



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0056367  
(43) 공개일자 2020년05월22일

- |   |  |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/><i>A61K 31/352</i> (2006.01) <i>A23L 33/10</i> (2016.01)<br/><i>A61P 3/04</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/><i>A61K 31/352</i> (2013.01)<br/><i>A23L 33/10</i> (2016.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-0057457(분할)<br/>(22) 출원일자 2020년05월14일<br/>심사청구일자 2020년05월14일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2018-0032425<br/>원출원일자 2018년03월21일<br/>심사청구일자 2018년03월21일</p> | <p>(71) 출원인<br/>경북대학교 산학협력단<br/>대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교)</p> <p>(72) 발명자<br/>남주욱<br/>대구광역시 수성구 범어천로 200, 205동 1902호(범어동, 범어월드메르디앙 웨스턴 카운티)</p> <p>이슬기<br/>경기도 의왕시 오전로 179, 104동 1106호(오전동, 백합아파트)</p> <p>김진수<br/>대구광역시 북구 동북로50길 8 (북현동)</p> <p>(74) 대리인<br/>이명진</p> |
|---|--|

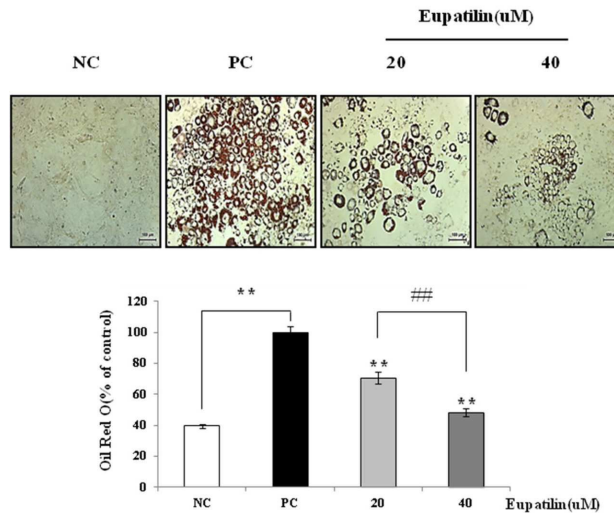
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **유파틸린을 유효성분으로 포함하는 비만 예방, 치료, 또는 개선용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 유파틸린을 포함하는 비만 예방, 치료, 또는 개선용 조성물에 관한 것으로, 상기 유파틸린은 지방세포의 분화를 억제하고 세포 내 지질 축적을 감소시키는 효과가 있다. 또한, 지방세포 형성 및 분화에 관여하는 전사인자인 퍼옥시좀 증식제 활성화 수용체 감마(PPAR $\gamma$ ) 및 CCAAT-인핸서 결합 단백질 알파(C/EBP $\alpha$ )와 아디포넥틴의 발현을 억제시켜 지방 생성을 억제함으로써 뛰어난 항비만 효과를 나타내었다. 따라서, 본 발명의 유파틸린은 비만 예방, 치료, 또는 개선용 약학적 조성물 및 건강기능식품 등으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3a



(52) CPC특허분류

**A61P 3/04** (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/332 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

유파틸린을 유효성분으로 포함하는, 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 지방세포의 분화를 억제하는 것을 특징으로 하는, 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 세포 내 지질 축적을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 지방세포 형성 및 분화에 관여하는 전사인자 또는 아디포넥틴의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는, 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 전사인자는 퍼옥시좀 증식제 활성화 수용체 감마(PPAR  $\gamma$ ) 또는 CCAAT-인핸서 결합 단백질 알파(C/EBP  $\alpha$ )인 것을 특징으로 하는, 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 6

유파틸린을 유효성분으로 포함하는, 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

#### 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 조성물은 지방세포의 분화를 억제하는 것을 특징으로 하는, 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

#### 청구항 8

제6항에 있어서,

상기 조성물은 세포 내 지질 축적을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

물.

**청구항 9**

제6항에 있어서,

상기 조성물은 지방세포 형성 및 분화에 관여하는 전사인자 또는 아디포넥틴의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는, 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

**청구항 10**

제9항에 있어서,

상기 전사인자는 퍼옥시좀 증식제 활성화 수용체 감마(PPAR  $\gamma$ ) 또는 CCAAT-인핸서 결합 단백질 알파(C/EBP  $\alpha$ )인 것을 특징으로 하는, 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 유파틸린을 유효성분으로 포함하는 비만 예방, 치료, 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 비만은 일반적으로 체내에 지방조직이 과다한 상태인 것을 의미하며, 음식물로 섭취한 에너지가 신체활동 등으로 소비한 에너지와 균형을 이루지 못하여 잉여의 에너지가 체지방으로 축적되는 현상이다. 비만은 유전적인 요인, 불규칙한 식습관이나 운동부족 또는 서구화되는 식생활에 의한 환경적인 영향, 우울감, 지루감, 과다한 스트레스에 의한 심리적인 영향, 갑상선이나 부신피질 호르몬 변화에 의한 병적인 요인 등 매우 다양한 원인에 의해 유발되는 것으로 알려져 있다. 최근에는 경제성장과 생활방식의 변화에 따라 식습관에도 많은 변화가 생겨 바쁜 현대인들은 패스트푸드 등의 고열량 식이와 적은 운동량으로 인하여 과체중 및 비만이 증가하고 있는 추세이다.

