

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2023년 6월 8일 (08.06.2023)

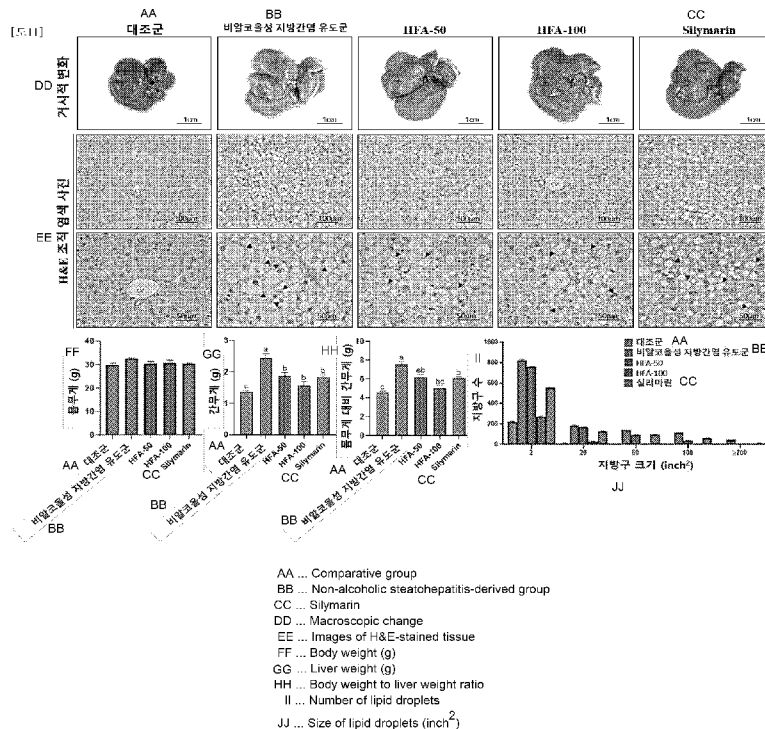


(10) 국제공개번호
WO 2023/101420 A1

- (51) 국제특허분류:
A23L 33/10 (2016.01) *A61P 3/04* (2006.01)
A23L 33/00 (2016.01) *A61P 1/16* (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01) *A23K 20/111* (2016.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2022/019212
- (22) 국제출원일: 2022년 11월 30일 (30.11.2022)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2021-0168359 2021년 11월 30일 (30.11.2021)KR
- (71) 출원인: 동아대학교 산학협력단 (DONG-A UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION FOR INDUSTRY-ACADEMY COOPERATION) [KR/KR];
49315 부산광역시 사하구 낙동대로550번길 37, Busan (KR).
- (72) 발명자: 김은경 (KIM, Eun-Kyung); 46765 부산광역시 강서구 명지오션시티11로 22, 116동 103호, Busan (KR).
범미기 (FAN, Meiqi); 49307 부산광역시 사하구 낙동대로 519번길 38-2, 202호, Busan (KR). 최영진 (CHOI, Young-Jin); 46726 부산광역시 강서구 명지국제3로 97, 105동 2103호, Busan (KR).
- (74) 대리인: 위병갑 (WIE, Byoung-Gap); 06141 서울특별시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, 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,

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTION OR TREATMENT OF OBESITY, FATTY LIVER, OR STEATOHEPATITIS COMPRISING MOMORDICA CHARANTIA EXTRACT OR HYDROFERULIC ACID DERIVED FROM MOMORDICA CHARANTIA AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 여주 추출물 또는 여주 유래의 하이드로페룰산을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염의 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention provides a composition effective in preventing, ameliorating, or treating obesity or fatty liver comprising Momordica charantia leaf extract or hydroferulic acid derived from Momordica charantia as an active ingredient. The composition may be effectively used throughout food or pharmaceutical industries.

(57) 요약서: 본 발명은 여주 잎 추출물 또는 여주 유래 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간의 예방, 개선 또는 치료의 효과가 있는 조성물에 대해 제공하는 것으로 이는 개선용 식품 또는 의약품 산업 전반에서 유용하게 사용될 수 있다.

[다음 쪽 계속]

WO 2023/101420 A1

SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, 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, ME,
MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 여주 추출물 또는 여주 유래의 하이드로페룰산을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염의 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 여주 추출물 또는 여주 유래의 하이드로페룰산을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염의 예방 또는 치료용 조성물에 대해 제공하는 것으로 비만, 지방간 또는 지방간염의 관련 산업 전반에 유용하게 사용될 수 있으며 특히, 개선용 식품 조성물 및 의약 산업에 응용될 수 있다.

배경기술

- [2] 비만은 대한 늘어나는 경각심과 비만의 원인을 이해하고 이에 대응하고자 하는 전 지구적 노력에도 불구하고, 비만은 가속적으로 증가하는 추세에 있다(Mitchell et al., Implications for female fertility and obesity. *Reproduction*. 2005;130:583-97). 지난 10년간 국내 고도비만 환자는 급격한 증가 추세다. 대한비만학회에 따르면 국내 고도비만율은 2009년 3.5%에서 2018년 6.01%로 10년간 약 72%나 증가하였다. 이 정도 상승세라면 2030년에는 국민 10명 중 1명이 고도비만으로 전망된다. 비만을 단순히 '살이 많이 찐 상태'라고 여기는 사람이 많다. 그러나 비만은 각종 질환을 유발하여 다양한 합병증을 유발할 수 있어 이에 대한 관리가 필요할 것이다.
- [3] 또한, 비만과 더불어 지방간은 지방이 간에 침착된 정도가 간 무게의 5% 이상인 경우를 의미하는 것으로 지방 중에서 중성 지방(트리글리세라이드, TG)이 간세포에 축적된다. 지방간은 음식물 등을 통하여 섭취한 지방질을 원활하게 처리하지 못하면서 발생하는 것으로 분당 서울대 병원 임수 교수 연구진은 '지방간에서 생긴 염증이 악화되면 지방간염을 넘어 간경화, 간암 등 간 고유의 합병증뿐만 아니라 심혈관 질환 및 당뇨병과 같은 만성질환으로 이어져 사망에 이를 수 있기 때문에 이러한 연결 고리를 끊는 것이 중요하다'라는 연구 결과를 발표한 바 있다.
- [4] 한편, 여주(*Momordica charantia*)는 열대 아시아 원산이며 관상용으로 심어 기른다. 줄기는 덩굴손으로 물체를 감으며 잎은 5~7개로 크게 갈라진다. 덩굴손과 잎이 마주난다. 7~8월에 피는 꽃은 잎겨드랑이에서 하나씩 달리는데 노란색이다. 열매가 특이한데, 길이 7~9 센티미터 정도 되는 길동근 모양으로 조그만 혹 모양 돌기가 열매 가득 돌아 있으며 익으면 갈라져 붉은색 육질에 싸여 있는 씨가 드러난다. 여주에는 인슐린이 많이 포함되어 있어서 2형 당뇨병에 탁월한 효과가 있다. 그 밖에 항암효과, 피로해소, 기관지강화, 해역작용, 다이어트 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 다만, 여주 물 추출물에서 분리된 하이드로페룰산(hydroferulic acid)의 비만, 지방간 또는

지방간염 예방 또는 치료효과에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은 여주 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간 예방, 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [6] 또한, 본 발명의 다른 목적은 여주 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공하는 데 있다.
- [7] 또한, 본 발명의 다른 목적은 여주 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.
- [8] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 비만 또는 지방간 치료 방법을 제공하는 데 있다.
- [9] 또한, 본 발명의 목적은 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 데 있다.
- [10] 또한, 본 발명의 다른 목적은 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공하는 데 있다.
- [11] 또한, 본 발명의 다른 목적은 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.
- [12] 마지막으로, 본 발명의 다른 목적은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 치료 방법을 제공하는 데 있다.

과제 해결 수단

- [13] 상기의 목적을 해결하기 위하여, 여주 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 추출물은 물, C1 내지 C4의 알코올, 에틸아세테이트, 클로로포름 및 헥산 중에서 선택된 적어도 어느 하나의 용매로 추출된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [15] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 지방간은 알코올성 지방간 또는 비알코올성 지방간인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [16] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 항산화 효과가 있는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [17] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 지질 축적을 억제시키는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [18] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 알라닌 아미노전이효소(ALT), 알칼리성 인산분해효소(ALP), 아스파르테이트 아미노 전이효소(AST)를 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [19] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 혈액 내 혈청 콜레스테롤(TC), 중성지방(TG) 및 저밀도 지단백 콜레스테롤(LDL)을 감소시키고, 고밀도 지단백 콜레스테롤(HDL)을 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [20] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 지방 트리글리세리드 리파제(ATGL), 트리아실글리세롤 가수분해효소(TGH), 호르몬 민감성 리파제(HSL), 카르니틴 팔미토일 트랜스퍼라제 1(CPT-1) 및 돼지 분리 단백질 3(UCP 3)의 활성을 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [21] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 CCAAT/인핸서 결합 단백질(C/EBP α), 조절 인자 활성화 수용체 γ (PPAR- γ), 콜레스테롤 7 α -하이드록실라제(CYP7A1), 아실-CoA 합성 효소(ACS), 아세틸조효소A 카르복실라아제(ACC) 및 지방산 합성 효소(FAS)의 활성을 감소시키는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [22] 또한, 본 발명은 여주 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공하는 것이다.
- [23] 또한, 본 발명은 여주 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [24] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 비만 또는 지방간 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [25] 또한, 여주 잎 추출물에서 분리한 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [26] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 지방간은 비만, 지방간 또는 지방간염인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [27] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 지질 축적을 억제시키는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [28] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 혈청 내 LDL/VLDL 비율, 혈청 중성지방(TG), 혈청 유리지방산(FFAs) 및 혈청 콜레스테롤(TC)을 감소시키고, 고밀도 지단백 콜레스테롤(HDL)을 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [29] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 간 섬유화를 억제시키는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [30] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 α -SMA, COL1A1 및 COL1A2의 발현을 감소시키는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [31] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 간 내 염증을 억제하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [32] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 F4/80, CD68, Gas6, MerTK, ERK, p-ERK 및 TGF- β 의 발현량을 감소시키는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [33] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 IL-1 β , TNA- α , MCP-1의 발현량을 감소시키는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [34] 또한, 본 발명은 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.
- [35] 또한, 본 발명은 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [36] 마지막으로, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [37] 본 발명의 여주 추출물 또는 여주 유래의 하이드로페룰산(hydroferulic acid)은 비만, 지방간 또는 지방간염의 예방 또는 치료 효과가 뛰어나므로 건강기능식품 산업 또는 의약품 산업 전반에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [38] 도 1은 (a) 실험에 사용된 여주의 4가지 부분 과육(MCF), 뿌리(MCR), 새싹(MCS) 및 잎(MCL)에 대한 사진, (b) 3T3-L1 세포 분화 실험의 모식도 및 (c) 생체 내 연구 일정표에 대한 도이다.
- [39] 도 2는 여주조성물의 항산화 및 항비만 효과에 대한 것으로 (a) DPPH 라디칼 소거 활성, (b) 환원력, (c) 지방세포 사진 및 (d) 무처리군 대비 지방 축적 백분율을 나타낸 도이다.
- [40] 도 3은 여주 잎의 (a) 물 추출물, (b) 에탄올 추출물 및 (c) 헥세인 추출물의 HPLC로 분석한 그래프를 나타낸 도이다.
- [41] 도 4는 HFD 유발 마우스 여주 잎 물 추출물(MCLW) 처리군의 (a) 간 및 지방 세포 무게, (b) 생화학적 매개변수, (c) 간 대사관련 인자, (d) 콜레스테롤 양 및 (e) 혈청의 렙틴 양을 측정하여 나타낸 도이다.
- [42] 도 5는 HFD 유발 마우스의 식이별 (a) 방사선 사진, (b~c) 지방량 및 지방세포 크기 변화에 대한 현미경 사진 및 그래프를 나타낸 도이다.
- [43] 도 6은 HFD 유발 마우스의 식이별 간을 조직학적 분석을 하여 나타낸 도이다.
- [44] 도 7은 마우스 간에서 실시간 PCR(Real time PCR)로 mRNA 발현량을 측정한 것으로 (a) ATGL, (b) TGH, (c) HSL, (d) UCP3, (e) CPT-1, (f) C/EBP- α , (g) PPAR- γ , (h) FAS, (i) ACS 및 (j) CYP7A1를 각각 측정하여 나타낸 도이다.
- [45] 도 8은 마우스 샘플을 웨스턴 블롯(Western blot)하여 단백질량을 측정한 것으로 (a) 웨스턴 블롯한 사진, (b) 아디포넥틴(Adiponectin), (c) p-AMPK/AMPK, (d) C/EBP α , (e) PPAR- γ , (f) SREBP-1c 및 (g) FAS를 그래프로 나타낸 도이다.
- [46] 도 9는 HFD 마우스 지방 대사 경로를 나타낸 모식도이다.
- [47] 도 10은 동물실험 디자인을 간단히 나타낸 모식도이다.
- [48] 도 11은 본 발명의 하이드로페룰산 투여에 따른 간 조직에서 지방 감소 효과를 나타낸 도이다.

- [49] 도 12는 본 발명의 하이드로페룰산 투여에 따른 혈액 및 지방 조직 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [50] 도 13은 본 발명의 하이드로페룰산 투여에 따른 지방침착 및 간 섬유화 억제 효과를 나타낸 도이다.
- [51] 도 14는 본 발명의 하이드로페룰산 투여에 따른 간 조직에서 간 섬유화 관련인자 발현량 측정 결과를 나타낸 도이다.
- [52] 도 15는 본 발명의 하이드로페룰산 투여에 따른 간 조직에서 염증 관련인자(F4/80, CD68, IL-1 β , TNA- α , MCP-1) 발현량 측정 결과를 나타낸 도이다.
- [53] 도 16은 본 발명의 하이드로페룰산 투여에 따른 간 조직에서 염증 관련인자(Gas6, MerTK, ERK, p-ERK, TGF- β) 발현량 측정 결과를 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [54] 본 발명은 여주 잎 추출물 또는 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 대해 제공하는 것이다.
- [55] 일 실시예로, 본 발명은 여주 잎 추출물 또는 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간의 예방 또는 개선용 사료 조성물에 대해 제공하는 것이다.
- [56] 일 실시예로, 본 발명은 여주 잎 추출물 또는 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 대해 제공하는 것이다.
- [57] 일 실시예로, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 비만, 지방간 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [58] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [59] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

- [60] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는(w/w)%, 고체/액체는(w/v)%, 그리고 액체/액체는(v/v)%이다.
- [61] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예 또는 실험예들을 참조하면 명확해질 것이다.
- [62] 본 발명은 여주 잎 추출물 또는 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [63] 또한, 상기 하이드로페룰산(hydroferulic acid)은 여주 유래, 바람직하게는 여주 물 추출물에서 분리된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [64] 본 발명에서 사용되는 용어 "여주(*Momordica charantia*)"는 박과(Cucurbitaceae)에 속하는 채소 또는 약용식물로 주로 열대나 아열대 지역에서 자라며, 주로 열매를 식용으로 이용하는데, 쓴 맛이 강하여 일반적으로 영문으로는 bitter gourd 또는 bitter melon이라고 불린다. 어린 열매는 녹색을 나타내고, 더 성숙되면 오렌지색으로 변하며, 시간이 더 지나면 과육이 터져 빨간색 가종피가 노출되고, 종자는 일반적으로 브라운색을 나타낸다. 일본, 중국, 동남아시아에서는 주로 미숙과를 식용으로 재배하고 있으나 어린잎을 식용으로 이용하기도 한다.
- [65] 또한, 상기 비만은 비만 이외에 당뇨병, 지방간, 고지혈증, 동맥경화증 및 이들의 합병증과 같은 비만 관련 질환을 포함하는 것일 수 있다.
- [66] 또한, 상기 지방간은 알코올성 지방간 또는 비알코올성 지방간일 수 있으며, 바람직하게는 비알코올성 지방간일 수 있다.
- [67] 본 발명에서 사용되는 용어 "비알코올성 지방간"은 운동 부족, 고열량 식사 등의 나쁜 생활 습관에 의하여 과잉된 에너지가 간에 중성지방 형태로 쌓여 발생하는 질환을 말한다. 방치할 경우 간염, 간경화에서 간암까지 진행할 수 있으나, 현재까지는 마땅한 치료약이 없어 운동 및 식생활 개선을 통한 치료가 주로 이루어지고 있다. 본 발명에서 상기 비알코올성 지방간은 단순히 지방만 끼어 있고 간세포 손상은 거의 없는 단순 비알코올성 지방간, 간세포 손상이 심하고 지속되는 만성 비알코올성 지방간염, 간경변증에 이르는 다양한 형태의 간질환을 포함한다.
- [68] 또한, 상기 조성물은 지질 축적을 억제시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [69] 또한, 상기 조성물은 혈청 내 LDL/VLDL 비율, 혈청 중성지방(TG), 혈청 유리지방산(FFAs) 및 혈청 콜레스테롤(TC)을 감소시키고, 고밀도 지단백 콜레스테롤(HDL)을 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [70] 또한, 상기 조성물은 간 섬유화를 억제시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [71] 또한, 상기 조성물은 α -SMA, COL1A1 및 COL1A2의 발현을 감소시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [72] 또한, 상기 조성물은 간 내 염증을 억제하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [73] 또한, 상기 조성물은 F4/80, CD68, Gas6, MerTK, ERK, p-ERK 및 TGF- β 의 발현량을 감소시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [74] 또한, 상기 조성물은 IL-1 β , TNA- α , MCP-1의 발현량을 감소시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [75] 본 발명의 식품 조성물은 유효성분인 하이드로페룰산(hydroferulic acid)를 유효성분으로 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [76] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제(타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 상기 약학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초콜렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.
- [77] 또한, 상기 식품 조성물은 유효성분인 추출물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [78] 본 발명의 기능성 식품 조성물은, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공될 수 있다. 본 발명에서 '건강기능성 식품 조성물'이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [79] 본 발명의 개선용 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 '식품 첨가물 공전'에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물;

L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다. 예를 들어, 정제 형태의 식품 조성물은 본 발명의 유효성분을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 식품 조성물은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다. 캡셀 형태의 식품 조성물 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다. 환 형태의 식품 조성물은 본 발명의 유효성분과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다. 과립 형태의 식품 조성물은 본 발명의 유효성분의 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[80] 이어서, 본 발명은 여주 잎 추출물 또는 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

[81] 본 발명의 사료 조성물은 기존의 항생제를 대체하고 유해한 식품 병원성균의 생장을 억제하는 바, 동물체의 건강상태를 양호하게 하고, 가축의 증체량과 육질을 개선시키며, 산유량 및 면역력을 증가시키는 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 사료 조성물은 발효사료, 배합사료, 펠렛 형태 및 사일리지 등의 형태로 제조될 수 있다. 상기 발효사료는 본 발명의 펩타이드 이외의 여러 가지 미생물균 또는 효소들을 첨가함으로써 유기물을 발효시켜 제조할 수 있으며, 배합사료는 여러 종류의 일반사료와 본 발명의 펩타이드를 혼합하여 제조할 수 있다. 펠렛 형태의 사료는 상기 배합사료 등을 펠렛기에서 열과 압력을 가하여 제조할 수 있으며, 사일리지는 청예사료를 본 발명에 따른 미생물로 발효시킴으로써 제조할 수 있다. 습식발효사료는 음식물 쓰레기 등과 같은 유기물을 수집 및 운반하여 살균과정과 수분조절을 위한 부형제를 일정비율로 혼합한 후, 발효에 적당한 온도에서 24시간 이상 발효하여, 수분함량이 약 70%로 포함되도록 조절하여 제조할 수 있다. 발효건조사료는 습식 발효 사료를 건조과정을 추가로 거쳐 수분함량이 30% 내지 40% 정도 함유되도록 조절하여 제조할 수 있다.

