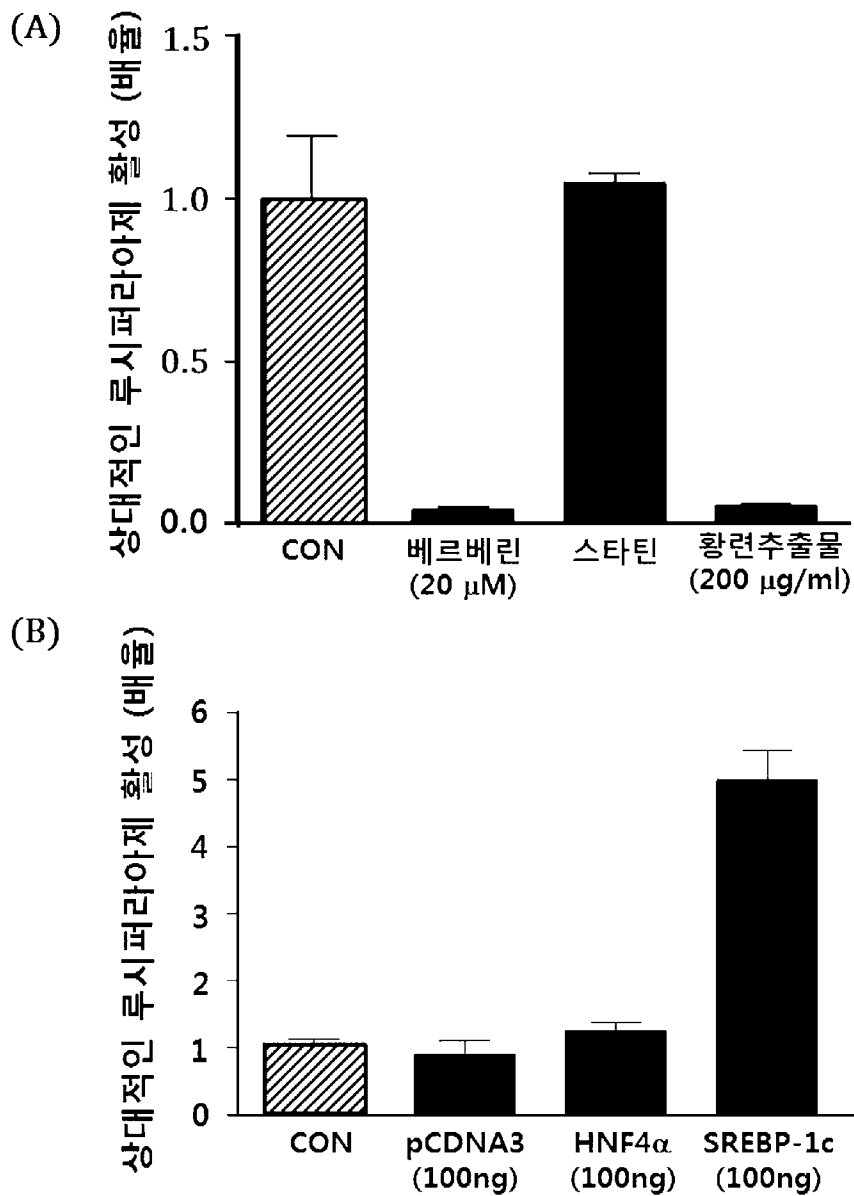
- [청구항 1] 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하며, PCSK9 유전자의 발현을 감소시키거나, 저밀도 지단백 수용체(LDLR)를 증가시키기 위한 조성물.
- [청구항 2] 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하며, 스타틴계 화합물에 의해 증가된 PCSK9 유전자의 발현을 감소시키거나, 저밀도 지단백 수용체(LDLR)를 증가시키기 위한 조성물.
- [청구항 3] 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하며, PCSK9 유전자의 발현 감소 또는 저밀도 지단백 수용체(LDLR) 증가용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 복분자 추출물의 용매는 탄소 수 1 내지 4의 저급 알코올, 물 및 이들의 혼합물 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 복분자 추출물의 분획물은 에틸아세테이트 분획물 또는 클로로포름 분획물인 것을 특징으로 하는 건강기능 식품 조성물.
- [청구항 6] 제3항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 추가로 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 중진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 중점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 및 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 중에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.
- [청구항 7] 스타틴계 화합물 및 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하며, PCSK9 유전자의 발현을 감소시키거나, 저밀도 지단백 수용체(LDLR)를 증가시키는 것을 특징으로 하는 고콜레스테롤혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 스타틴계 화합물은 심바스타틴(simvastatin), 아토르바스타틴(atorvastatin), 세리바스타틴(cerivastatin), 로바스타틴(lovastatin), 피타바스타틴(pitavastatin), 로수바스타틴(rosuvastatin), 프라바스타틴(pravastatin), 플루바스타틴(fluvastatin) 및 메바스타틴(mevastatin) 중에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 고콜레스테롤혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 복분자 추출물의 용매는 탄소 수 1 내지 4의 저급 알코올, 물 및 이들의 혼합물 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 고콜레스테롤혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 10] 제7항에 있어서, 상기 복분자 추출물의 분획물은 에틸아세테이트 분획물 또는 클로로포름 분획물인 것을 특징으로 하는 고콜레스테롤혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