[0004] 또한, 비만은 지방세포의 비대에 의해 유발되므로, 지방세포 분화의 억제는 비만 치료에 도움이 될 수 있다 (Henninger, Eliasson, Jenndahl, & Hammarstedt, 2014). 종래에 지방세포 분화 및 지질 축적의 억제와 관련된 항비만 연구가 보고된 바 있으며(Kim & Lee, 2017; Li et al., 2017), 이 때 3T3-L1 마우스 섬유아세포는 지방 전구세포의 분화를 위한 잘 특성화된 모델로 일반적으로 시험관 내 연구에 사용된다(Kaestner et al., 1989; S. K. Kim & Kong, 2010).

[0005] 비만은 그 자체의 위험성보다 비만으로 인해 유발될 수 있는 여러 합병증 때문에 그 심각성이 더욱 크게 인식되고 있는데, 오랜 시간에 걸쳐 에너지 불균형에 의해 체지방이 비정상적으로 많아지면 당뇨, 고지혈증, 심장병, 뇌졸중, 동맥경화증, 지방간 등의 각종 대사성 질환과 성인병이 유발된다. 더불어 비만은 신체적인 질환뿐만 아니라 사회적 고립감이나 소외, 자신감 결여, 우울감과 같은 정신적 질환을 유발할 수 있어, 이는 서구에서뿐만 아니라 우리나라에서도 심각한 사회문제로 대두되고 있으며 비만의 예방 및 치료에 대한 필요성이 매우 중요하게 인식되고 있다.

[0006] 비만은 식이요법, 규칙적인 운동과 더불어 행동요법과 같은 생활습관의 개선, 및 식욕 억제제와 지방 흡수 억제제와 같은 약물을 통해 치료할 수 있다. 비만은 만성 질환이기 때문에 약물치료를 시도하는 경우 장기간의 사용이 필요하며, 현재 국내에서 3개월 이상 장기간 사용이 허가된 제품으로는 식욕억제제인 시부트라민(sibutramine)과 지방분해효소 억제제인 올리스타트(orlistat)가 있다. 그러나 이러한 비만 치료 약물들은 대부분 중추신경계에 작용하여 식욕을 조절하는 항정신성의약품들이므로 두통 및 구토 등의 부작용을 동반하며 남용 우려 등의 문제점이 있다. 따라서 상기 시판중인 항비만제의 부작용을 해결할 수 있는 안정성이 높고 항비만 효

과가 우수한 소재를 개발하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

- [0007] 한편, 유파틸린(Eupatilin)은 *Artemisia* 속의 주요 플라보노이드 계열의 화합물로, 종래에 항암, 항산화 효과를 가진다고 알려져 있으며, 항위염 및 항궤양 효과를 나타내 위장질환 치료제로서의 효용성에 대해서도 밝혀진 바 있으나(한국등록특허 제 127777호 참조), 유파틸린의 항비만 효과에 대해서는 아직 잘 알려진 바가 없다.
- [0008] 이에, 본 발명자들은 상기 유파틸린이 3T3-L1 지방세포에서 지방생성을 억제함으로써 뛰어난 항비만 효과를 나타냄을 확인하여 비만 예방, 치료, 또는 개선용 조성물로 사용될 수 있도록 하였다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

- [0010] 본 발명자들은 종래 항비만제의 문제점을 해결할 수 있는 안정성이 높고 항비만 효과가 우수한 비만 예방 또는 치료용 조성물을 개발하고자 노력한 결과, 본 발명의 유파틸린이 뛰어난 항비만 효과를 가지는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0011] 이에, 본 발명은 유파틸린을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 유파틸린을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0013] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

#### 과제의 해결 수단

- [0015] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 유파틸린을 유효성분으로 포함하는, 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 유파틸린을 유효성분으로 포함하는, 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일구현예로서, 상기 조성물은 지방세포의 분화를 억제할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 다른 일구현예로서, 상기 조성물은 세포 내 지질 축적을 감소시킬 수 있다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 일구현예로서, 상기 조성물은 지방세포 형성 및 분화에 관여하는 전사인자 또는 아디포넥틴의 발현을 억제할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 일구현예로서, 상기 전사인자는 퍼옥시좀 증식제 활성화 수용체 감마(PPAR  $\gamma$ ) 또는 CCAAT-인핸서 결합 단백질 알파(C/EBP  $\alpha$ )일 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 비만 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 조성물의 비만 예방 또는 치료용도를 제공한다.