[82] 본 발명의 사료 조성물은 종래 사료에 첨가되는 성분을 더 포함할 수 있다. 이러한 사료에 첨가되는 성분의 일례로서 곡류분말, 고기분말, 및 두류 등을 포함할 수 있다. 상기에서 곡류분말은 쌀가루, 밀가루, 보리가루, 및 옥수수가루

중에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다. 상기에서 고기분말은 닭고기, 소고기, 돼지고기, 및 타조고기 중에서 선택된 어느 하나 이상을 분말화한 고기분말을 사용할 수 있다. 상기에서 두류는 대두, 강낭콩, 완두콩, 및 검정콩 중에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다.

- [83] 본 발명의 사료 조성물은 상기에서 언급한 종래 사료에 첨가되는 성분인 곡류분말, 고기분말, 및 두류 이외에도 사료의 영양성을 증대시키기 위해 영양제, 및 무기물 중에서 선택된 어느 하나 이상을 첨가할 수 있으며, 사료 품질의 저하를 막기 위해 항곰팡이제, 항산화제, 항응고제, 유화제, 및 결착제 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [84] 나아가, 본 발명은 여주 잎 추출물 또는 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [85] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"는 본 발명에 따른 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 투여로 비만, 지방간 또는 지방간염 관련 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [86] 본 발명에서 사용되는 용어, "투여"는 임의의 적절한 방법으로 대상에게 소정의 물질, 즉 본 발명에 따른 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미한다. 이에 따라, 본 발명의 약학적 조성물은 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 폐내투여, 직장 내 투여 등의 방식으로 투여될 수 있으나, 정맥내 투여가 바람직하고, 지방간 또는 지방간염의 예방 또는 치료 용도로 사용되는 경우에는 피하 투여가 바람직하다.
- [87] 본 발명의 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(Adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있으나, 예를 들어 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 더 포함하여 그 면역성을 증가시킬 수 있다.
- [88] 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

- [89] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [90] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(Witepsol), 트윈(Tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [91] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 개체의 연령, 체중, 성별, 신체 상태 등을 고려하여 선택된다. 상기 약학 조성물 중 포함되는 유효성분의 농도는 대상에 따라 다양하게 선택할 수 있음은 자명하며, 바람직하게는 약학 조성물에 0.01~5,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 포함되는 것이다. 그 농도가 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 미만일 경우에는 약학 활성이 나타나지 않을 수 있고, 5,000 $\mu\text{g/ml}$ 를 초과할 경우에는 인체에 독성을 나타낼 수 있다.
- [92] 상기 약학 조성물은 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화될 수 있다. 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질, 연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [93] 또한, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제제이며, 주사용 제제의 용매로서 물, 링거액, 등장성 생리식염수 또는 현탁액을 들 수 있다. 상기 주사용 제제의 멸균 고정 오일은 용매 또는 현탁 매질로서 사용할 수 있으며 모노-,

다-글리세라이드를 포함하여 어떠한 무자극성 고정오일도 이러한 목적으로 사용될 수 있다. 또한, 상기 주사용 제제는 올레산과 같은 지방산을 사용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [94] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면을 참고하여 보다 상세하게 설명하도록 한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐, 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아닐 것이다.
- [95] <준비예 1> 시료 준비 및 추출물 제조
- [96] 신선한 여주 과일, 뿌리, 줄기 및 잎(Shandong, China, 도 1)을 실온(RT)에서 2주 동안 그늘에서 공기 건조시킨 후 샘플을 분쇄하여 분말로 만들었다. 분말 샘플은 추출 전에 실온에서 보관하였다. 이후 상기 분말을 여러 가지 용매(증류수, 70% 에탄올 및 95% 헥산)를 이용하여 추출물을 제조하였다. 추출 효율을 위해 과일, 뿌리, 줄기 및 잎의 분말 100 g을 1L 용매가 들어 있는 2L 표준 플라스크(각 식물 부분에 대해 다른 용매를 사용하는 3개의 다른 플라스크)에 별도로 담갔다. 담근 식물 분말을 포함하는 플라스크를 먼 마개와 알루미늄 호일로 밀봉하고 실온에서 1시간(증류수), 2시간(70% 에탄올) 및 6시간(95% 헥산) 동안 진탕기에 두었다. 최대 추출을 위해 이 과정을 3회 반복하였다. 3회 반복 추출 후 추출물을 회전 증발기를 이용하여 60°C에서 농축한 후 여과하고 5일 동안 동결건조하였다.
- [97] <준비예 2> 실험동물 조건
- [98] 4주령 C57BL/6 수컷 마우스를 나라바이오 동물센터(나라바이오텍, 서울, 한국)에서 구입하여 실험시설에서 1주일 동안 적응시킨 후, 아스펜 칩이 부착된 투명 플라스틱 케이지 내부에 4마리씩 그룹으로 수용하였다. 깨끗한 병원균이 없는 조건에서 표준 마우스 차우식이(Chow diet)와 별도의 처리가 되지 않은 수돗물을 공급하였다. 동물 환경은 20 내지 21°C에서 12시간의 암기를 두며, 40 내지 45%의 상대 습도로 적절하게 제어되었다. 모든 실험은 건국대학교 동물병원 동물관리위원회의 승인을 받았으며, 본 발명에 관련한 실험(KU17089)은 사용된 동물의 수와 고통을 최소화하도록 설계하였다.
- [99] <실시예 1> 여주의 부위 및 용매별 항산화 활성 분석
- [100] 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거 활성 및 환원력은 Blois와 Oyaizu가 보고한 절차에 따라 여주의 12가지 다른 추출물의 시험관 내 항산화 활성을 측정하기 위해 수행되었다.
- [101] 비만은 과도한 산화 스트레스와 관련이 있다. 따라서, 여주의 다양한 추출물의 항산화 활성을 조사하였다. DPPH 라디칼 소거 활성과 환원력 분석을 통해 항산화 활성을 평가하였다. 도 2a 및 b에 나타난 바와 같이 여주 잎 물 추출물(MCLW)과 여주 잎 에탄올 추출물(MCLE)의 항산화 활성은 다른 추출물보다 유의하게 높았다.
- [102] <실시예 2> 여주의 부위 및 용매별 지질 축적 측정

- [103] 한국 세포주 은행(서울, 한국)에서 얻은 3T3-L1 세포를 37°C에서 10% 열 불활성화 소태아혈청(FBS) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(P/S)이 포함된 DMEM 배지에서 5% 가습된 CO₂의 대기 조건에서 배양되었다. 분화를 유도하기 위해, 2일 후 합류 지방전구세포(0일 지정)를 호르몬 혼합물 분화 배지, 0.5 mM IBMX, 1 μ M 텍사메손 및 5 μ g/mL 인슐린에서 2일 동안 배양하였다. 그런 다음 세포를 1% P/S, 10% FBS 및 5 μ g/mL 인슐린을 함유하는 DMEM에서 추가로 2일 동안 배양하였다. 그 후 배양액을 1% P/S, 10% FBS가 포함된 DMEM으로 2일간 교체한 후, 지방세포가 세포내 지질 방울을 획득하는 Day 8까지 2일마다 배지를 교체하였다. 여주 잎 물 추출물(MCLW)(1 mg/mL) 및 여주 잎 에탄올 추출물(MCLE)(1 mg/mL)을 0일부터 6일까지 2일마다 4회 투여하였다. 대조군 세포는 여주 추출물 없이 동일한 배지 조성으로 구성되었다. 지방 축적에 대한 추출물의 영향은 3T3-L1 지방전구세포에서 분화된 지질 방울의 크기와 관련된다.
- [104] 채혈 후 전신스캐너(InAlyzer dual X-ray absorptiometry, Medikors, 경기도, 한국)를 이용하여 이중에너지 X선 흡수계측법(DXA) 측정을 수행하였다. 간은 파라핀과 냉동 절편을 위해 두 조각으로 나누었다. 간 및 부고환 지방 조직을 조직학적 검사를 위해 절개하고 10% 중성 포르말린으로 완충한 다음 파라핀에 포매하였다. 파라핀 절편 4 μ m에 Hematoxylin과 Eosin(H&E)으로 염색하였다. 샘플을 현미경으로 200x에서 이미지화하였다. 동결 절편(OCT 화합물이 있는 10 μ m)을 사용하여 오일레드 O 염색을 통해 지질 축적량을 확인하였다. 슬라이스를 200x에서 현미경으로 이미지화하고 지방 세포의 크기를 기록하였다.
- [105] 오일 레드(Oil-Red) O는 동결된 부분의 중성 트리글리세리드와 지질 및 파라핀 부분의 일부 지단백질을 염색하는데 사용되는 리소크롬디아 조염료이다. 상기에 설명된 대로 3T3-L1 세포를 12웰 플레이트(12-well plate)에서 배양하여 8일 동안 지방세포 분화를 유도하였다. 오일레드 O 세포 지질 지수는 8일째에 생리 식염수로 세포를 행구고 10% 포르말데히드 용액으로 고정하고 실온에서 오일레드 O 용액 200 mL당 이소프로필 알콜(Isopropyl alcohol) 0.7 g을 사용해 RT로 60분간 반응시켰다. 지질 방울을 염색한 후 증류수로 행구고 건조하여 염색 용액을 제거하였다. 3T3-L1 지방세포의 지질 방울이 현미경으로 관찰하였다. 마지막으로 세포에 남아있는 얼룩을 이소프로판올로 용출시키고 마이크로플레이트 리더를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [106] 지방전구세포 3T3-L1에 대한 여주 잎 물 추출물(MCLW) 및 여주 잎 에탄올 추출물(MCLE)의 세포독성을 조사하였다. 여주 잎 물 추출물(MCLW)와 여주 잎 에탄올 추출물(MCLE)가 3T3-L1에 세포독성 효과가 없다는 것을 발견하였다. 여주 잎 물 추출물(MCLW)와 여주 잎 에탄올 추출물(MCLE)의 지방전구세포에서 지방세포로의 분화에 대한 항지방성을 확인하기 위해 3T3-L1 지방전구세포에 여주 잎 물 추출물(MCLW)와 여주 잎 에탄올 추출물(MCLE)를 8일(0일부터 8일) 동안 처리하였다. 최적의 분화 조건에서 배양된 여주 잎 물

추출물(MCLW) 및 여주 잎 에탄올 추출물(MCLE) 처리된 세포의 현미경 검사는 세포내 지질 축적의 상당한 감소를 나타냈다. 3T3-L1 지방세포의 지방 생성에 대한 여주 잎 물 추출물(MCLW) 및 여주 잎 에탄올 추출물(MCLE)의 억제 효과는 Oil-Red O 염색으로 측정되었다(도 2c). 유도 후 8일째에 3T3-L1 세포에서 오일 방울이 관찰되었으며, 세포는 트리글리세리드 축적을 입증하기 위해 친유성 Oil-Red O로 고도로 염색되었다(도 2c). 대조적으로, 오일레드 O의 염색 정도는 여주 잎 물 추출물(MCLW) 또는 여주 잎 에탄올 추출물(MCLE)의 처리로 감소하여 여주 잎 물 추출물(MCLW) 또는 여주 잎 에탄올 추출물(MCLE)가 지질 축적을 감소시켰음을 나타낸다(도 2c, 도 2d). 테스트한 여주 잎 물 추출물(MCLW) 및 여주 잎 에탄올 추출물(MCLE) 샘플 중에서 여주 잎 물 추출물(MCLW)가 가장 높은 항지방 생성 잠재력이 있는 것으로 확인되었다. 따라서, 여주 잎 물 추출물(MCLW)가 3T3-L1 세포의 지방세포로의 분화를 차단되는 것임을 알 수 있다.

[107] <실시예 3> 용매별 추출물의 생리활성

[108] Vion UPLC™ 시스템(Vion, Waters, Milford, MA, USA)이 사용되었고 LC 조건은 Acquity UPLC BEH C18 컬럼(2.1×100 mm, 1.7 μm; Waters, Milford, MA, USA)에서 9분 이내에 최적화되었다. 온도는 55°C로 설정하였다. 유속은 0.35 mL/분으로 설정되었다. 이동상은 0.1% 포름산이 포함된 물(FA)에 0.1% 아세토니트릴(ACN)을 첨가하여 사용하였다. 분광계는 음의 모드에서 전자분무 이온화(ESI)와 함께 사용되었다. MS 작동 조건은 모세관 전압 2.5 kV, Sample cone 20 V, 이온 소스 온도(Ion source temperature) 200°C, 탈용매 온도 400°C, Cone gas 30 L/h, 탈 용매 가스 900 L/h, 스캔 시간 0.2초, 스캔 범위 50 내지 1500 m/z, 충돌 에너지 램프 10 내지 30 eV(50 내지 1000m/z)으로 사용하였다. MarkerLynx 소프트웨어(Waters, Milford, MA, USA)는 UPLC-Q-TOF MS(Waters, Milford, MA, USA)로 분석된 MS 데이터 세트를 수집하였고, 정규화 및 정렬에 사용하였다. 스펙트럼은 모두 내부 표준(Terfenadine[M + H] 및 Zidovudine[M - H])으로 표준화시켰다. 인간 대사체 데이터베이스(HMDB)(www.hmdb.ca), METLIN 데이터베이스(Metlin.scripps.edu), Chemspider(www.chemspider.com)의 문헌을 참조하여 대사산물을 식별하였다. 분석의 신뢰도를 위해 각각 세 번씩 수행하였다.

[109] 다양한 여주 추출물의 화학 성분을 UPLC-Q-TOF MS를 사용하여 분석하였다. 추출물을 사용하여 이온 흐름 크로마토그램을 나타낸 것이 도 3이다. 각 추출물의 화합물, 주로 플라보노이드, 트리테르펜 및 페놀산을 측정하여 그 결과를 표 1에 나타냈다. 여주 잎 물 추출물(MCLW)을 분석한 결과가 도 3a이다. 용매의 극성이 증가함에 따라 추출물의 총 플라보노이드와 총 페놀의 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 특히, 여주 잎 물 추출물(MCLW, 표 1)은 여주 잎 에탄올 추출물(MCLE, 표 2) 및 여주 잎 헥세인 추출물(MCLH, 표 3)보다 훨씬 높은 농도로 히드로페룰산, Kaempferol 3-glucuronide 및

($\pm$)-30,40-methylenedioxy-5,7-dimethylepicatechin을 함유하는 것으로 나타났다(도 3, 표 1).