- [청구항 11] 제7항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 추가로 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 것을 특징으로 하는 고콜레스테롤혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 12] 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 인간을 제외한 동물의 고콜레스테롤혈증의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물.
- [청구항 13] 복분자 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 고콜레스테롤혈증의 예방 또는 개선용 사료 첨가제.

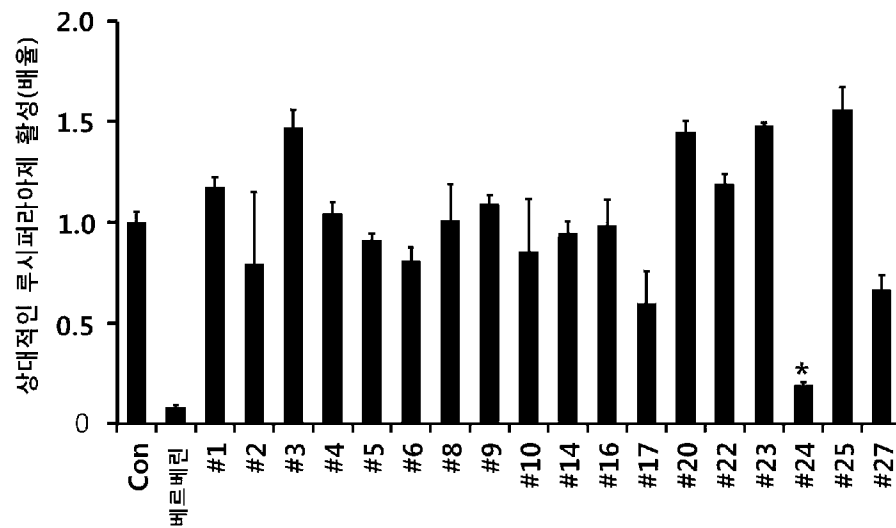
[도1]



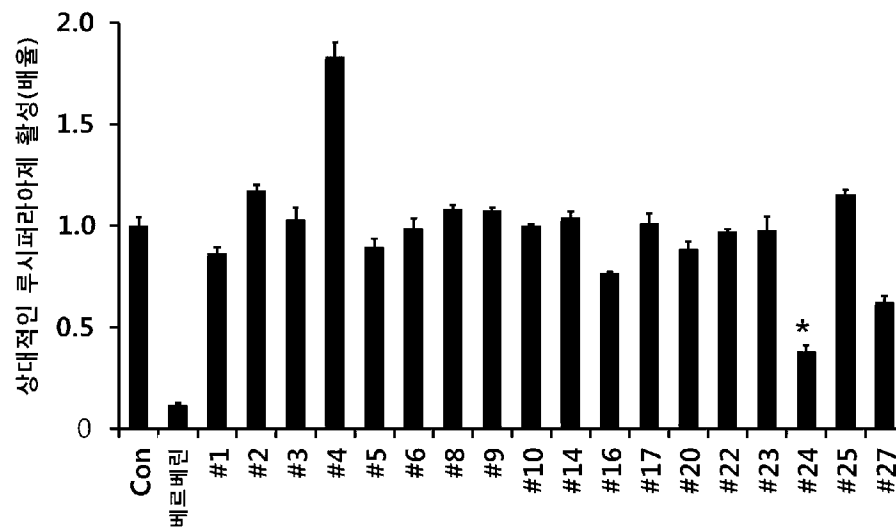
[도2]