#### 발명의 효과

- [0024] 본 발명에 따른 유파틸린은 지방세포의 분화를 억제하고 세포 내 지질 축적을 감소시키는 효과가 있으며, 지방세포 형성 및 분화에 관여하는 전사인자인 퍼옥시좀 증식제 활성화 수용체 감마(PPAR  $\gamma$ ) 및 CCAAT-인핸서 결합 단백질 알파(C/EBP  $\alpha$ )와 아디포넥틴의 발현을 억제시켜 지방 생성을 억제함으로써 항비만 효과가 뛰어난 효과를 나타내었는바, 본 발명의 유파틸린은 비만 예방, 치료, 또는 개선용 약학적 조성물 및 건강기능식품 등 다양한 방법으로 이용될 것으로 기대된다.

**도면의 간단한 설명**

- [0026] 도 1은 본 발명의 일구현예에 따른 유과틸린을 처리한 3T3-L1 지방전구세포에서의 세포 생존능 측정 결과를 MTT 분석에 의해 나타낸 도면이다.
- 도 2는 본 발명의 일구현예에 따른 유과틸린을 처리한 3T3-L1 지방전구세포, 음성 대조군(NC), 및 양성 대조군(PC)의 세포모양을 400x 배율의 현미경을 사용하여 관찰한 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 3a는 본 발명의 일구현예에 따른 유과틸린을 처리한 3T3-L1 지방전구세포에서 Oil Red O 염색한 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 3b는 본 발명의 일구현예에 따른 유과틸린을 처리한 3T3-L1 지방세포 내 Triglyceride(TG)의 함량을 측정하여 나타낸 도면이다.
- 도 4a는 본 발명의 일구현예에 따른 3T3-L1 지방세포에서 유과틸린의 처리에 의한 PPAR  $\gamma$ , C/EBP  $\alpha$ , 및 아디포넥틴의 mRNA 발현량을 나타낸 도면이다.
- 도 4b는 본 발명의 일구현예에 따른 3T3-L1 지방세포에서 유과틸린의 처리에 의한 PPAR  $\gamma$ , C/EBP  $\alpha$ , 및 아디포넥틴 단백질의 발현량을 나타낸 도면이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0027] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0029] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0030] 본 발명은 유과틸린을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 예방 또는 치료 대상 질병인 "비만(obesity)"은, 대사 장애로 인하여 체내에 지방세포가 증식 분화하고 이로 인하여 지방이 과잉으로 축적된 상태를 의미하며, 고혈압, 당뇨, 및 이상지질혈증 등을 동반하는 대사 증후군을 포함하는 관련 합병증을 유발할 수 있다. 에너지 흡수량이 소비량에 비해 상대적으로 증가하는 경우, 지방세포의 수와 부피가 증가되는 과정을 거쳐 결과적으로 지방조직의 질량이 증가된다.
- [0032] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 비만을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0033] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 비만에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0034] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 비만 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0035] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0036] 본 발명에서 사용되는 용어 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는, 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0037] 본 발명에 따른 유과틸린은 지방세포의 분화를 억제시키고, 지방세포 내 지질 축적을 감소시킬 수 있다. 또한, 지방세포 형성 및 분화에 관여하는 전사인자 또는 아디포넥틴의 발현을 억제할 수 있다. 이 때, 상기 전사인자는 퍼옥시좀 증식제 활성화 수용체 감마(PPAR  $\gamma$ ) 또는 CCAAT-인핸서 결합 단백질 알파(C/EBP  $\alpha$ )일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 본 발명의 일실험예에서는, 3T3-L1 지방세포의 분화기간 동안 유과틸린을 처리 후 현미경을 통해 관찰한 결과, 유과틸린이 농도의존적으로 3T3-L1 지방세포의 분화를 강력하게 억제하는 것을 확인하였다(실시예 2 및 도 2 참

조).