[110] [표1]

피크 (Peak)	정체시간 (Retention Time)	MCLW 종류	검출 질량 (m/z)	이온 단편 (m/z)
1	0.68	Hydroferulic acid	195.08	165, 133
2	0.91	N-(1-deoxy-1-fructosyl)leucine	292.14	274
3	1.06	Chlorogenic acid	353.08	323, 191, 129
4	1.37	Abscisic acid	263.13	188, 144
5	1.43	Hyperforin	535.37	257, 243
6	1.70	Rosmaricine	344.09	150
7	1.85	Biotin	243.08	200, 156
8	2.18	N-[2-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) ethyl]cinnamide	282.12	150, 133
9	2.73	Kaempferol 7-arabinoside	417.16	357, 215, 135
10	2.91	Alpha, alpha-trehalose	341.14	135, 119
11	3.19	Kaempferol 3-glucuronide	461.14	399, 285
12	3.36	Orientin 7,30-dimethyl ether	475.16	445, 299
13	3.53	Momordicinin	437.26	421, 409, 205
14	3.67	5-(6-hydroxy-3,7-dimethyl-2,7-oct adienyloxy)-7-methoxycoumarin	343.26	327, 301
15	3.76	Phytolacca saponin G	663.47	645, 601, 501
16	4.06	Phytolacca saponin G	663.47	645,631,485
17	4.21	(±)-3',4' -methylenedioxy-5,7-dimethylepic atechin	329.28	229
18	4.34	Myrianthic acid	503.41	487, 485
19	4.73	Momordicine III	647.47	485, 99
20	4.93	Goyaglycoside b	647.47	485

21	4.96	5beta,19-epoxy-19-methoxycucurbita-6,23(E)-diene-3beta,25-diol	485.40	469, 455
22	5.20	Momordicin I	471.42	99
23	5.48	5beta,19-Epoxy-19-methoxycucurbita-6,23(E)-diene-3beta,25-diol	485.40	455, 325
24	5.54	Madasiatic acid	487.42	471
25	5.69	Vernolic acid	295.27	277, 195, 99

[111] 또한, 하기 표 2에서 나타낸 것과 같이 트리테르페노이드 사포닌(Momordicin, Momordicine III, Momordicin I, Momordicoside F1, Momordicin II, Momordicoside K, Momordicoside F2 및 Momoridin B)은 주로 여주 잎 에탄올 추출물(MCLE)에 집중되어 있었다.

[112] [표2]

피크 (Peak)	정체시간 (Retention Time)	MCLE 종류	검출 질량 (m/z)	이온 단편 (m/z)
1	0.83	Isorhamnetin 7-rhamnoside	461.13	357, 285, 283
2	0.98	Diosmetin 7-glucuroside	475.15	445, 299, 243
3	1.48	6-hydroxyluteolin 7,3', ,4'-trimethyl ether	343.25	327, 283, 243
4	1.58	Apigenin 6-C-arabinosyl-8-C-glucoside	695.49	663, 519
5	1.69	Luteolin	285.08	269, 135
6	1.87	Ent-epiafzelechin(2a->7,4a->8)epi afzelechin 3-(4-hydroxybenzoic acid)	663.46	645
7	2.13	3,3',5-trihydroxy-4'-methoxy-6,7- methylenedioxyflavone 3-glucuronide	519.40	501, 343, 327
8	2.33	Apigenin	269.07	227, 151, 117
9	2.41	5-hydroxy-7,3',4'-trimethoxy-8-met hylisoflavone 5-neohesperidoside	649.48	631, 487
10	2.46	Diosmetin	299.06	284, 256
11	2.81	5,7-dihydroxy-8,4'-dimethoxyisofl avone	329.27	229, 139
12	3.04	Phytolaccoside E	825.57	617, 487
13	3.36	5beta,19-Epoxy-19-methoxycucurb ita-6,23(E)-diene-3beta,25-diol	485.39	455
14	3.80	Goyaglycoside b	647.46	631, 485, 455
15	3.89	Momordicoside F1	631.47	469
16	4.05	Goyaglycoside c	661.45	645, 631, 499

17	4.14	Momordicin II	633.45	615, 471, 455
18	4.34	Momordicine III	647.46	617, 485
19	4.45	Momordicoside K	647.46	617
20	4.61	Dihydroxystearic acid	315.29	297
21	4.76	Momordicoside F2	617.45	527, 455
22	4.90	Momoridin B	631.47	469, 455
23	5.33	Nonadecanoic acid	297.28	279
24	6.21	1,17-heptadecanediol	271.26	225
25	6.82	Retinoic acid	299.30	253, 99

[113] 하기 표 3은 여주 잎 헥세인 추출물(MCLH)의 생리활성 결과이다.

[114] [표3]

피크 (Peak)	정체시간 (Retention Time)	MCLH 종류	검출 질량 (m/z)	이온 단편 (m/z)
1	1.17	Biotin	243.15	225, 199
2	1.48	Biotin	243.15	225, 197
3	1.97	Cetyl alcohol	241.13	197, 127, 125, 99
4	2.81	5,7-dihydroxy-8,4*?***?-dimethoxyisoflavone	329.27	229
5	3.36	3,3',4',5,6,8-hexamethoxyflavone	401.23	375, 329, 313, 209
6	3.96	5,7-dihydroxy-3',4'-dimethoxy-5'-prenylflavanone	383.22	353, 311
7	4.04	2',3,4',5-tetrahydroxy-4-prenylstilbene	311.26	293, 265
8	4.18	Cycloheterophyllin	501.38	461, 311
9	4.46	Medicarpin 3-O-(6'-malonylglucoside)	517.38	499, 487, 471, 311
10	4.66	Limocitrin 3-rhamnoside	491.40	475, 371, 313
11	4.98	Phytal	293.24	277, 263
12	5.36	Vernolic acid	295.26	279
13	5.86	Madasiatic acid	487.40	471, 425
14	5.99	5beta,19-epoxy-19-methoxycucurbita-6,23(E)-diene-3beta,25-diol	485.38	455, 427, 423
15	6.23	5beta,19-epoxy-19-methoxycucurbita-6,23(E)-diene-3beta,26-diol	485.38	455
16	6.54	Myrianthnic acid	503.40	487

[115] <실시예 4> 혈액 분석

[116] 케이지에서 순응을 시작한 1주일 후, 여주 잎 추출물의 효과를 확인하기 위하여 마우스를 무작위로 두 그룹으로 나누었다. 해당 두 그룹은 정상 식이(대조군, 10% 지방, 70% 탄수화물, 20% 단백질, 총 3.85 kcal/g; D12450B, Research Diets

Inc., New Brunswick, NJ, USA, n=10) 및 고지방식이(HFD, 60% 지방, 20% 탄수화물, 20% 단백질, 총 5.24 kcal/g; D12492, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, 미국, n=30) 2가지 군이다. 마우스의 음식 섭취량을 매일 기록하였고, 체중은 일주일에 한 번 평가하였다.

- [117] 8주 후, 체중이 대조군보다 20% 더 높은 마우스를 선택하여 무작위로 세 그룹(n=8)으로 나누어 처리하였다. 4주 동안 처리된 3가지 군은 0.9% 식염수 처리된 고지방식이 섭식 마우스, 고지방식이 및 여주 잎 물 추출물(MCLW)이 혼합된 경구 투여량 200 mg/kg/d의 마우스 및 고지방식이+오르리스타트(Orlistat)가 혼합된 경구 투여량 60 mg/kg/d의 마우스로 분류된다. 대조군(n=8) 마우스는 정상 식이로 전환하고 4주 동안 비히클(Vehicle)을 처리하였다. 오르리스타트(Orlistat)는 양성 대조군으로 사용되었다. 마우스는 12주 후 하루 동안 금식시킨 후 다음 실험에 사용하였다(도 1c). 추가 분석을 위해 혈액 샘플을 수집하였다.
- [118] 심장 천자를 사용하여 혈액 샘플을 수집하고, 혈청을 원심분리(20분 동안 3000 rpm)로 분리하고 추가 분석이 있을 때까지 -80°C에서 보관하였다. 자동 분석기(Abaxis VETSVAN VS2 Chemistry Analyzer, Union City, CA, USA)를 사용하여 혈중 요소 질소(BUN), 알라닌 아미노전이효소(ALT), 알칼리성 인산분해효소(ALP), 아스파르테이트 아미노 전이효소(AST) 및 혈청 알부민(ALB). 혈청 총콜레스테롤(TC), 저밀도 지단백 콜레스테롤(LDL), 고밀도 지단백 콜레스테롤(HDL), 중성지방(TG)을 측정하기 위해 급속혈중지질분석기(OSANG Healthcare Lipid Pro, 안양, 대한민국)를 사용하였다. 혈청 렙틴은 ELISA 렙틴 키트(Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하여 정량화하였다.
- [119] 고지방식이 섭이시 정상 식단에 비해 지방과 체중 증가되었다(도 4a). 대조군에 비해 간 중량 증가 및 백색 지방 조직(내장, 피하 및 부고환)은 고지방식으로 인한 지방량의 발달을 확인하였다. 여주 잎 물 추출물(MCLW) 또는 오르리스타트(Orlistat) 처리한 군의 경우 백색 지방 조직의 무게를 상당히 감소시켰다(도 4b). 또한, 여주 잎 물 추출물(MCLW)가 생화학적 매개변수에 미치는 영향을 확인하기 위해 혈액 생화학적 분석을 수행하였다. 생화학적 분석에서 고지방식이 섭이군은 대조군보다 알라닌 아미노전이효소(ALT), 아스파르테이트 아미노 전이효소(AST), 알칼리성 인산분해효소(ALP), 혈중 요소 질소(BUN), 혈청 총콜레스테롤(TC), 중성지방(TG) 및 저밀도 지단백 콜레스테롤(LDL)이 유의하게 더 높은 것으로 나타났다(도 4c, 도 4d).
- [120] 여주 잎 물 추출물(MCLW) 또는 오르리스타트(Orlistat) 군에서는 고지방식이 그룹과 비교하여 혈중 요소 질소(BUN), 알라닌 아미노전이효소(ALT), 아스파르테이트 아미노 전이효소(AST) 및 알칼리성 인산분해효소(ALP)는 크게 감소하는 것으로 나타났다(도 4c). 여주 잎 물 추출물(MCLW)과 오르리스타트(Orlistat)군은 고지방식이군에 비해 혈청 총콜레스테롤(TC),

저밀도 지단백 콜레스테롤(LDL) 및 중성지방(TG)의 혈청 수준이 유의하게 감소(도 4d), 여주 잎 물 추출물(MCLW) 또는 오르리스타트(Orlistat) 그룹의 고밀도 지단백 콜레스테롤(HDL) 수준은 고지방식이군과 비교하여 증가한 것으로 나타났다. 더욱이, 여주 잎 물 추출물(MCLW)과 오르리스타트(Orlistat)군의 렘틴 농도는 고지방식이군에 비해 매우 유의한 감소를 보여주었다(도 4e). 지질 및 렘틴은 혈장 아디포카인의 발현과 밀접하게 연관되어 에너지 섭취 조절을 하는 것으로 확인되었다. 상기의 결과에 따르면, 혈청 렘틴이 지방 조직의 감소에 중요한 역할을 함을 시사한다.

- [121] 체지방량에 대한 여주 잎 물 추출물(MCLW)의 효과는 방사선 흡수 계측법(DXA, Dual-energy X-ray absorptiometry)로 계산되었다. 4주 동안의 여주 잎 물 추출물(MCLW) 보충시 고지방식이에 의해 유도된 비만 마우스에서 지방량과 평균 지방 세포 면적을 유의하게 감소시켰다($p < 0.01$)(도 5). 또한, 여주 잎 물 추출물(MCLW)의 섭이시 감소된 지방량을 확인하기 위하여 오일레드 O 염색 및 H&E 염색으로 간의 조직학적 분석을 수행하였다. 항비만 및 간 보호 효과가 예측된 후, 연구 결과는 간에서 지질 축적이 고지방식이군에서 유의하게 증가한 것으로 나타났다(도 6). 반대로, 여주 잎 물 추출물(MCLW) 또는 오르리스타트(Orlistat) 보충은 여주 잎 물 추출물(MCLW) 또는 오르리스타트(Orlistat) 그룹에서 간의 지방 세포 영역을 유의하게 감소시켰다(도 6).

- [122] <실시예 5> 지방 대사 경로에 대한 여주 잎 물 추출물(MCLW)의 효과

- [123] 지방조직(부고환, 피하, 내장, 견갑골)의 무게를 측정하고 부고환 지방과 간을 채취하여 액체 질소에 동결시킨 다음 추가 검사를 위해 -80°C 에서 보존하였다. 조직학적 분석을 위해 부고환 지방과 간 조직의 절편을 10% 포름알데히드로 고정하였다. 총 RNA는 마우스 간 및 부고환 지방 조직에서 수집하여 qPCR을 수행하였다. PCR 반응은 AccuPower PCR PreMix(Bioneer, Chungwon, Korea)와 Veriti™ 96-Well Thermal Cycler(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. 본 연구에 사용된 프라이머는 이노텍(대전, 한국)에서 합성하였다(표 4). GAPDH는 qPCR에서 내부 참조로 선택되었으며 유전자 발현의 상대적 정량화는 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 방법으로 결정되었다.

[124] [표4]

유전자 이름		시퀀스(sequence)
ATGL	Forward	5-GAC CTG ATG ACC ACC CTT TCC-3
	Reverse	5-TGC TAC CCG TCT GCT CTT TCA-3
TGH	Forward	5-ATT GCT GGT CTG GTT GCT ACT CT-3
	Reverse	5-CTT GCT TGT TGA TGC CCA CTA T-3
HSL	Forward	5-AAG GAC TCA CCG CTG ACT TCC-3
	Reverse	5-GCC TGT CTC GTT GCG TTT GTA-3
UCP3	Forward	5-ACC CGA TAC ATG AAC GCT CC-3
	Reverse	5-TCA TC CGT TCC AAG CTC CC-3
CPT-I	Forward	5-TGT GTG AGG ATG CTG CTT CC-3
	Reverse	5-CTC GGA GAG CTA AGC TTG TC-3
C/EBP α	Forward	5-CGT CTA AGA TGA GGG AGT C-3
	Reverse	5-GGC ACA AGG TTA CTT CCT-3
PPAR γ	Forward	5-GAA AGA CAA CGG ACA AAT CAC-3
	Reverse	5-GAA ACT GGC ACC CTT GAA-3
FAS	Forward	5-CTT GGG TGC TGA CTA CAA CC-3
	Reverse	5-GCC CTC CCG TAC ACT CAC TC-3
ACS	Forward	5-AAG CCC AGA GTT ACG AGT AT-3
	Reverse	5-ACA CAG GAA TAG AGG AGT TCT-3
CYP7A1	Forward	5-CTT CAT CAC AAA CTC CCT GTC-3
	Reverse	5-TCA CTT GGG TCT ATG CTT CTG-3
GAPDH	Forward	5-GCA CAG TCA AGG CCG AGA AT-3
	Reverse	5-GCC TTC TCC ATG GTG GTG AA-3

- [125] 냉동 마우스 간 및 부고환 지방 조직을 액체 질소에서 균질화하였다. 웨스턴 블롯 분석을 위해 1% PI를 함유하는 RIPA 용해 완충액에서 조직을 용해시켰다. 세포 용해물을 얼음 위에서 1시간 동안 배양하고 균질물을 13,000 rpm에서 20분 동안 4°C에서 원심분리하였다. 웨스턴 블로팅은 앞서 설명한 대로 수행되었다.
- [126] 아데닐산 활성화 단백질 키나제 K(AMPK, Adenylate-activated protein kinase K), 지방 트리글리세리드 리파제(ATGL), 트리아실글리세롤 가수분해효소(TGH), 호르몬 민감성 리파제(HSL), 카르니틴 팔미토일 트랜스퍼라제 I(CPT-I) 및 돼지 분리 단백질 3(UCP3)의 mRNA 및 단백질 수준을 측정하였다. 여주 앞 물

추출물(MCLW)는 지방 트리글리세리드 리파제(ATGL), 트리아실글리세롤 가수분해효소(TGH), 호르몬 민감성 리파제(HSL), 돼지 분리 단백질 3(UCP3) 및 카르니틴 팔미토일 트랜스퍼라제 I(CPT-I) mRNA 수준(도 7a~e)과 고지방식이+여주 잎 물 추출물(MCLW)에서 아디포넥틴 및 아데닐산 활성화 단백질 키나제 K(AMPK) 단백질 수준으로 표시된 것처럼 지방산 대사 mRNA와 단백질 수준을 증가시켰다(도 8a~c).

- [127] 또한, 여주 잎 물 추출물(MCLW) 보충시 지방 생성 효소 및 조절 인자 활성화 수용체 γ (PPAR γ), 콜레스테롤 7 α -하이드록실라제(CYP7A1), 아실-CoA 합성 효소(ACS), 아세틸조효소A 카르복실라아제(ACC) 및 지방산 합성 효소(FAS)에 대해 mRNA 및 단백질 농도를 측정하여 항비만 효과에 대해 분석하였다. 여주 잎 물 추출물(MCLW) 처리는 CCAAT/인핸서 결합 단백질(C/EBP α), 조절 인자 활성화 수용체 γ (PPAR γ), 지방산 합성 효소(FAS), 아실-CoA 합성 효소(ACS) 및 콜레스테롤 7 α -하이드록실라제(CYP7A1)(도 7f~j)의 mRNA 수준과 CCAAT/인핸서 결합 단백질(C/EBP α), 스테롤 조절 요소 결합 단백질-1c(SREBP-1c), 조절 인자 활성화 수용체 γ (PPAR γ), 지방산 합성 효소(FAS)와 관련된 단백질 농도가 감소하는 것으로 나타났다(도 8). 여주 잎 물 추출물(MCLW) 그룹은 아데닐산 활성화 단백질 키나제 K(AMPK) 경로에서 주요 분자의 발현 수준이 더 높았다(도 8).