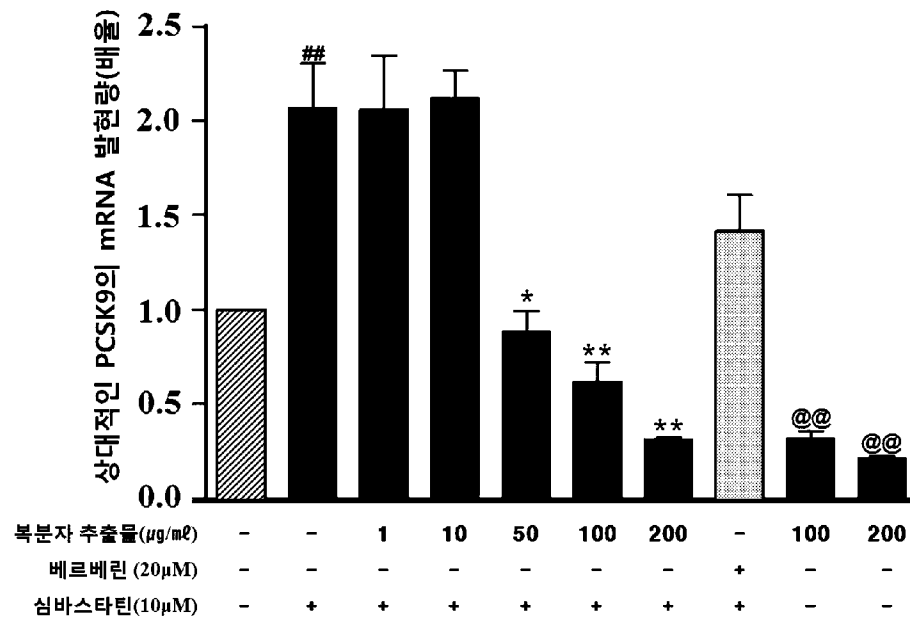
[도3]



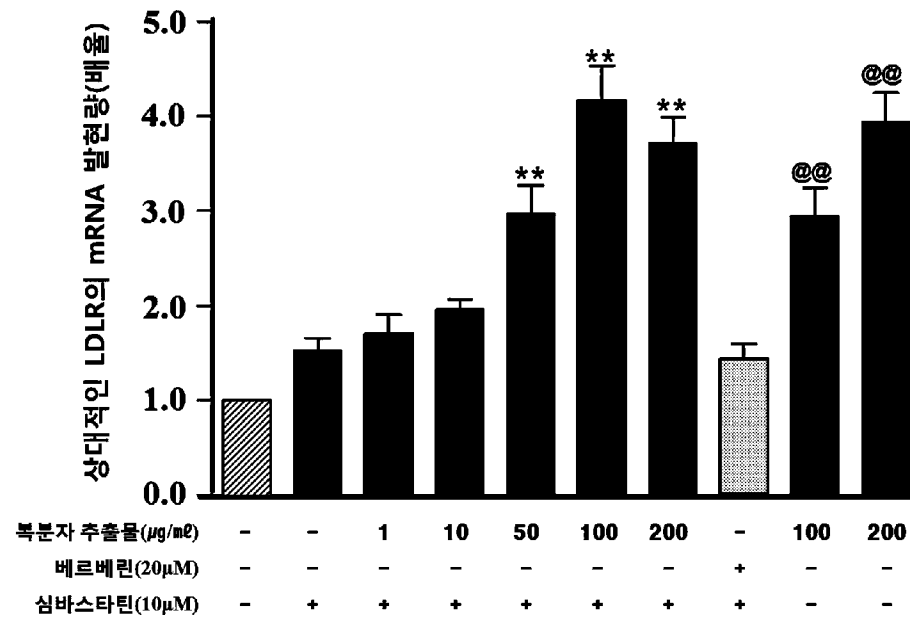
[도4]