- [0039] 본 발명의 다른 일실험예에서는, 3T3-L1 지방세포에서 Oil red O staining 실험기법을 이용하여 지질염색을 한 결과, 유파틸린을 처리한 3T3-L1 지방세포 내의 지방방울(lipid droplet) 및 중성지방(Triglyceride, TG)의 축적량은 완전 분화된 지방세포인 양성대조군(PC)에 비해 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(실시예 3 및 도 3a-b 참조).
- [0040] 본 발명의 또 다른 일실험예에서는, 유파틸린을 처리한 3T3-L1 지방세포에서 분리한 RNA를 cDNA로 합성한 후 RT-PCR을 진행한 결과, 유파틸린이 PPAR  $\gamma$ , C/EBP  $\alpha$ , 및 아디포넥틴의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였다(실시예 4-1 및 도 4a 참조).
- [0041] 또한, 유파틸린을 처리한 3T3-L1 지방세포에서 단백질 발현을 분석한 결과, 유파틸린은 PPAR  $\gamma$ , C/EBP  $\alpha$ , 및 아디포넥틴 단백질 발현을 억제시키는 것을 확인하였다(실시예 4-2 및 도 4b 참조).
- [0042] 지방 세포의 분화는 PPAR  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) 및 C/EBP  $\alpha$  (CCAAT-enhancer-binding protein alpha)와 같은 다양한 전사인자 발현의 변화에 의해 조절된다(Yoo, Seo, Shin, & Jeong, 2015).
- [0043] 이 때, 상기 PPAR  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)는 세포신호 경로에 중요한 요소이며 당대사와 지방세포형성과 관련된 전사인자를 조절한다고 알려져 있다. PPAR  $\gamma$ 는 지방세포에서 PPAR  $\gamma$ 1 및 PPAR  $\gamma$ 2의 형태로 발현하는데, PPAR  $\gamma$ 2는 PPAR  $\gamma$ 1에 비해 N-말단에 30개의 아미노산이 더 있으나 나머지 아미노산 서열은 똑같고, PPAR  $\gamma$ 1 및 PPAR  $\gamma$ 2의 발현 수준은 조직마다 차이가 있다. PPAR  $\gamma$ 2는 지방세포에서 특이적으로 발현되는 반면, PPAR  $\gamma$ 1은 대식세포, 결장상피세포, 및 내피세포와 같은 여러 세포 유형에서 낮은 수준으로 발현된다(Lehrke & Lazar, 2005; Sarjeant & Stephens, 2012). PPAR  $\gamma$ 2는 지방생성에 중대한 영향을 미칠 수 있으며, 비만 환자의 지방세포에서 발견되었다(Ren, Collingwood, Rebar, Wolffe, & Camp, 2002; Sarjeant & Stephens, 2012).
- [0044] C/EBP  $\alpha$  (CCAAT-enhancer-binding protein alpha)는 지방전구세포의 분화 조절에 PPAR  $\gamma$ 와 함께 중추적인 역할을 하는 단백질이다. 지방전구세포 분화 과정에 있어서 초기단계의 C/EBP  $\delta$  및 C/EBP  $\beta$ 는 PPAR  $\gamma$ 의 발현을 유도하며, PPAR  $\gamma$ 의 발현 증가는 C/EBP  $\alpha$ 의 발현에 의한 지방세포 분화 후기를 담당한다.
- [0045] 또한, 아디포넥틴(Adiponectin)은 지방세포에 의해 분비된 아디포카인(adipokine)으로, 인슐린 저항 관련 비만을 조절하는 것으로 보고되었다(Lindsay et al., 2002).
- [0046] 한편, 본 발명에서 "약학적 조성물"은 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 각각 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다.
- [0047] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이때, 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게

결정될 수 있다.

- [0050] 또한, 본 발명은 유과틸린을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0051] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"은, 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다. 이 때 상기 건강기능식품 조성물은 비만의 예방 또는 개선을 위하여 해당 질환의 발병 단계 이전 또는 발병 후, 치료를 위한 약제와 동시에 또는 별개로 사용될 수 있다.
- [0052] 본 발명에서 "건강기능식품 조성물"은, 담체, 희석제, 부형제 및 첨가제 중 하나 이상을 포함하여 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제 및 액제 제형으로 이루어진 군에서 선택된 하나로 제형된 것을 특징으로 한다.
- [0053] 본 발명의 유과틸린에 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽제, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다. 상기 본 발명에 더 포함될 수 있는 첨가제로는, 천연 탄수화물, 향미제, 영양제, 비타민, 광물(전해질), 풍미제(합성 풍미제, 천연 풍미제 등), 착색제, 증진제, 팩트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH조절제, 안정화제, 방부제, 산화 방지제, 글리세린, 알코올, 탄산화제, 및 과육으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 성분을 사용할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토오스, 수크로오스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상기 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0054] 상기 외에 본 발명에 따른 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제, 팩트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0055] 그밖에 본 발명에 다른 조성물은 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0056] 상기 담체, 부형제, 희석제 및 첨가제의 구체적인 예로는 이에 한정하는 것은 아니나, 락토오스, 텍스트로즈, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐키롤리돈, 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로오스, 물, 설탕시럽, 메틸 하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 및 미네랄 오일로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상이 사용되는 것이 바람직하다.
- [0058] 이하, 본 발명의 바람직한 실시예 및 실험예를 첨부도면을 참조하여 상세히 설명하기로 한다. 다만, 이들 실시예 및 실험예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다 할 것이다.