[128] <준비예3> 여주 추출물의 제조

- [129] 상기 준비예1에서 준비한 시료 중 여주 잎을 증류수를 용매로 이용하여 제조한 여주 잎 추출물을 사용하였다.

[130] <준비예 4> 실험동물 조건

- [131] 실험동물의 준비는 도 10을 참조하여 수행하였다. 9주령 C57BL/6 수컷 마우스를 나라바이오 동물센터(나라바이오텍, 서울, 한국)에서 구입하여 실험시설에서 1주일 동안 적응시킨 후, 아스펜 칩이 부착된 투명 플라스틱 케이지 내부에 4마리씩 그룹으로 수용하고, 마우스를 무작위로 두 그룹으로 나누어 깨끗한 병원균이 없는 조건에서 표준 마우스 일반식(Chow diet)과 별도의 처리가 되지 않은 수돗물을 공급하였다. 해당 두 그룹은 정상 식이(CON, 총 에너지 중 10% 지방, 70% 탄수화물, 20% 단백질, 총 3.85 kcal/g; D12450B, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA, n=10) 및 1.25% 콜레스테롤을 포함하는 Western diet (총 에너지 중 42% 지방, 42.7% 탄수화물, 15.2% 단백질, 총 4.51 kcal/g, D120528, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA, n=30)를 급여하였다.

- [132] WD군은 당분의 섭취를 높이기 위해 23.1g/L d fructose (Sigma-Aldrich, F0127) 및 18.9g/L d-glucose(Sigma Aldrich, G8270)을 물에 녹여 자유롭게 음용할 수 있게 하였다. 간 섬유증을 유발시키기 위해 CCl₄(Sigma-Aldrich, 289116-100ML)를 0.2 μ l (0.32 μ g/g) 1주일에 1회 복강주사하였다. 6주간 사료와 CCl₄를 투여한 뒤 실험군인 WD+ 샘플 투여군은 hydroferulic acid을 물에 녹여 그룹별 농도에 맞게

50, 100 mg/kg를 1일 1회 경구투여하였다. 양성 대조군인 WD + Silymarin 투여군은 Silymarin 10 mg/kg를 존대를 이용하여 1일 1회 경구 투여하였다. 섭취한 사료의 양은 매일 기록하며, 마우스별 하루 섭취량은 제한하지 않고 매일 생쥐의 몸무게를 측정하여 하이드로페룰산(hydroferulic acid)의 항비만, 항염증 효과를 검색하였다. 실험 종료 후 RNase가 제거된 수술기구로 부고환지방, 피하지방, 갈색지방, 내장지방과 간 조직을 분리하여 무게를 측정한 뒤 부고환지방과 간조직의 일부는 단백질 및 유전자 발현 분석을 위해 -80°C에 보관하고 남은 일부는 H&E 염색을 실시하기 위해 10% 포름알데히드에 보관하였다.

[133] 동물 환경은 20 내지 21°C에서 12시간의 암기를 두며, 40 내지 45%의 상대 습도로 적절하게 제어되었다. 모든 실험은 건국대학교 동물병원 동물관리위원회의 승인을 받았으며, 본 발명에 관련한 실험(KU17089)은 사용된 동물의 수와 고통을 최소화하도록 설계하였다.

[134] <실시예 6> 여주 잎에서 하이드로페룰산(HFA)의 분리

[135] 항산화 활성이 높게 나타난 여주 잎 물 추출물에서 하이드로페룰산(HFA)를 분리하였다. Vion UPLC™ 시스템(Vion, Waters, Milford, MA, USA)이 사용되었고 LC 조건은 Acquity UPLC BEH C18 컬럼(2.1×100 mm, 1.7 μm; Waters, Milford, MA, USA)에서 9분 이내에 최적화되었다. 온도는 55°C로 설정하였다. 유속은 0.35 mL/분으로 설정되었다. 이동상은 0.1% 포름산이 포함된 물(FA)에 0.1% 아세토니트릴(ACN)을 첨가하여 사용하였다. 분광계는 음의 모드에서 전자분무 이온화(ESI)와 함께 사용되었다. MS 작동 조건은 모세관 전압 2.5 kV, Sample cone 20 V, 이온 소스 온도(Ion source temperature) 200°C, 탈용매 온도 400°C, Cone gas 30 L/h, 탈 용매 가스 900 L/h, 스캔 시간 0.2초, 스캔 범위 50 내지 1500 m/z, 충돌 에너지 램프 10 내지 30 eV(50 내지 1000m/z)으로 사용하였다. MarkerLynx 소프트웨어(Waters, Milford, MA, USA)는 UPLC-Q-TOF MS(Waters, Milford, MA, USA)로 분석된 MS 데이터 세트를 수집하였고, 정규화 및 정렬에 사용하였다. 스펙트럼은 모두 내부 표준(Terfenadine[M + H] 및 Zidovudine[M - H])으로 표준화시켰다.

[136] <실시예 7> 하이드로페룰산 처리에 따른 체중 및 간 무게 변화 측정

[137] 하이드로페룰산의 지방 감소 효과를 확인하기 위해, 각 실험군 마우스의 체중을 측정하고, 간 조직을 적출하여 간 조직 무게 조직학적 변화를 분석하였다.

[138] 구체적으로, 6주의 실험기간동안 실험동물의 체중을 주 1회 씩 측정하였다. 6주간 투여 후 mouse를 에테르 마취하에 채혈 및 방혈치사시킨 다음 간을 적출하여 간의 중량을 측정하였다.

[139] 마우스에서 분리한 간조직을 10% formalin에서 하루 이상 고정하고 12시간 이상 흐르는 물에서 formalin을 세척한 후 60% ethanol, 70% ethanol, 80% ethanol 90% ethanol, 95% ethanol, 100% ethanol에서 각각 1시간씩 탈수하였다. Xylene에

1시간씩 3번의 투명과정 후 paraffin에 1시간씩 2번 침투과정을 실시하였다. 포매과정을 거쳐 약 4 μm 의 두께로 박절하여 slide 위에 조직을 얹고 건조시킨 후 hematoxylin-eosin 염색을 실시하였다. Slide의 물기를 없애고 mounting medium을 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 마무리하였다. 현미경으로 간 조직의 조직학적 변화를 확인하였다. 그 결과는 도 11에 나타내었다.

- [140] 도 11에 나타낸 바와 같이, 각 실험군 마우스의 유의미한 체중 변화는 나타나지 않았으나, NASH 군의 간은 지방 침착이 상당히 진행되어 밝은 핑크색에 가까운 것으로 나타났으며, -H&E 조직 염색사진: 간 조직에 침착된 지방구 확인되었다. 또한, 비알콜성지방간염(NASH) 유도군에 비해 하이드로페룰산(HFA) 섭취군에서 농도 의존적으로 간 조직 무게, 몸무게 대비 간 무게 및 간 조직내 지방구 크기와 수가 감소하는 것으로 나타났다.

[141] <실시예 8> 하이드로페룰산 처리에 따른 혈액 분석

- [142] 하이드로페룰산의 지방 감소 효과를 확인하기 위해, 각 실험군의 혈청 중성지방(TG), 혈청 유리지방산(FFAs), 혈청 콜레스테롤(TC), 혈청 LDL/VLDL를 측정하고, 지방조직 내 중성지방(TG), 유리지방산(FFAs), LDL/VLDL, HDL을 측정하였다.

- [143] 구체적으로, 간 조직은 간을 채취하여 무게를 측정하고 액체 질소에 동결시켜 수득하였으며, 혈청 샘플은 심장 천자를 사용하여 혈액 샘플을 수집하고, 혈청을 원심분리(20분 동안 3000 rpm)로 분리하여 수득하였다. 간 조직 및 혈청 샘플은 추가 분석이 있을 때까지 -80°C에서 보관하였다. 급속혈중지질분석기(OSANG Healthcare Lipid Pro, 안양, 대한민국)를 사용하여 혈청 중성지방(TG), 혈청 유리지방산(FFAs), 혈청 총콜레스테롤(TC), 저밀도 지단백 콜레스테롤(LDL), 초저밀도 지질단백질(VLDL), 고밀도 지단백 콜레스테롤(HDL)을 측정하였다. 그 결과는 도 12에 나타내었다.

- [144] 도 12에 나타낸 바와 같이, 비알콜성지방간 유도군에 비해 하이드로페룰산 섭취군에서 농도 의존적으로 혈청 중성지방(TG), 혈청 유리지방산(FFAs), 혈청 콜레스테롤(TC), 혈청 LDL/VLDL이 감소하는 것으로 나타났다. 또한, 지방조직 내 중성지방(TG), 유리지방산(FFAs), LDL/VLDL는 감소하였고, HDL은 증가하는 것으로 나타났다.

[145] <실시예 9> 하이드로페룰산 처리에 따른 지질 축적 측정

- [146] 하이드로페룰산의 지방 감소 효과를 확인하기 위해, 각 실험군의 동물 모델에서 간 조직을 적출하고, 지방 침착(Oil Red O) 및 간섬유화(Masson, Sirius Red) 정도를 분석하였다.

- [147] 구체적으로, Oil Red O 염색을 위해 동결시킨 간 조직을 4 μm 두께로 절단한 후 슬라이드에 표본을 고정시키고 Oil Red O (Sigma, St. Louis, MO) 시약으로 염색하여 광학현미경을 사용하여 간 내 지방 침착을 관찰하였다.

- [148] 간섬유화 정도를 분석하기 위해 마우스에서 분리한 간조직을 약 4 μm 로 자른 절편을 부착시킨 슬라이드를 담은 트레이를 100% 에탄올 3분, 95% 에탄올 3분,

70% 에탄올에 3분 동안 차례대로 담근 뒤 Weigert's hematoxylin working solution에 10분간 담아둔 후 흐르는 물에 10분간 용액을 씻어내고 증류수에 5회간 담갔다 꺼내는 것을 반복하고, Ponceau S acid fuchsin solution에 15분간 담아둔 후 증류수에 5회간 담갔다 꺼내는 것을 반복하였다. 그리고 1% phosphotungstic solution에 15분간 담아둔 후, aniline blue solution에 10 분간 담고 증류수에 3회 담갔다 꺼내는 것을 반복한 후 1% acetic acid solution에 5분간 담아두었다. 95% ethanol과 100% ethanol에 3회씩 차례대로 담갔다 꺼내는 것을 반복한 후 paraffin 제거를 위해 xylene에 3분간 2회 담아두었다. 상온에 조직을 말린 후 canada balsam (3) : xylene (1)의 비율로 제작한 mounting medium을 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 마무리하였다.

- [149] Sirius Red 염색은 마우스에서 분리한 간조직을 약 4 μ m로 자른 절편을 부착시킨 슬라이드를 담은 트레이를 100% 에탄올 3분, 95% 에탄올 3분, 70% 에탄올에 3분 동안 차례대로 담근 뒤 Sirius Red working solution에 30분간 담아둔 후 증류수에 5회간 담갔다 꺼내는 것을 반복하였다. 95% ethanol과 100% ethanol에 3회씩 차례대로 담갔다 꺼내는 것을 반복한 후 paraffin 제거를 위해 xylene에 3분간 2회 담아두었다. 상온에 조직을 말린 후 canada balsam (3) : xylene (1)의 비율로 제작한 mounting medium을 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 마무리하였다.
- [150] 현미경을 이용해 염색한 간 조직을 촬영한 뒤 imageJ(NIH, USA)를 이용하여 간의 섬유화된 정도를 비교하였다. 그 결과는 도 13에 나타내었다.
- [151] 도 13에 나타낸 바와 같이, 간 조직 염색결과 비알콜성지방간 유도군의 경우 지방 침착 및 간 섬유화가 증가하였으나, 하이드로페룰산 섭취군의 경우 농도의존적으로 지방 침착 및 간 섬유화가 억제되는 것으로 나타났다.
- [152] 이어서, 추가적으로 간조직 내 섬유화와 관련된 α -SMA, COL1A1 및 COL1A2 발현량 측정하였다.
- [153] 구체적으로, α -SMA 면역조직화학염색은 습윤챔버를 사용하여 수기로 시행하였다. 그 과정은 4 μ m 두께의 파라핀 절편을 제작하여 슬라이드에 붙이고 60°C의 슬라이드 건조기에서 충분히 건조시킨 후 자일렌에 탈파라핀, 알코올을 이용해 함수한 후 면역조직화학염색을 습윤챔버를 사용하여 시행하였다. 조직 절편을 수세 후 3% Hydrogen peroxidase 에 10분간 처리하여 내인성 과산화효소의 활성을 차단하였고, Tris buffer saline으로 세척한 후 비특이적 반응을 차단하기 위해 Block solution에 옮겨 60분간 작용시켰다. 이어 일차 항체로 α -SMA monoclonal antibody와 각각 overnight 반응시킨 다음 Tris buffer saline로 적당히 세척하고 HRP-polymer를 사용하여 2h간 반응시켰다. 그 후 DAB로 5분간 발색시킨 후 Gill's hematoxylin으로 대조염색하고 탈수, 투명을 거쳐 mount로 봉입하였다.
- [154] 간 내 α -SMA, COL1A1의 단백질 발현량을 확인하고자, 간을 LIPA buffer를 이용해 lysis하여, 단백질을 추출하고 정량하였다. 정량한 단백질 샘플을 SDS-acrylamide gel에 loading하고, 전기영동한 뒤 membrane으로 transfer 하였다.

membrane을 blocking buffer로 상온에서 2시간 blocking한 뒤 α -SMA, COL1A1 monoclonal antibody를 이용하여 4°C overnight shaking 하였다. TBST로 10분 동안 washing 한 다음 Secondary antibody를 상온에서 1시간 정도 shaking하였다. TBST(또는 PBST)로 10분 동안 washing한 뒤 ECL solution를 membrane에 뿌리고, chemi-doc을 사용하여 단백질 발현량을 측정하였다.

- [155] 간 내 COL1A1, COL1A2의 mRNA 발현량을 확인하고자 마우스의 간 조직에서 TRIzol을 이용해 RNA를 추출한 후 RNase가 처리된 0.1% DEPC water로 용해시켜 UV spectro-photometer로 260nm/280nm에서 흡광도를 측정하였다. AccuPower CycleScript RT PreMix (Bioneer, Daejeon, Republic of Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 Nuna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs, MA, USA)를 이용하여 Mic qPCR Cycler (Bio Molecular Systems, NSW, Australia)를 사용하여 qPCR을 수행하였다. 표적 유전자의 Ct(threshold cycle, 임계치 주기: 증폭이 지수적으로 일어나는 영역에서 일정 증폭 산물량이 되는 주기수)와 기준 유전자의 Ct를 이용하여 COL1A1, COL1A2의 상대적인 mRNA 발현량을 계산하였다. 그 결과는 도 14에 나타내었다.

- [156] 도 14에 나타낸 바와 같이, 간 조직내 섬유화와 관련된 α -SMA 염색 결과 비알콜성지방간 유도군에 비해 하이드로페룰산 섭취군에서 농도의존적으로 발현이 감소되는 것으로 나타났다. 또한, 간 조직 RNA 내 섬유화 관련 인자인 COL1A1, COL1A2의 발현량 측정 결과 농도의존적으로 COL1A1, COL1A2의 발현이 감소되는 것으로 나타났다. 이를 통해 하이드로페룰산의 처리가 간 조직의 섬유화를 억제하는 것을 확인하였다.

- [157] <실시예 10> 하이드로페룰산 처리에 따른 염증인자 발현량 측정

- [158] 지방간에 의해 발생한 염증 억제 효과를 확인하기 위해, 간 조직 내 염증관련 인자의 발현량을 측정하였다.

- [159] 구체적으로, CD68, F4/80, MerTK 면역조직화학염색은 습윤챔버를 사용하여 수기로 시행하였다. 그 과정은 4 μ m 두께의 파라핀 절편을 제작하여 슬라이드에 붙이고 60°C의 슬라이드 건조기에서 충분히 건조시킨 후 자일렌에 탈파라핀, 알코올을 이용해 함수한 후, 면역조직화학염색을 습윤챔버를 사용하여 시행하였다. 조직 절편을 수세 후 3% Hydrogen peroxidase 에 10분간 처리하여 내인성 과산화효소의 활성을 차단하였고, Tris buffer saline 으로 세척한 다음 비특이적 반응을 차단하기 위해 Block solution에 옮겨 60분간 작용시켰다. 이어 일차 항체로 CD68 monoclonal antibody, F4/80 monoclonal antibody, MerTK monoclonal antibody를 각각 overnight 반응시킨 다음 Tris buffer saline로 세척하고 HRP-polymer를 사용하여 2 시간 반응시켰다. 그 후 DAB로 5분간 발색시킨 후 Gill's hematoxylin으로 대조염색하고 탈수, 투명을 거쳐 mount로 봉입하였다.

- [160] 마우스에서 RNA를 추출하기 위해 간 조직에서 RNA를 추출한 후 RNase가 처리된 0.1% DEPC water로 용해시켜 UV spectro-photometer로 260nm/280nm에서

흡광도를 측정함. 역전사 반응(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)법을 이용하여 mRNA에 대한 PCR 산물을 정량화 한 뒤 PCR은 Accupower PCR Premix (Bioneer Co., Korea) tube에 역전사된 cDNA 1 μ g을 이용하여 qPCR을 수행하였으며 IL-1 β , TNA- α , MCP-1, TGF- β mRNA의 발현을 하였다.