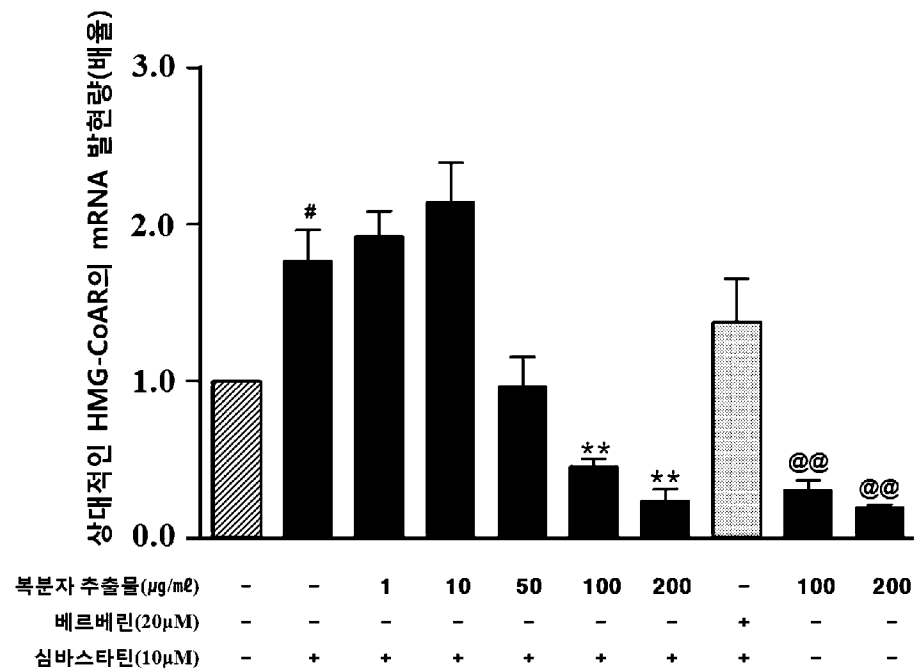
[도5]



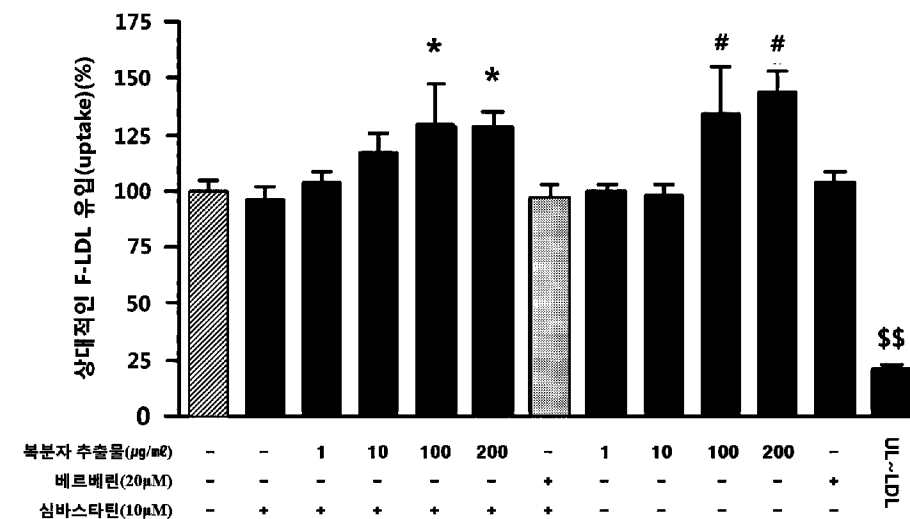
[도6]