[0060] **실시예1. 시료 준비 및 세포 배양**

- [0061] 유과틸린은 LKT 연구소 (세인트 폴, MN, USA)에서 구입하였으며, DMEM 소 태아 혈청 (FBS), 신생아 송아지 혈청 (NBCS) 및 DMEM 배지는 Gibco Life Technologies (그랜드 아일랜드, NY, USA)에서 구입하였다. 인슐린, 인도메타신, 텍사메타손, IBMX, Oil Red O 용액은 Sigma-Aldrich (세인트루이스, MO, USA)로부터 구입하였으며, MTT는 Amresco (솔론, OH, USA)에서 구입하였다. 중성지방 정량 색채/형광 측정 키트는 BioVision (밀피타스, CA, USA)에서 구입하였고, 프라이머는 마크로젠 (서울, 한국)에서, cDNA 합성 키트는 TaKaRa Bio (오즈, 시가, 일본)에서 구입하였다. C/EBP $\alpha$  및  $\beta$ -actin에 대한 항체는 각각 Cell Signaling Technology (비버리, MA, USA)와 Santa Cruz Biotechnology (산타크루즈, CA, USA)로부터 구입하였고, PPAR $\gamma$ , 아디포넥틴 항체는 Abcam plc (캠브리지, 영국)에서 구입하였다.
- [0062] 마우스 3T3-L1 지방전구세포는 한국 세포주 은행 (서울, 한국)에서 구입하였다. 이들은 10% NBCS, 항생제 (1% 페니실린/스트렙토마이신)가 보충된 DMEM에서 유지하였다(5% 습도, 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기). 2일 후, 세포를 10% FBS, IBMX (0.5 mM), 인슐린 (10  $\mu$ g/ml), 텍사메타손 (1  $\mu$ M) 및 인도메타신 (100  $\mu$ M)이 포함된 DMEM로 구성된 분화 배지 (MDI)에 노출시켰다. 2일 후, 배양 배지를 이틀마다(day 2 부터 day 8 까지) 10% FBS 및 인슐린으로 보충된 DMEM으로 대체하였다.

[0064] **실험예 1. 세포 생존능 측정**

[0065] 3T3-L1 세포를 well당  $2 \times 10^3$  세포의 농도로 96-well plate에 접종하였다. 24시간 동안 배양한 후, 세포에 유파틸린(20 또는 40  $\mu\text{M}$ )을 처리하였다. 각각 배양 후 24 또는 48시간 후, 배지를 제거하고, MTT 용액 (0.5 mg/ml)을 첨가하였다. 3시간 동안 배양 한 후, 이소프로판올을 첨가하고 흡광도를 분광 광도계를 사용하여 495nm에서 측정하였다.

[0066] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 유파틸린은 20 및 40  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 3T3-L1 지방전구세포의 생존력에 유의한 영향을 미치지 않았다.

[0068] **실험예 2. 유파틸린의 지방세포 분화 억제 효과 확인**

[0069] 상기 실시예 1에서의 3T3-L1 지방전구세포의 분화기간 동안 유파틸린(20 또는 40  $\mu\text{M}$ )을 처리 또는 비처리하여 분화완료 후, 400x 배율의 현미경을 통해 관찰하여 도 2에 나타내었다. 유파틸린을 처리하여 배양한 3T3-L1 지방세포를 지방전구세포를 사용한 음성대조군(NC) 및 완전 분화된 지방세포를 사용한 양성대조군(PC)과 비교했을 때, 유파틸린이 농도의존적으로 3T3-L1 지방세포 분화를 강력하게 억제하는 것을 확인하였다.

[0071] **실험예 3. 유파틸린의 세포 내 지질 축적 감소 효과 확인**

[0072] 상기 실시예 1에서의 3T3-L1 지방전구세포 분화기간 동안 유파틸린(20 또는 40  $\mu\text{M}$ )을 처리 또는 비처리하여 분화완료 후, 20% 이소프로판올로 세척하고 1시간 동안 5% 포르말린으로 고정시켰다. 그리고, 세포 내 지방방울(lipid droplet)을 15분 동안 Oil Red O 용액으로 염색한 후 100%의 이소프로판올에 용해시켰다. 각 시료의 흡광도는 495nm에서 측정하였다.

[0073] 또한, 중성지방(TG) 정량화는, 제조업체의 프로토콜에 따라 중성지방 정량 비색/형광 측정 키트 (바이오 비전)를 사용하여 TG의 총량을 측정하여 확인하였다. 상기 유파틸린(20 또는 40  $\mu\text{M}$ )을 처리 또는 비처리한 3T3-L1 세포를 5% Nonidet P40을 함유하는 TG 분석 완충액에서 균질화시킨 후, 마지막 4분 동안 80°C로 가열하였다. 그 후, 불용성 물질을 제거하기 위해 2분 동안 원심분리하고,  $\text{dH}_2\text{O}$ 로 희석한 후, TG 반응 혼합물과 혼합하고 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 비색 강도는 570 nm에서 측정하였다.