- [161] 간 조직 내 염증과 관련된 Gas6, MerTK, ERK, p-ERK 및 TGF- β 의 단백질 발현량을 확인하고자, 간을 LIPA buffer를 이용해 lysis하여, 단백질을 추출하고 정량하였다. 정량한 단백질 샘플을 SDS-acrylamide gel에 loading하고, 전기영동한 뒤 membrane으로 transfer 하였다. membrane을 blocking buffer로 상온에서 2시간 blocking한 뒤 Gas6, MerTK, ERK, p-ERK 및 TGF- β monoclonal antibody를 이용하여 4°C overnight shaking 하였다. TBST로 10분 동안 washing 한 다음 Secondary antibody를 상온에서 1시간 정도 shaking하였다. TBST(또는 PBST)로 10분 동안 washing한 뒤 ECL solution를 membrane에 뿌리고, chemi-doc을 사용하여 단백질 발현량을 측정하였다.
- [162] 그 결과는 도 15 및 도 16에 나타내었다.
- [163] 도 15에 나타낸 바와 같이, 간 조직 내 염증과 관련된 F4/80, CD68, Gas6, MerTK, ERK, p-ERK 및 TGF- β 의 발현량 측정 결과 비알콜성지방간 유도군에 비해 하이드로페룰산 섭취군에서 농도의존적으로 상기 염증 관련 인자들의 발현이 억제되는 것으로 나타났다(도 15A 및 도 16). 또한, 간 조직 RNA 내 염증관련 인자의 발현량 확인 결과 IL-1 β , TNA- α , MCP-1 등의 발현이 감소되는 것을 확인하였다.
- [164] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

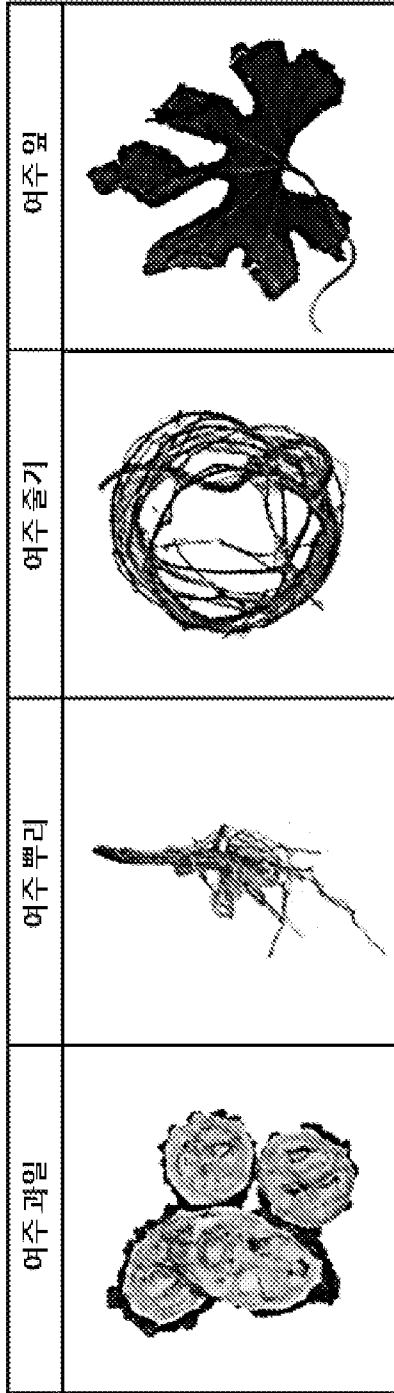
청구범위

- [청구항 1] 여주 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 알코올, 에틸아세테이트, 클로로포름 및 헥산 중에서 선택된 적어도 어느 하나의 용매로 추출된 것인, 비만 또는 지방간의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 지방간은 알코올성 지방간 또는 비알코올성 지방간인 것인, 비만 또는 지방간의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 항산화 효과가 있는 것인, 비만 또는 지방간 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 지질 축적을 억제시키는 것인, 비만 또는 지방간의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 알라닌 아미노전이효소(ALT), 알칼리성 인산분해효소(ALP), 아스파르테이트 아미노 전이효소(AST)를 증가시키는 것인, 비만 또는 지방간의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 혈액 내 혈청 콜레스테롤(TC), 중성지방(TG) 및 저밀도 지단백 콜레스테롤(LDL)을 감소시키고, 고밀도 지단백 콜레스테롤(HDL)을 증가시키는 것인, 비만 또는 지방간의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 지방 트리글리세리드 리파제(ATGL), 트리아실글리세롤 가수분해효소(TGH), 호르몬 민감성 리파제(HSL), 카르니틴 팔미토일 트랜스퍼라제 1(CPT-1) 및 돼지 분리 단백질 3(UCP 3)의 활성을 증가시키는 것인, 비만 또는 지방간의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 CCAAT/인핸서 결합 단백질(C/EBP α), 조절 인자 활성화 수용체 γ (PPAR- γ), 콜레스테롤 7 α -하이드록실라제(CYP7A1), 아실-CoA 합성 효소(ACS), 아세틸조효소A 카르복실라아제(ACC) 및 지방산 합성 효소(FAS)의 활성을 감소시키는 것인, 비만 또는 지방간의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 10] 여주 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간의 예방 또는

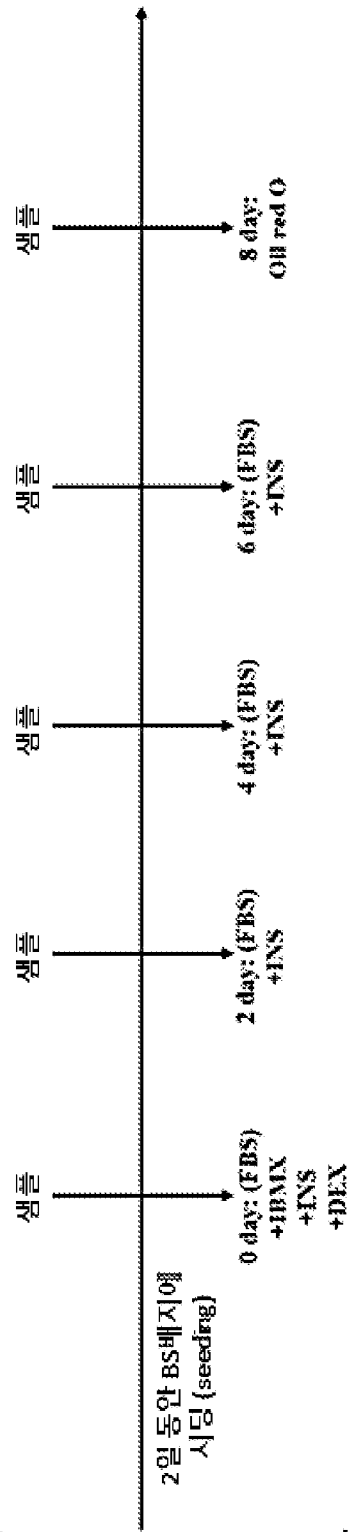
- 개선용 사료 조성물.
- [청구항 11] 여주 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 지방간의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 12] 제11항의 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 비만 또는 지방간 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 13] 제1항의 여주 잎 추출물에서 분리한 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 지방간은 비알코올성 지방간인 것을 특징으로 하는, 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 15] 제13항에 있어서,
상기 조성물은 지질 축적을 억제시키는 것인, 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 16] 제13항에 있어서,
상기 조성물은 혈청 내 LDL/VLDL 비율, 혈청 중성지방(TG), 혈청 유리지방산(FFAs) 및 혈청 콜레스테롤(TC)을 감소시키고, 고밀도 지단백 콜레스테롤(HDL)을 증가시키는 것인, 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 17] 제13항에 있어서,
상기 조성물은 간 섬유화를 억제시키는 것인, 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 18] 제13항에 있어서,
상기 조성물은 α -SMA, COL1A1 및 COL1A2의 발현을 감소시키는 것인, 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 19] 제13항에 있어서,
상기 조성물은 간 내 염증을 억제하는 것인, 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 20] 제13항에 있어서,
상기 조성물은 F4/80, CD68, Gas6, MerTK, ERK, p-ERK 및 TGF- β 의 발현량을 감소시키는 것인, 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 21] 제13항에 있어서,
상기 조성물은 IL-1 β , TNA- α , MCP-1의 발현량을 감소시키는 것인, 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 22] 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간 또는 지방간염 예방 또는 개선용 사료 조성물.
- [청구항 23] 하이드로페룰산(hydroferulic acid)을 유효성분으로 포함하는 비만, 지방간

또는 지방간염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
[청구항 24] 제23항의 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 지방간 예방 또는 치료 방법.