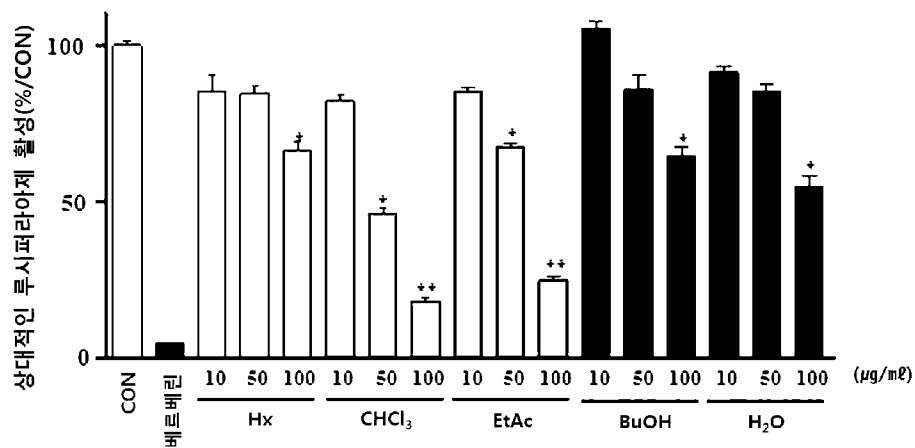
[도7]



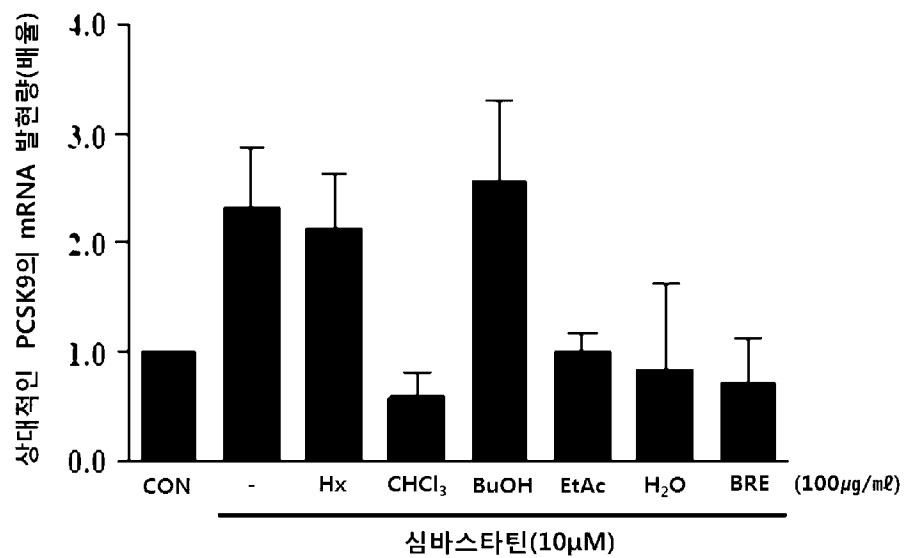
[도8]



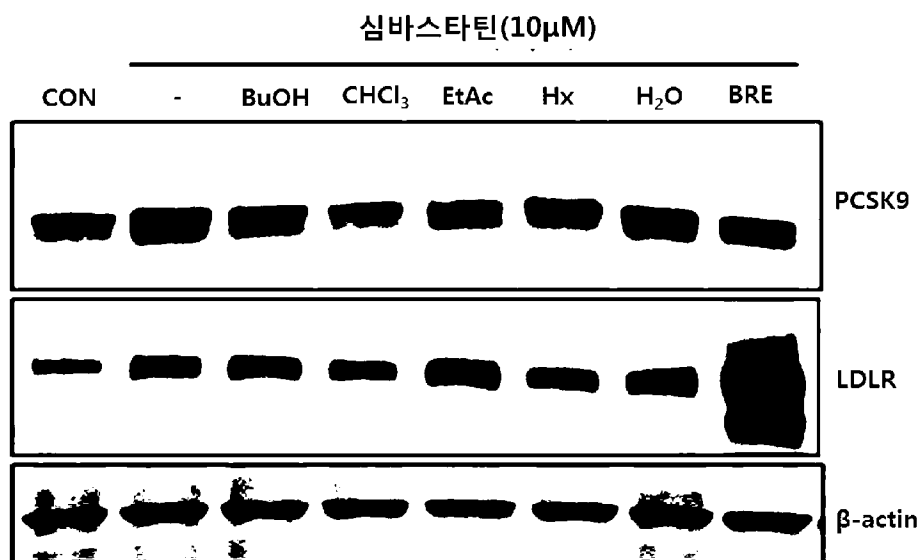
[도9]