[0074] 그 결과, 도 3a 및 3b에 나타난 바와 같이, 3T3-L1 지방세포 내의 지방방울(lipid droplet)(도 3a) 및 중성지방(Triglyceride, TG)의 축적량(도 3b)은 완전 분화된 지방세포인 양성대조군(PC)에 비해 20 및 40  $\mu\text{M}$ 의 유파틸린을 처리한 3T3-L1 지방세포에서 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였다.

[0075] 따라서, 상기 결과로부터 유파틸린은 3T3-L1 지방전구세포가 성숙한 지방세포로 분화하는 동안 세포 내 지질 축적을 감소시킨다는 것을 알 수 있었다.

[0077] **실험예 4. 유파틸린의 지방세포 형성 및 분화 관련 전사인자 및 아디포넥틴 발현 억제 효과 확인**

[0078] **4-1. mRNA 발현 분석**

[0079] 상기 실시예 1에서의 3T3-L1 지방전구세포 분화기간 동안 유파틸린(20 또는 40  $\mu\text{M}$ )을 처리 또는 비처리하여 분화완료 후, 총 세포 RNA는 RNAiso 플러스 (타카라)를 이용하여 추출하였다. 역전사 및 cDNA의 합성은 제조사의 프로토콜에 따라 the PrimeScript™ RT cDNA 합성 키트 (타카라)를 이용하여 수행하였다. qPCR 시약은 EmeraldAmp GT PCR Master Mix (타카라)를 사용하였다. 정량적 RT-PCR은 SYBR Green (TOYOBO, Osaka, Japan)을 사용하여 iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)으로 수행되었다. 검출한 유전자들의 Primer 종류 및 서열은 표 1에 표시한 바와 같다.

표 1

Table 1. Gene-specific primers used for reverse transcription polymerase chain reaction

Gene name	Accession no.	Forward primer	Reverse primer
PPAR $\gamma$	AB644275.1	5'-GGAAGACCACTCGCATTCTT-3'	5'-GTAATCAGCAACCATTGGGTCA-3'
C/EBP $\alpha$	NM_001287523.1	5'-CAAGAACAGCAACGAGTACCG-3'	5'-GTCACTGGTCAACTCCAGCAC3'
aP2	NM_024406.2	5'-GATGCCTTTGTGGGAACCT-3'	5'-CTGTCGTCTCGGGTGATTT-3'
Adiponectin	NM_009605.4	5'-GATGGCACTCCTGGAGAGAA-3'	5'-TCTCCAGGCTCTCCTTTCCT-3'
$\beta$ -actin	NM_007393.4	5'-CGTGCCTGACATCAAAGAGAA-3'	5'-GCTCGTTGCCAATAGTGATGA-3'

[0080]

[0081]

그 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이, 유파틸린은 PPAR  $\gamma$ , C/EBP  $\alpha$ , 및 아디포넥틴의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 억제하는 것을 알 수 있었다.

[0083]

4-2. 단백질 발현 분석

[0084]

상기 실시예 1에서의 3T3-L1 지방전구세포 분화기간 동안 유파틸린(20 또는 40  $\mu$ M)을 처리 또는 비처리하여 분화완료 후, RIPA 용해 완충액 (Biosesang, 한국)을 사용하여 용해시켰다. 동일한 양의 단백질을 12% 소듐 도데실설페이트 폴리아크릴아미드 겔에서 분리하였다. 분리된 단백질은 나이트로셀룰로오스막에 옮기고, TBST에서 1시간 동안 5% 탈지 우유(10 mmol/L Tris pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween 20)로 차단 후, PPAR  $\gamma$ , C/EBP  $\alpha$ , 아디포넥틴에 대한 일차 항체와 함께 4° C에서 하룻밤 배양하였다. 이를 TBST로 세척한 후, 막을 1시간 동안 실온에서 HRP-접합 이차 항체와 함께 배양하였으며, 상기 단백질은 enhanced chemiluminescence(ECL) 시약 (GE 헬스케어, 버킹엄셔, UK)을 이용하여 검출하였다.