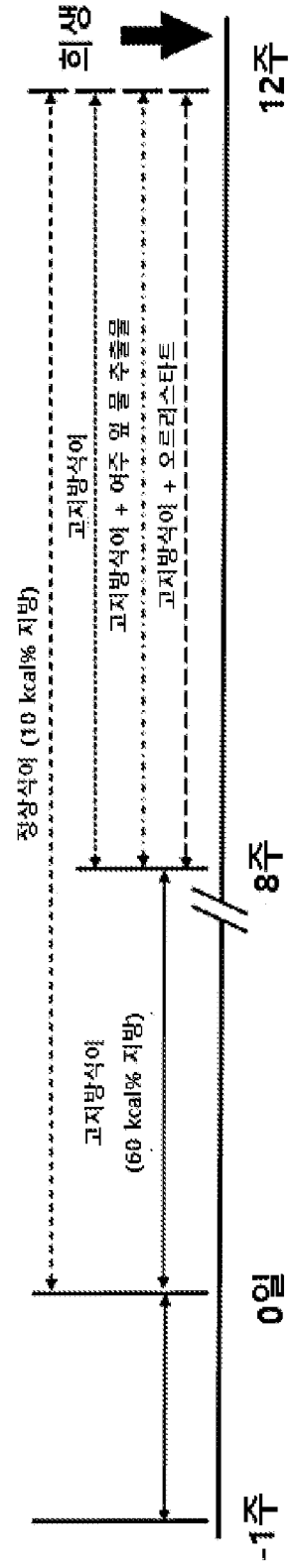
A



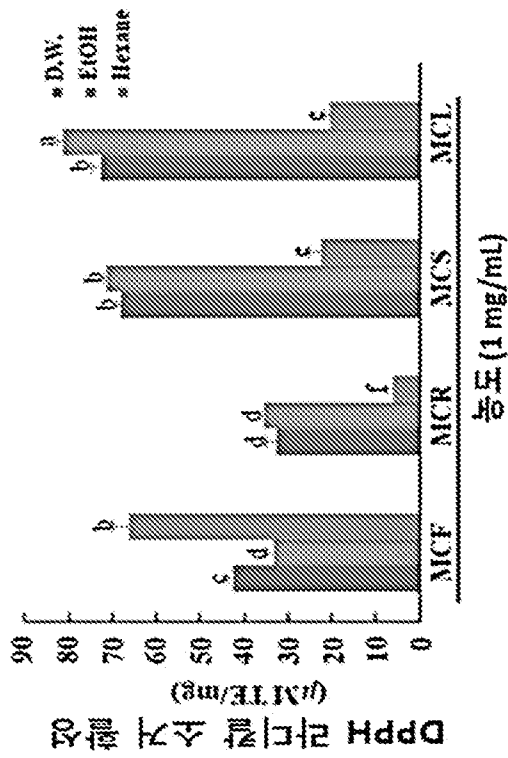
B



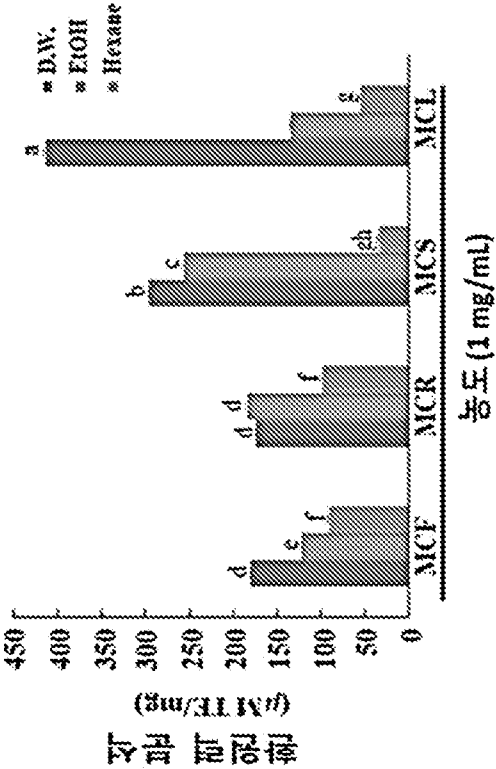
C



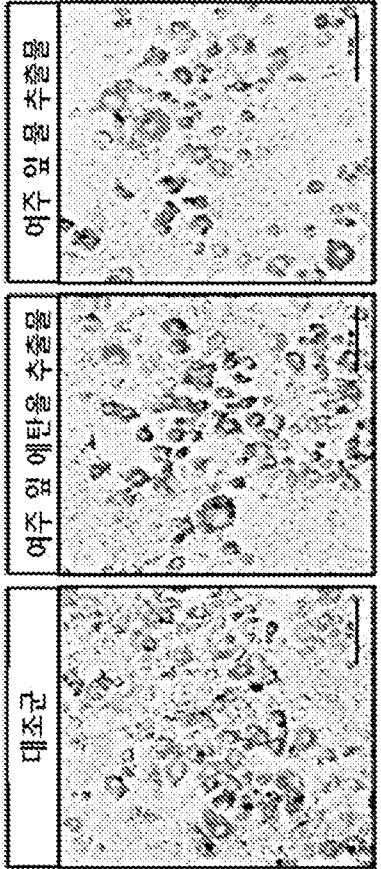
A



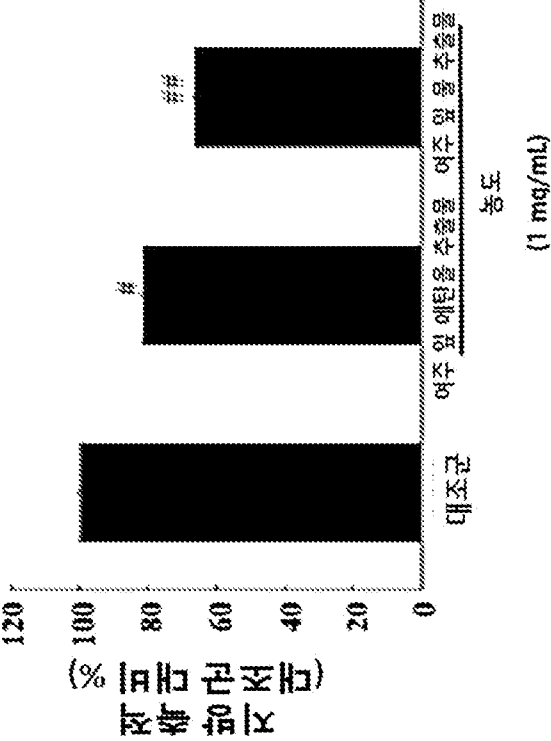
B

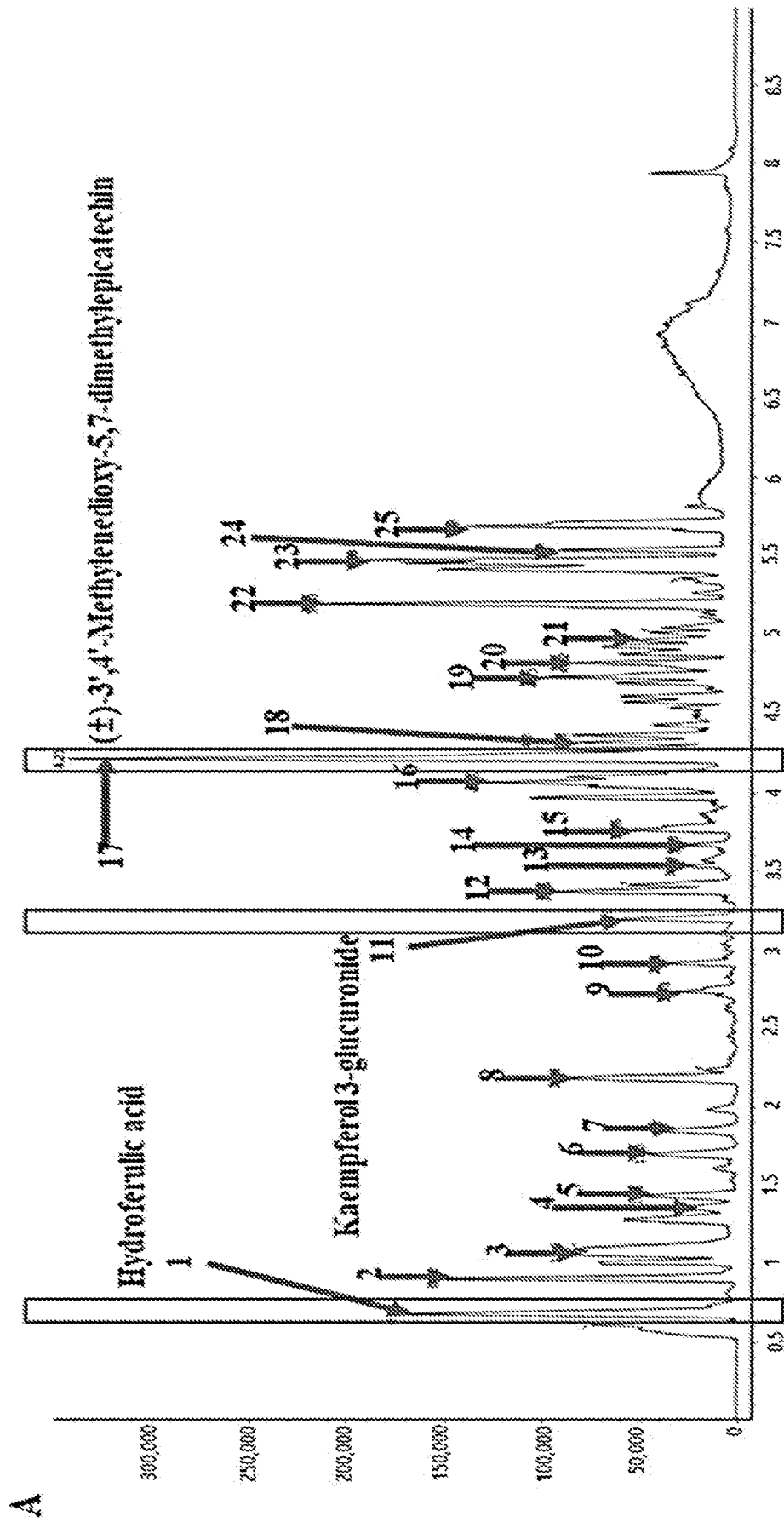


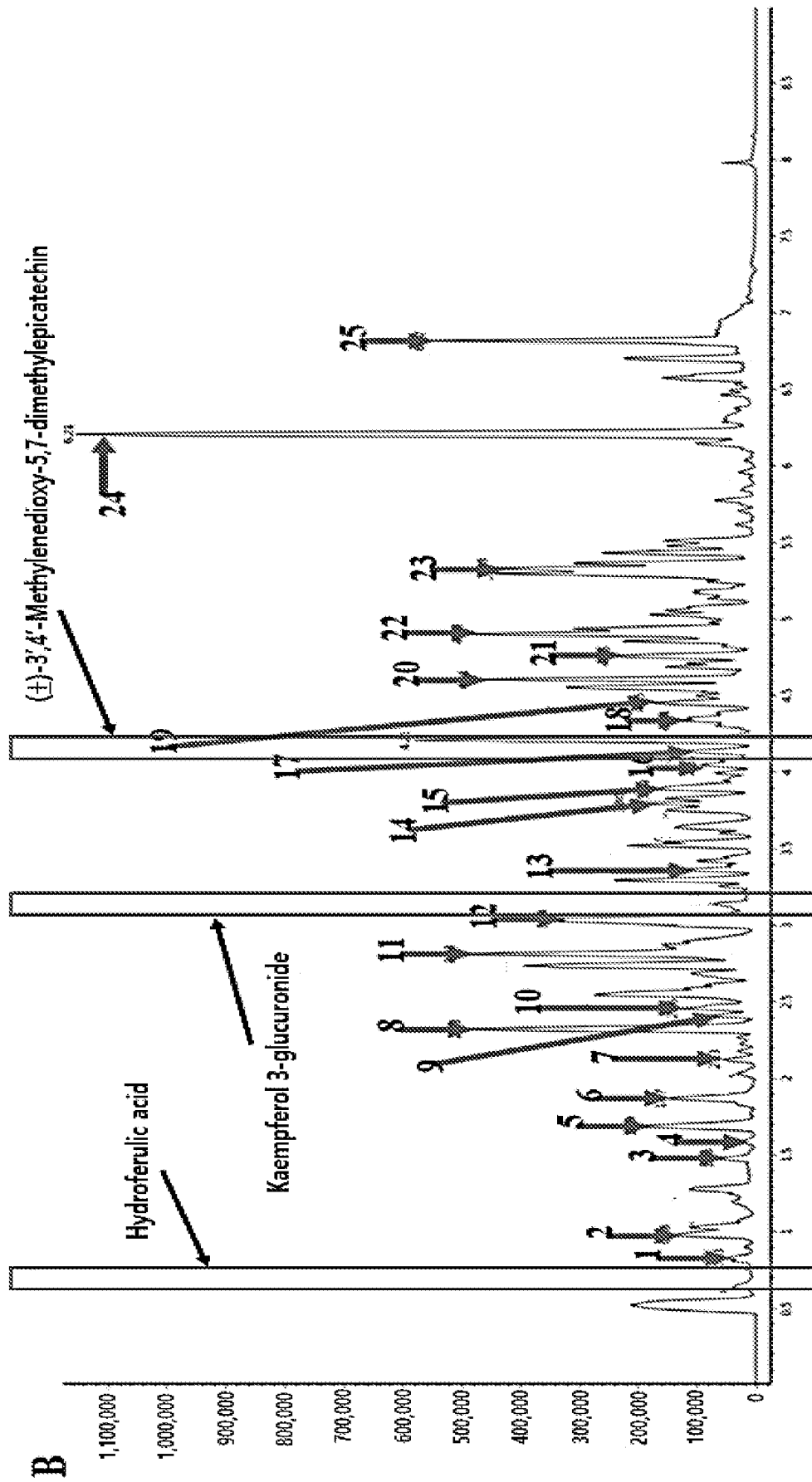
C

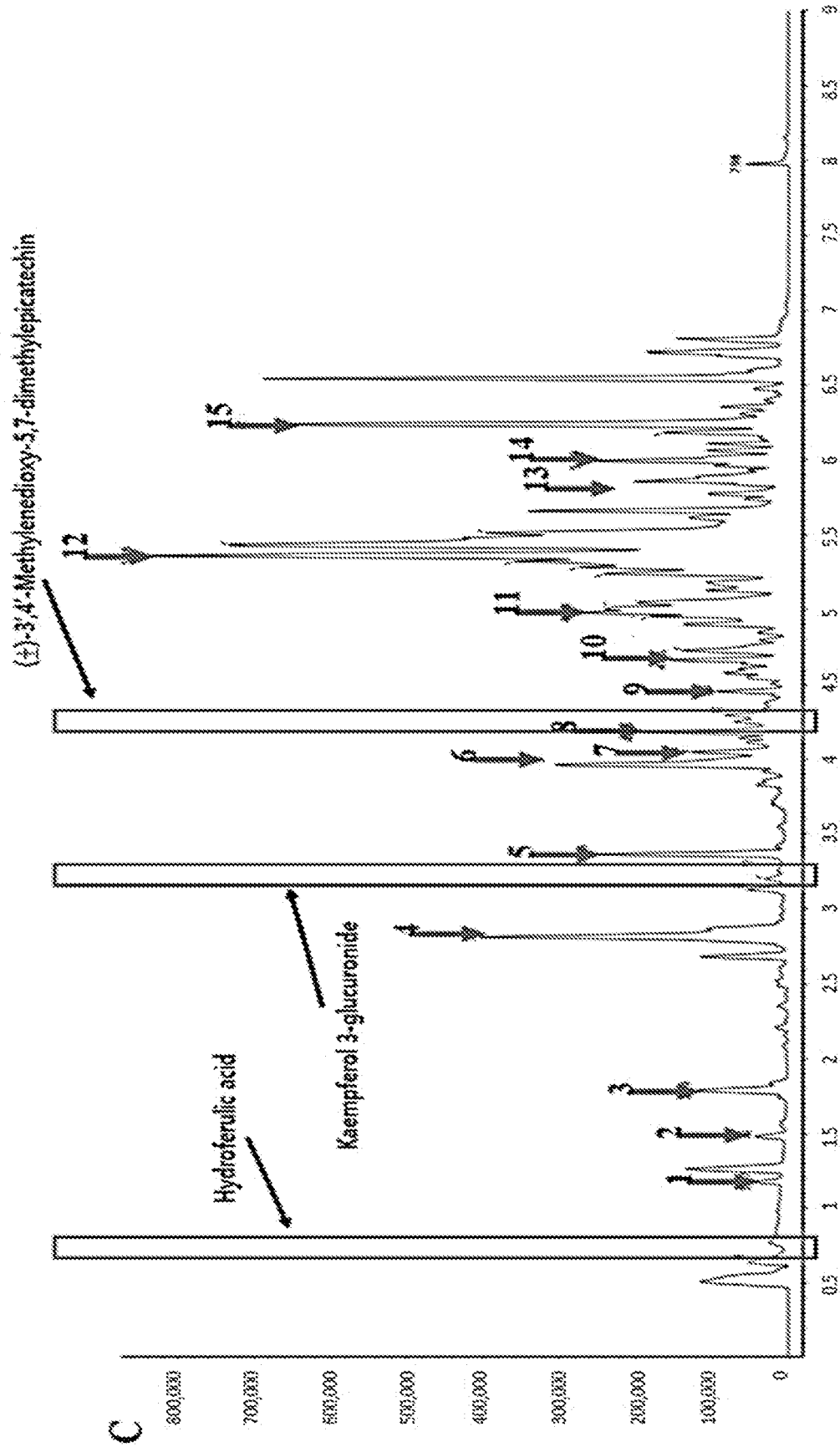


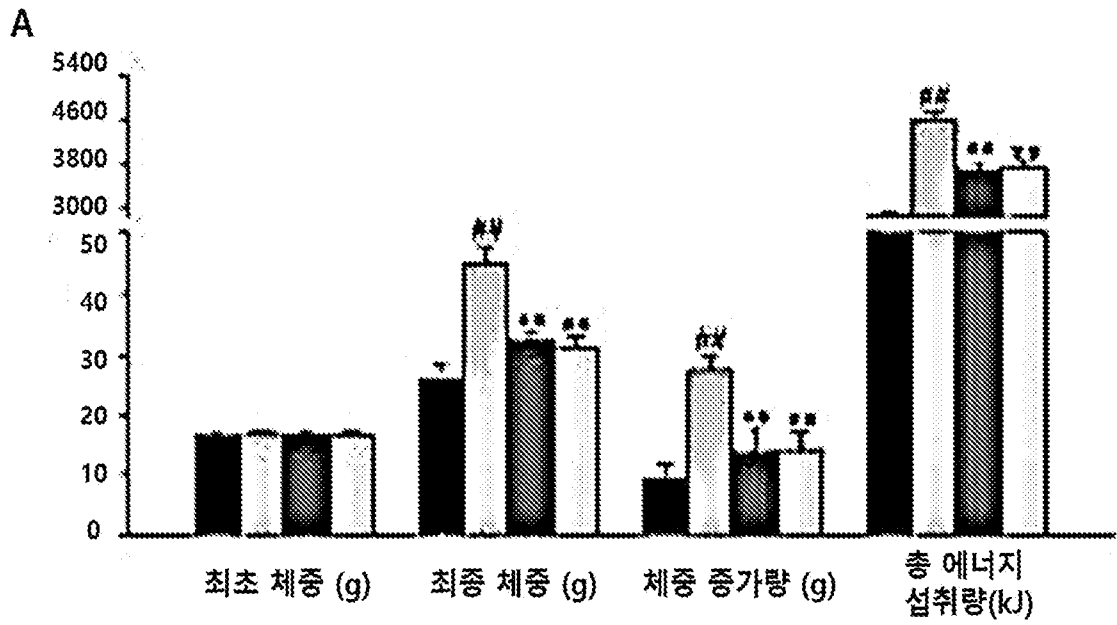
D



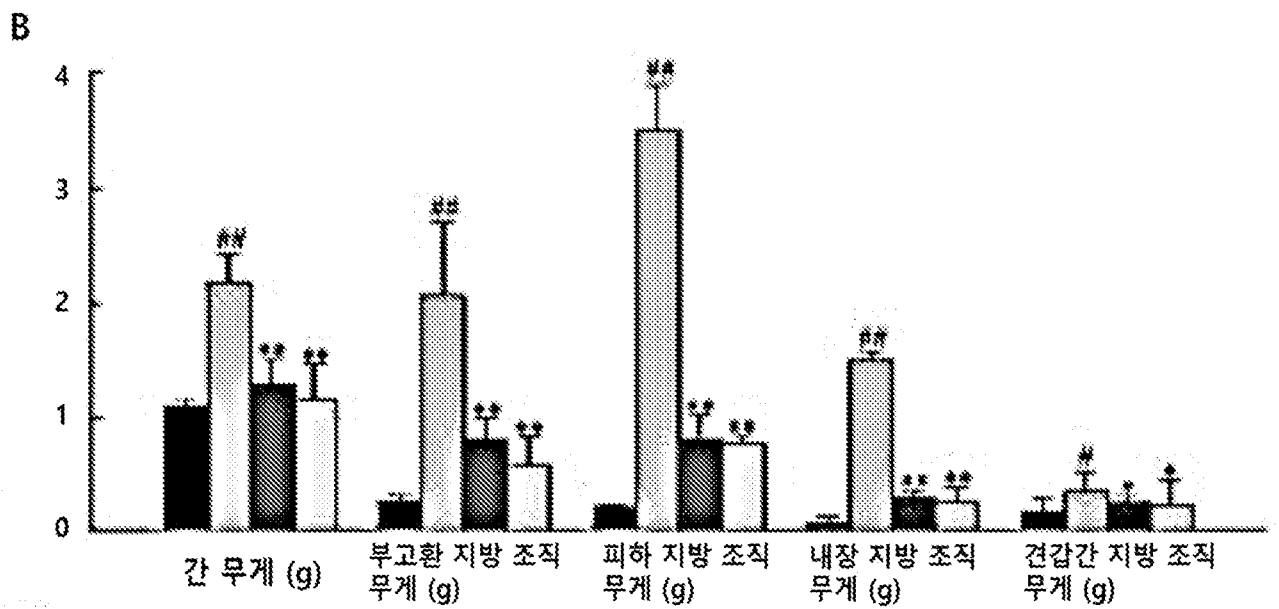