[도10]



[도11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/013365**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***A23L 33/10(2016.01)i, A61K 36/73(2006.01)i, A61K 31/366(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)

A23L 33/10; A61K 36/82; A61K 36/86; A61K 36/73; A61P 7/00; A61K 36/234; A61K 36/258; A61K 31/366

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: raspberry extract, PCSK9, low density lipoprotein receptor, hypercholesterolemia

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014-003352 A1 (LEE S BIO TECH. CO., LTD.) 03 January 2014 See claims 1 and 7-8; page 27, lines 6-27.	12-13
A		1-11
X	KR 10-2011-0130969 A (KOREA FOOD RESEARCH INSTITUTE) 06 December 2011 See claim 1; paragraph [0015].	12-13
X	KR 10-2011-0116409 A (CHAM SUN JIN TOTAL FOOD CO., LTD. et al.) 26 October 2011 See claim 1; paragraphs [0014] and [0017].	12-13
X	KR 10-2014-0140674 A (AGRICULTURE GOCHANG BOKBUNJA CORP. et al.) 10 December 2014 See claims 1-2; abstract.	12-13
X	KR 10-2014-0141845 A (AGRICULTURE GOCHANG BOKBUNJA CORP.) 11 December 2014 See claims 1-2.	12-13



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

11 MARCH 2016 (11.03.2016)

Date of mailing of the international search report

14 MARCH 2016 (14.03.2016)

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
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/013365

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2014-003352 A1	03/01/2014	KR 10-2014-0002453 A KR 10-2014-0002493 A	08/01/2014 08/01/2014
KR 10-2011-0130969 A	06/12/2011	KR 10-1173172 B1	14/08/2012
KR 10-2011-0116409 A	26/10/2011	KR 10-1158739 B1	22/06/2012
KR 10-2014-0140674 A	10/12/2014	NONE	
KR 10-2014-0141845 A	11/12/2014	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A23L 33/10(2016.01)i, A61K 36/73(2006.01)i, A61K 31/366(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A23L 33/10; A61K 36/82; A61K 36/86; A61K 36/73; A61P 7/00; A61K 36/234; A61K 36/258; A61K 31/366

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: 복분자 추출물, PCSK9, 저밀도 지단백 수용체, 고콜레스테롤혈증

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2014-003352 A1 (쥘리즈바이오텍) 2014.01.03 청구항 1 및 7-8; 페이지 27, 라인 6-27 참조.	12-13
A		1-11
X	KR 10-2011-0130969 A (한국식품연구원) 2011.12.06 청구항 1; 단락 [0015] 참조.	12-13
X	KR 10-2011-0116409 A (주식회사 참선진 종합식품 등) 2011.10.26 청구항 1; 단락 [0014] 및 [0017] 참조.	12-13
X	KR 10-2014-0140674 A (재단법인 고창복분자연구소 등) 2014.12.10 청구항 1-2; 요약 참조.	12-13
X	KR 10-2014-0141845 A (재단법인 고창복분자연구소) 2014.12.11 청구항 1-2 참조.	12-13

☐ 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 03월 11일 (11.03.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 03월 14일 (14.03.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

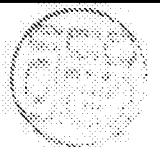
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

이동욱

전화번호 +82-42-481-8163



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2014-003352 A1	2014/01/03	KR 10-2014-0002453 A KR 10-2014-0002493 A	2014/01/08 2014/01/08
KR 10-2011-0130969 A	2011/12/06	KR 10-1173172 B1	2012/08/14
KR 10-2011-0116409 A	2011/10/26	KR 10-1158739 B1	2012/06/22
KR 10-2014-0140674 A	2014/12/10	없음	
KR 10-2014-0141845 A	2014/12/11	없음	