[0085]

그 결과, 유파틸린은 도 4b에 나타난 바와 같이, PPAR  $\gamma$ , C/EBP  $\alpha$ , 및 아디포넥틴 단백질 발현을 억제시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0087]

실시예 2. 통계분석

[0088]

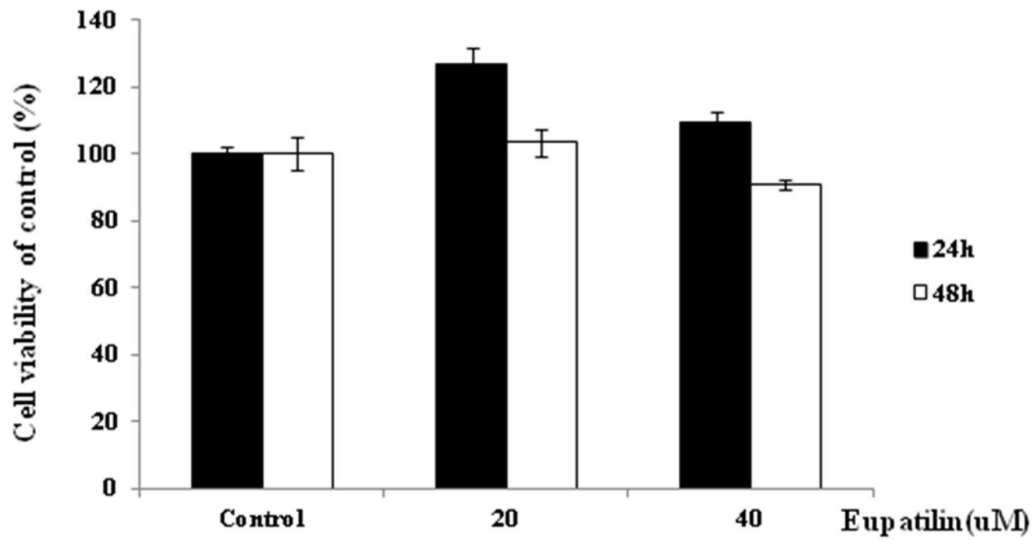
모든 실험의 통계적 분석은 SPSS 버전 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL)을 사용하여 수행하였다. 통계적 차이는 one-way ANOVA를 이용하여 분석하였다. <0.05의 P 값이 유의한 것으로 간주하였다.

[0090]

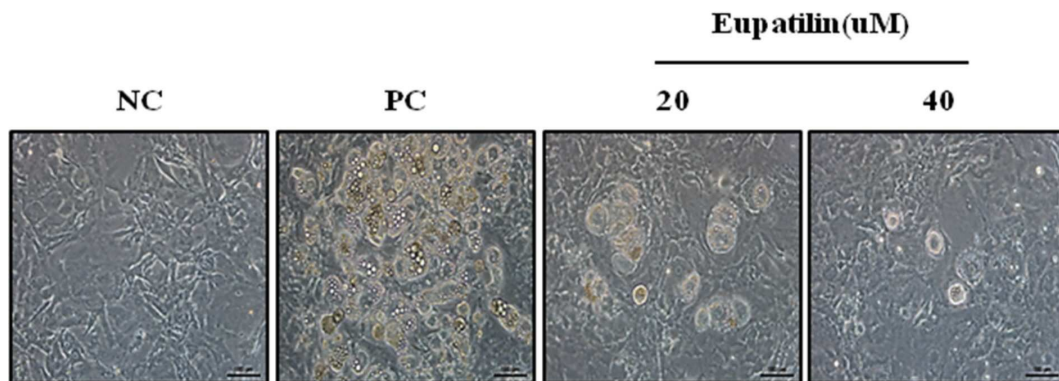
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

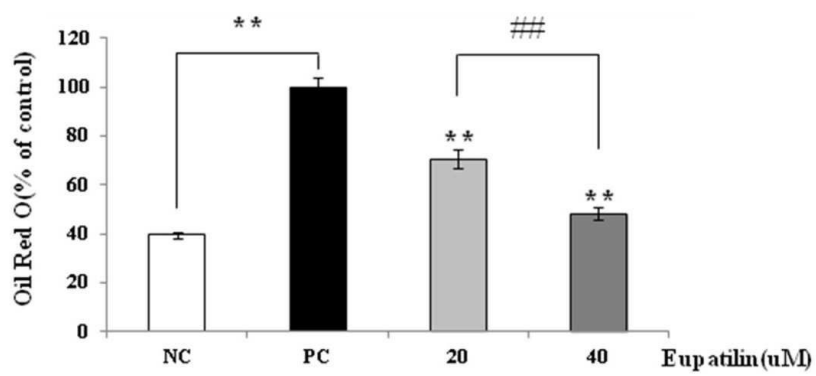
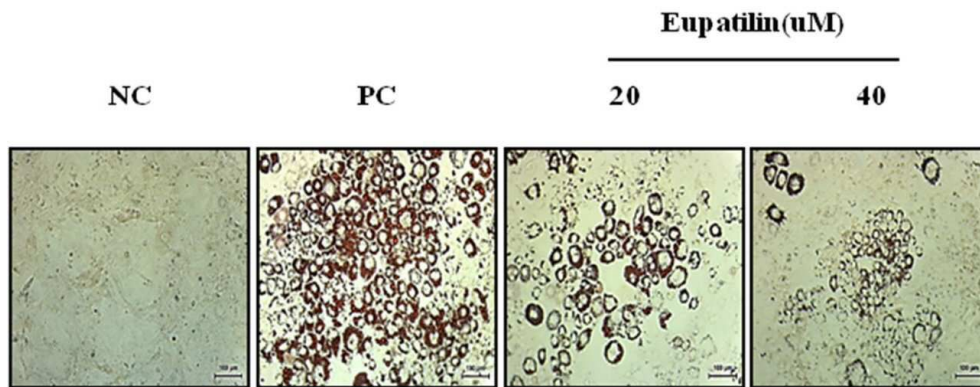
도면1