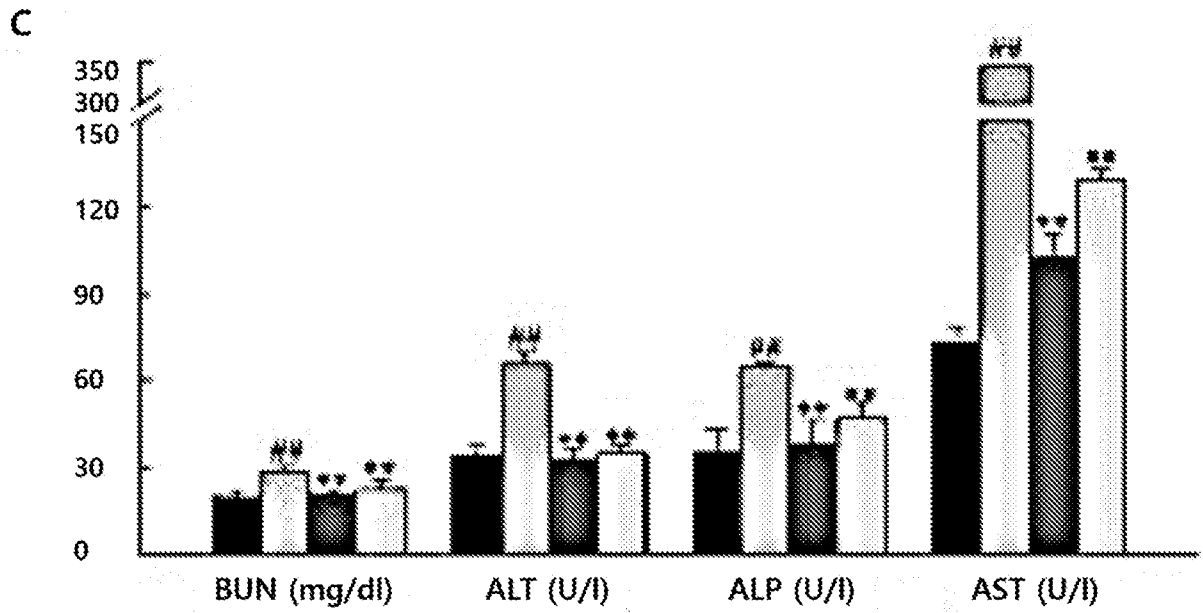




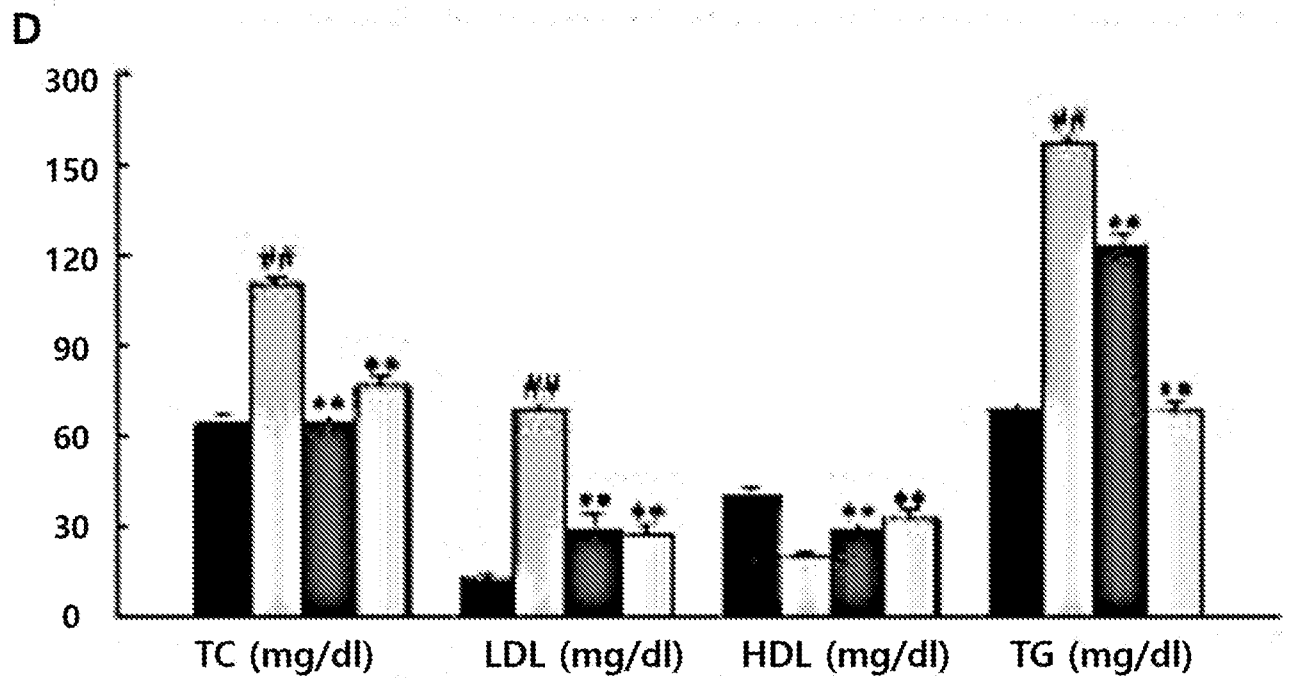


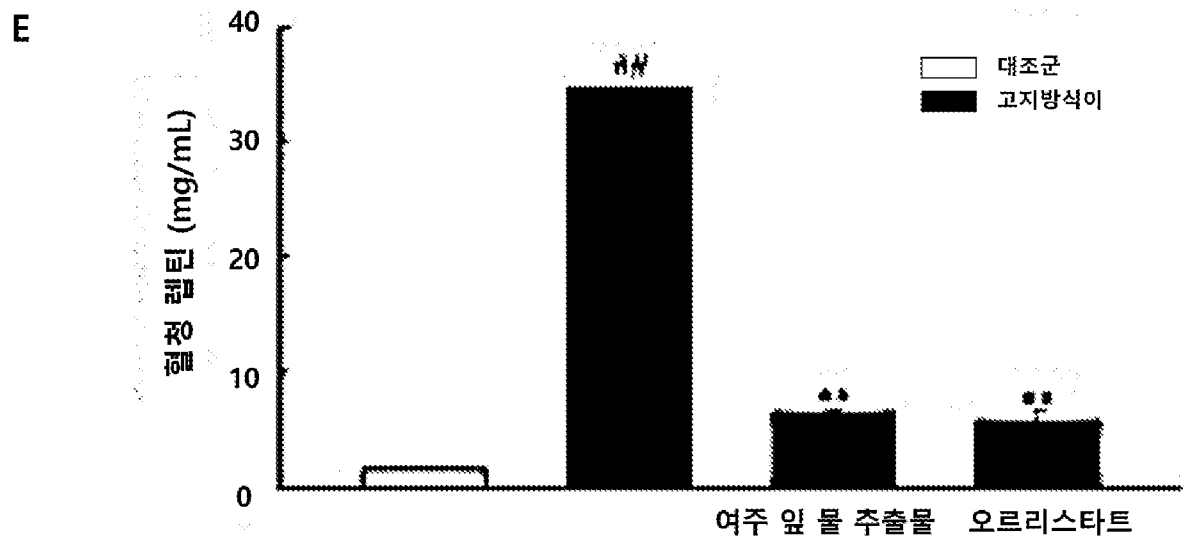
[도 4b]



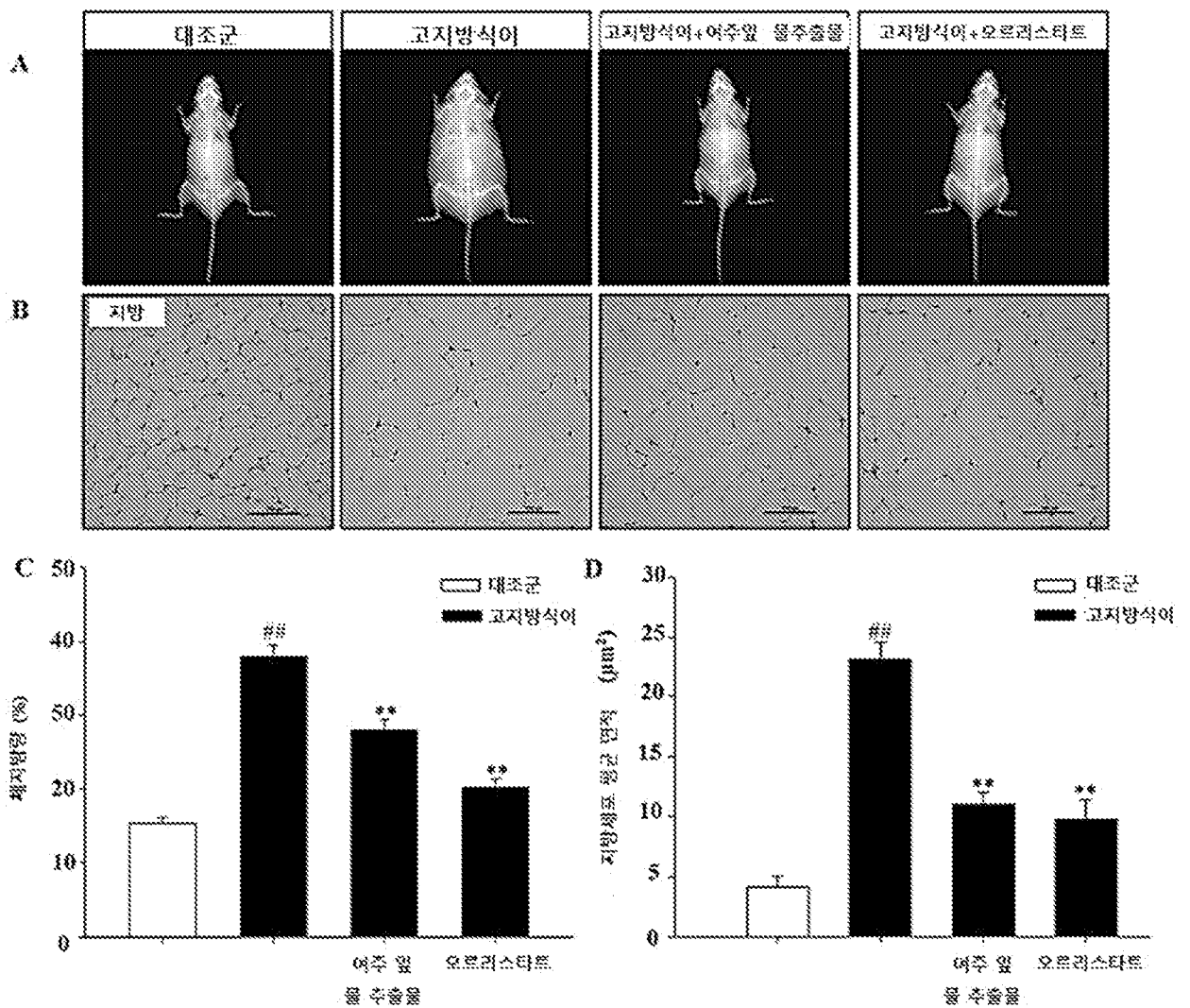


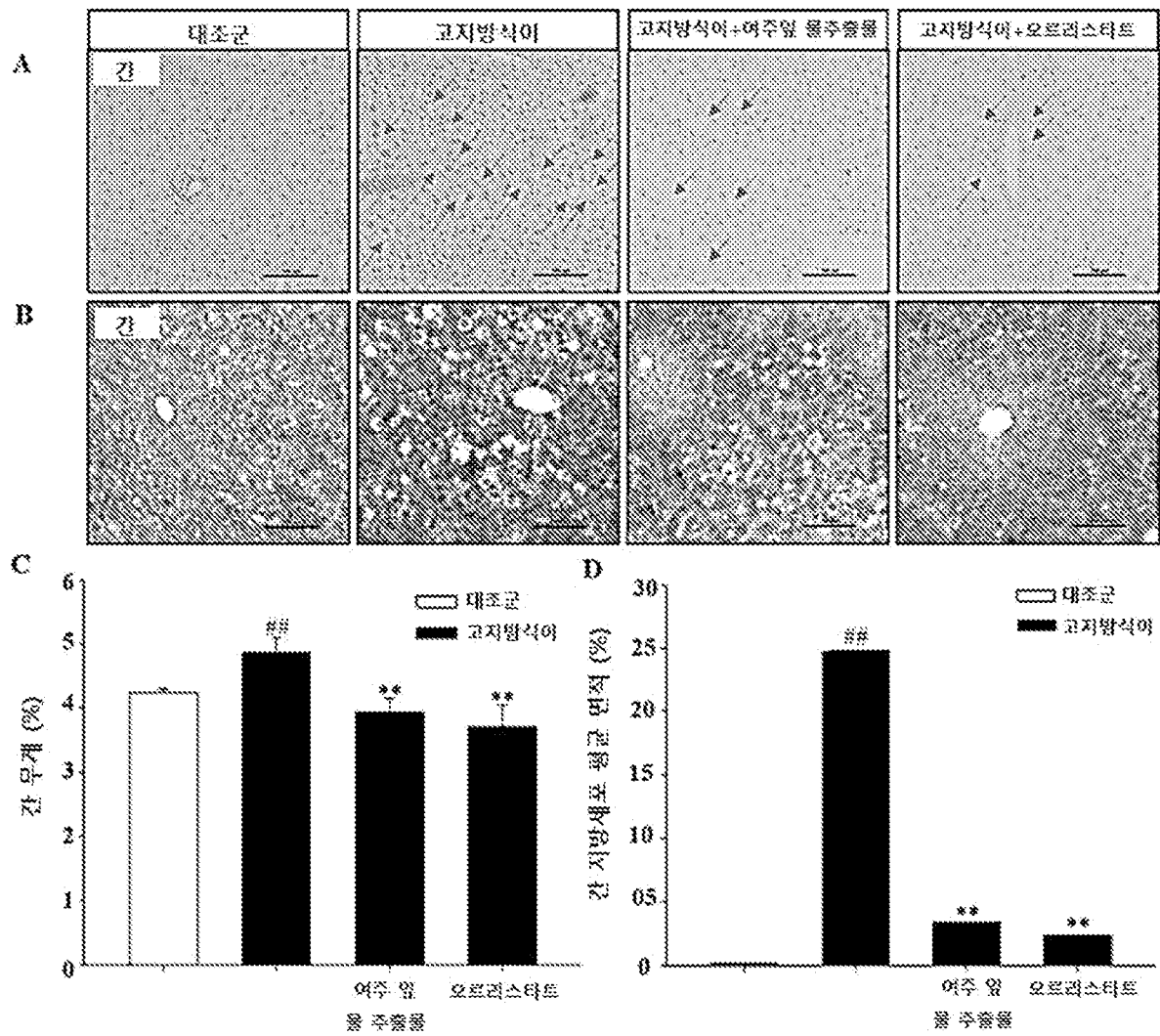
[도4d]



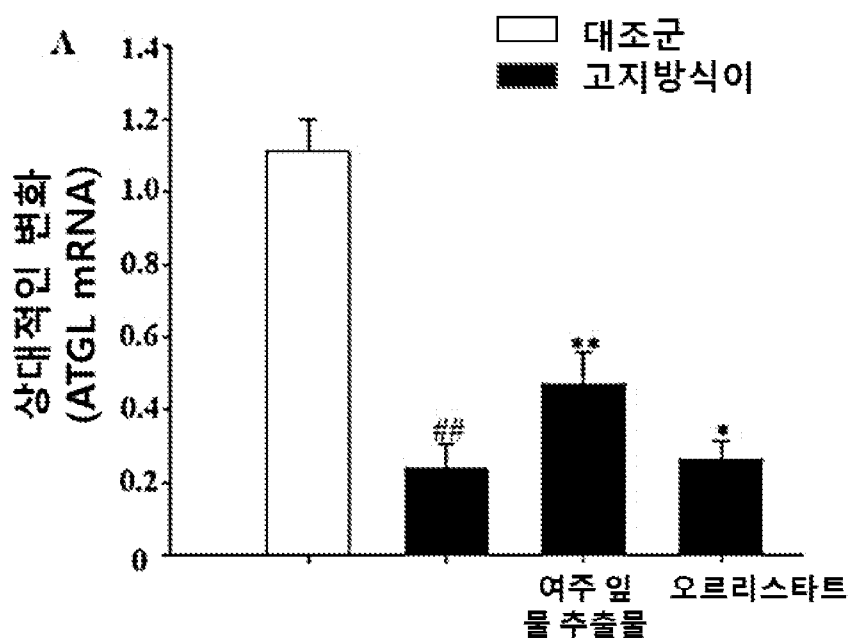


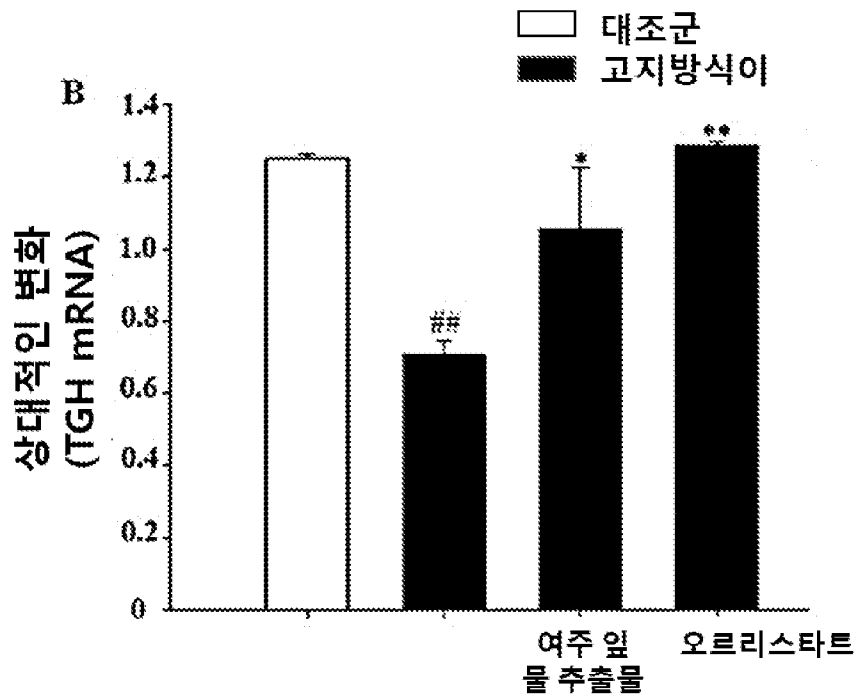
[도5]



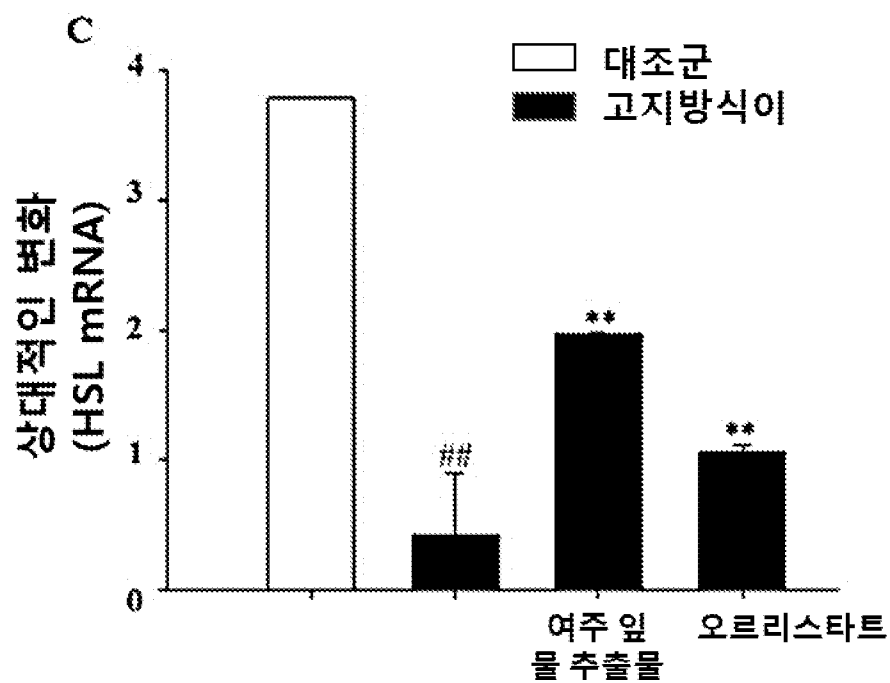


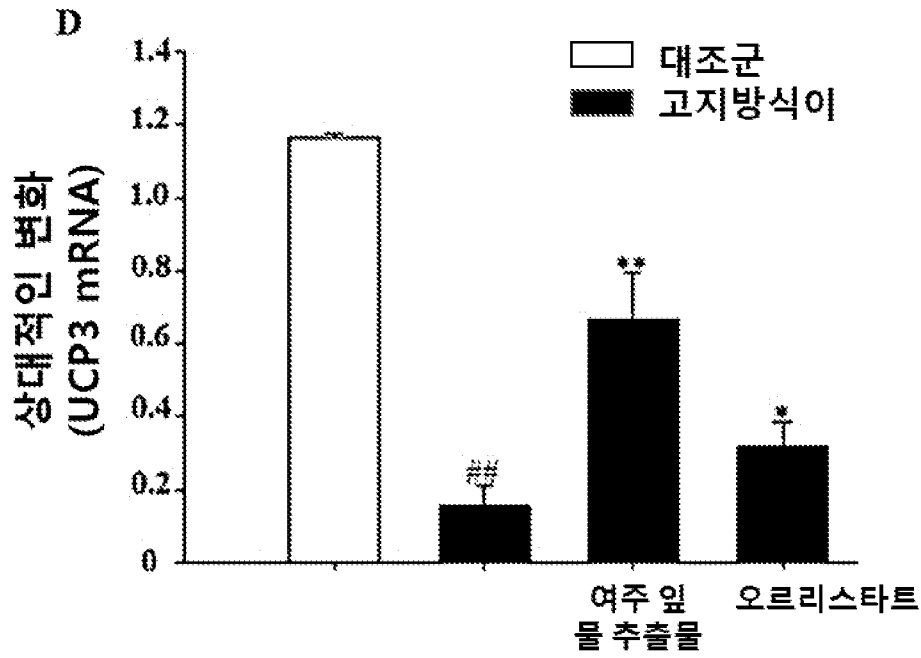
[도7a]