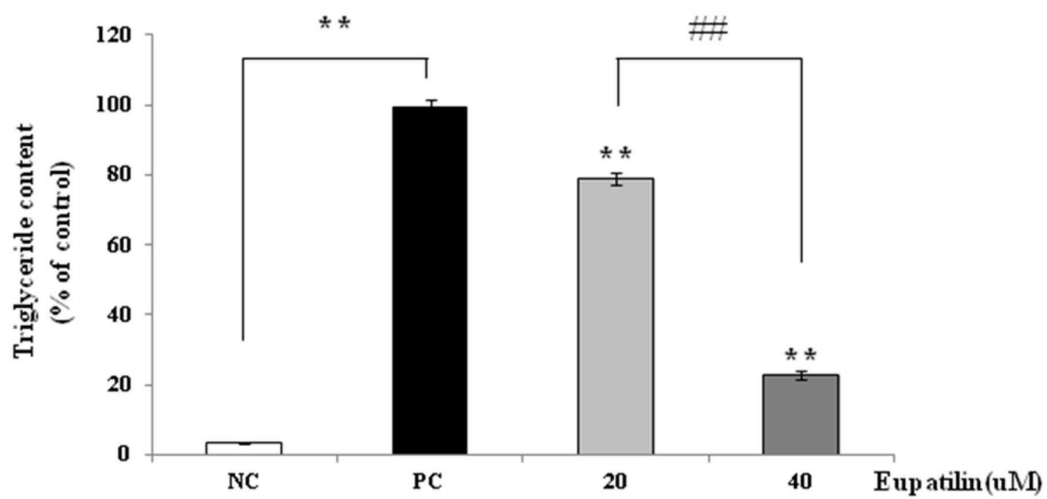
도면2



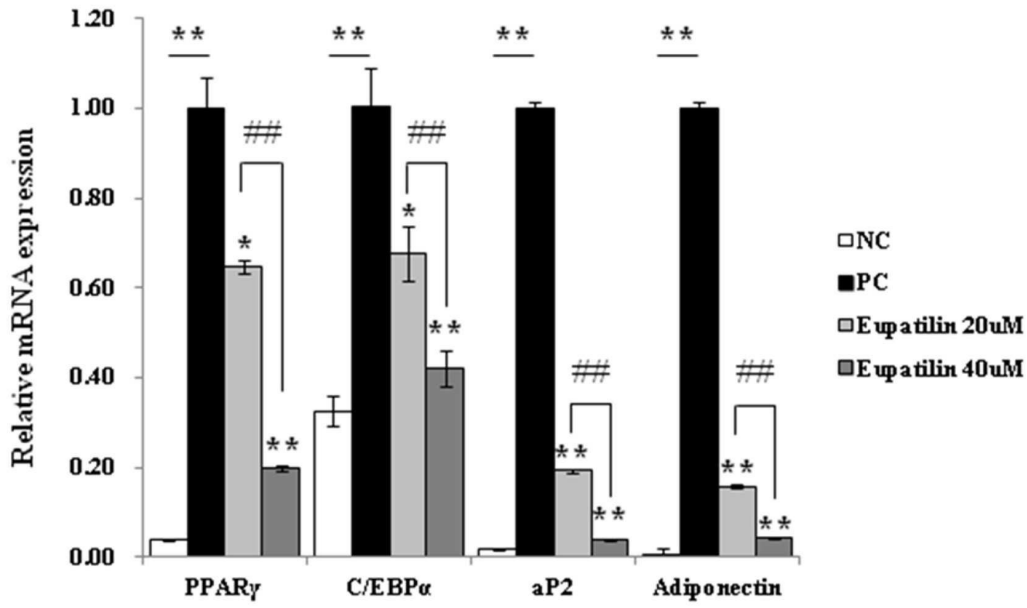
도면3a



도면3b



도면4a



도면4b