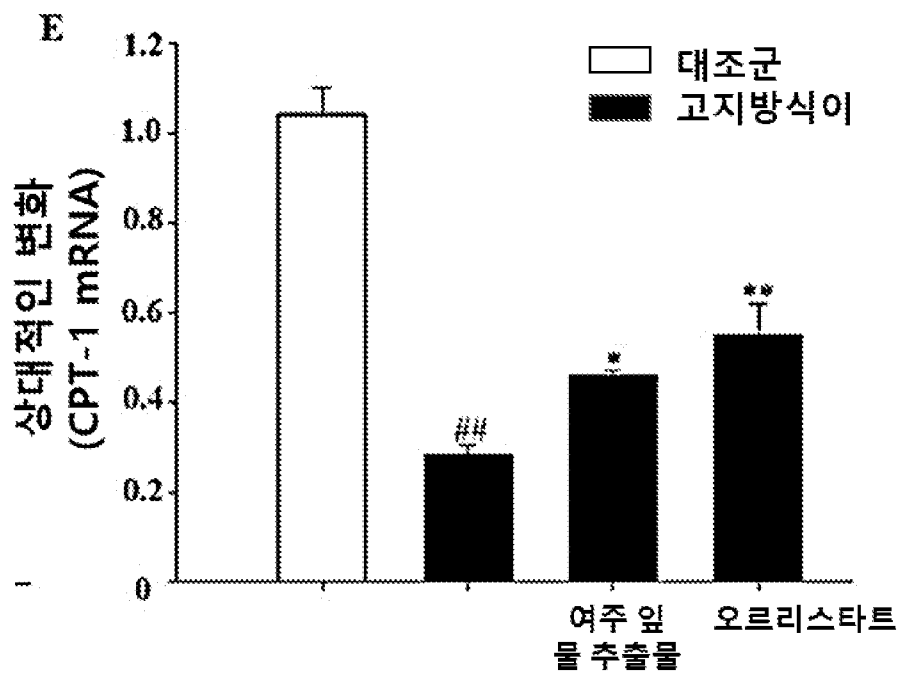


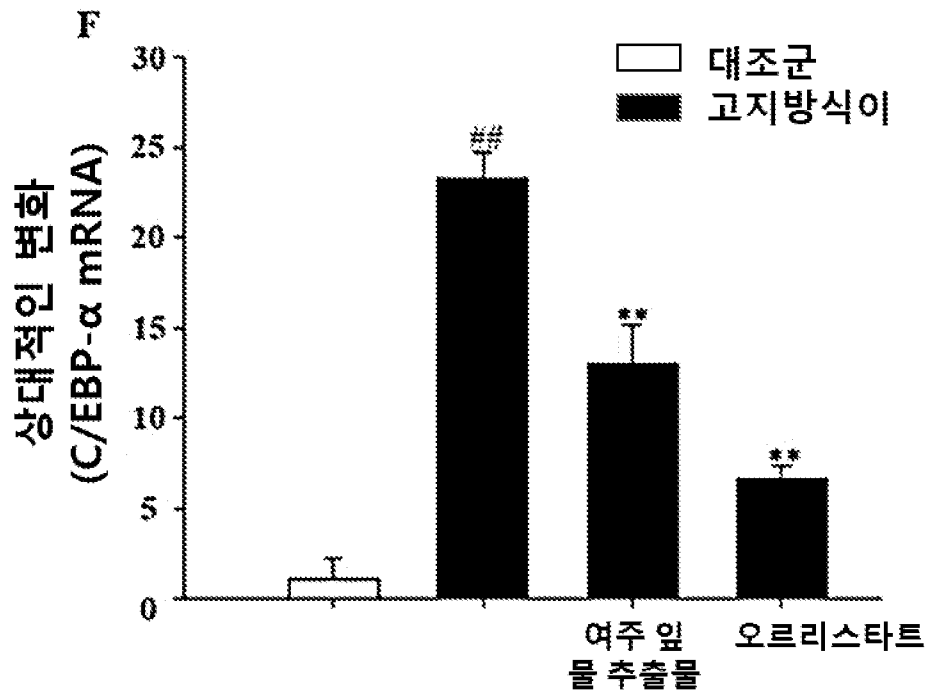
[도7c]



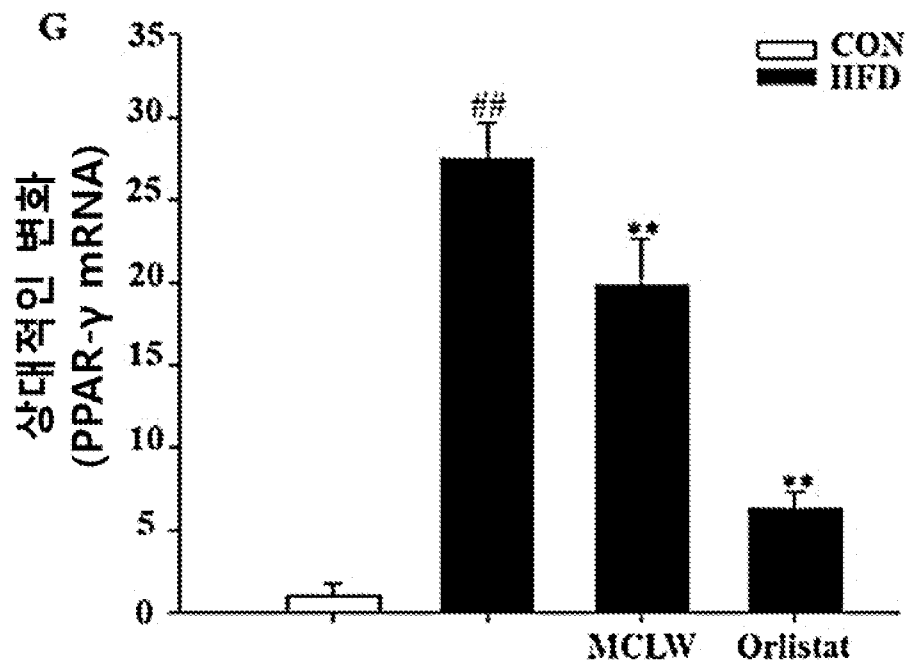


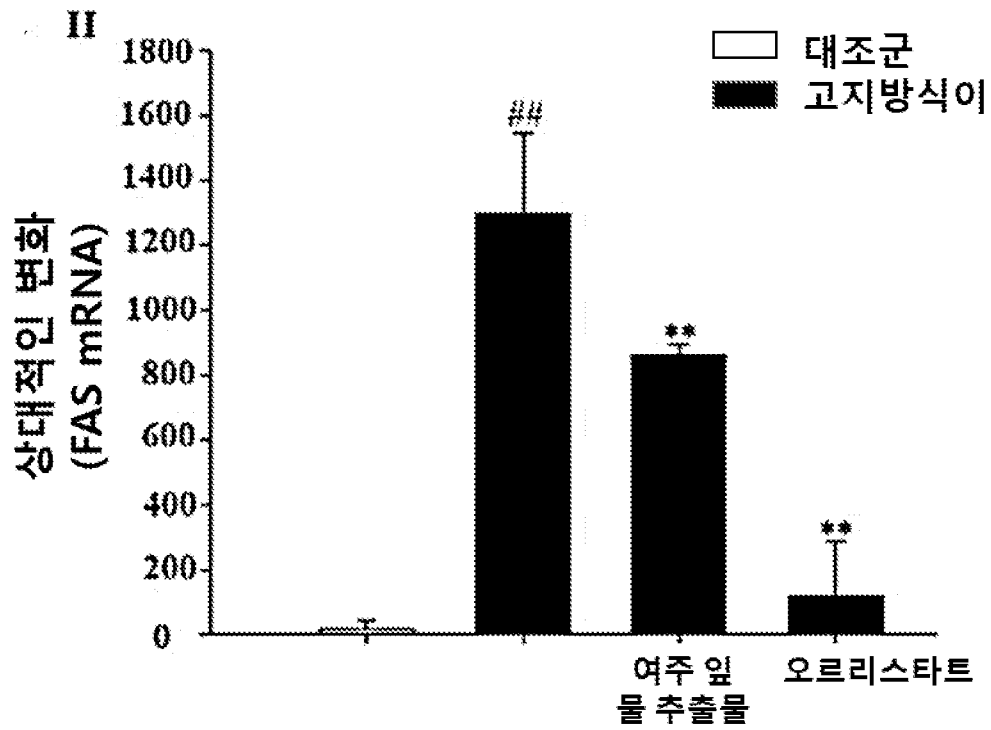
[도7e]



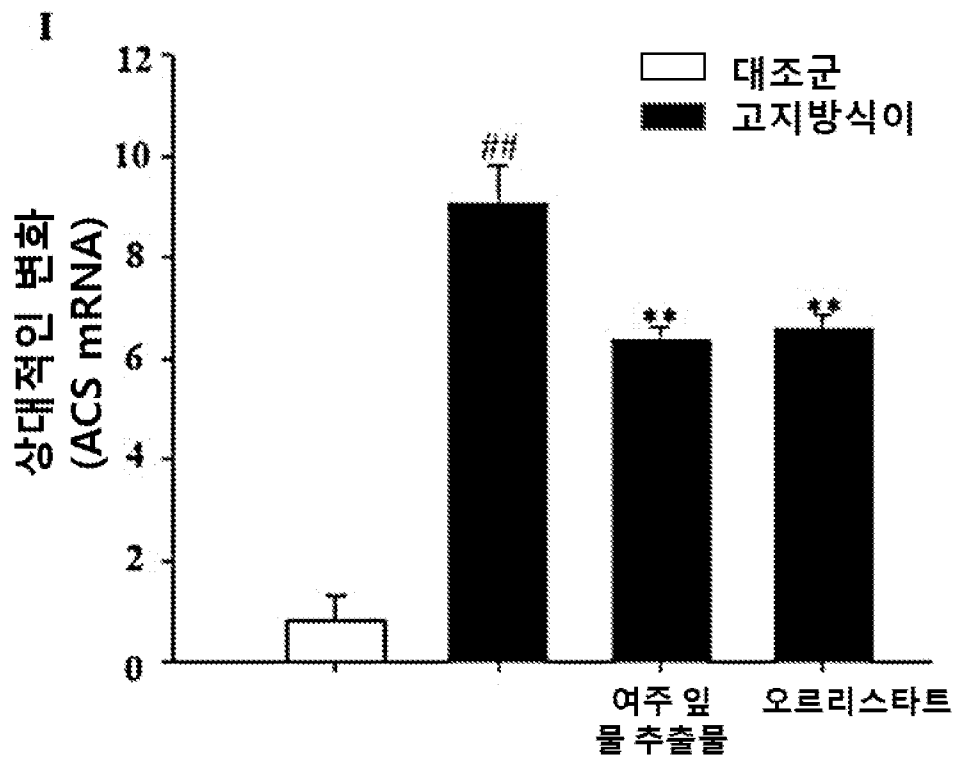


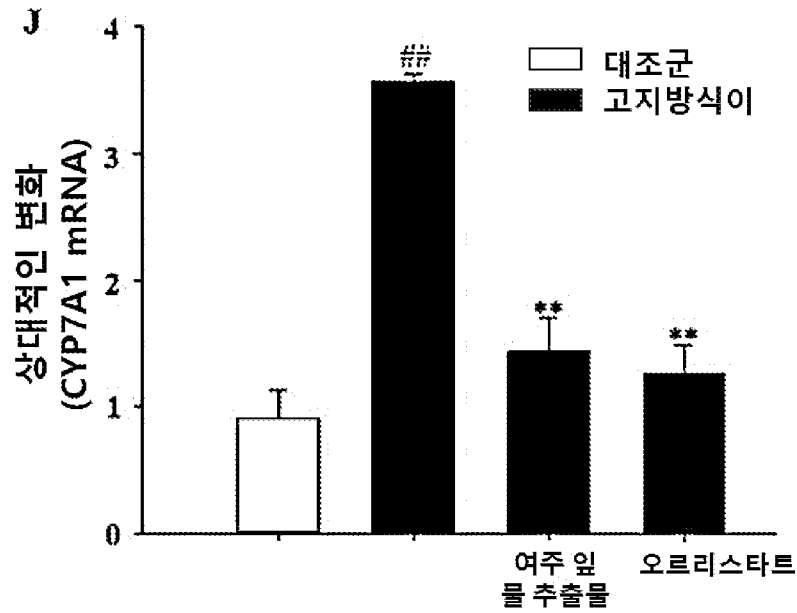
[도7g]



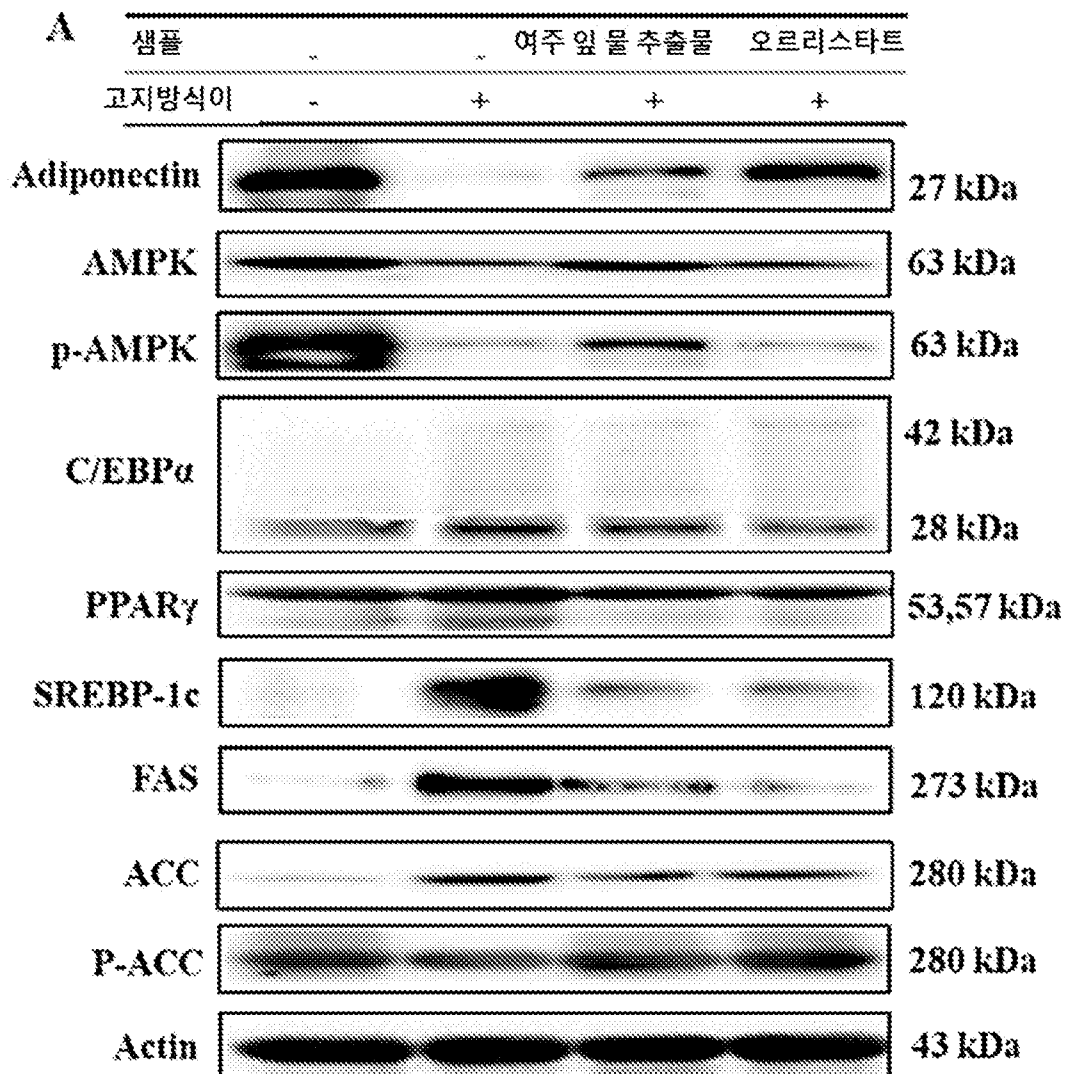


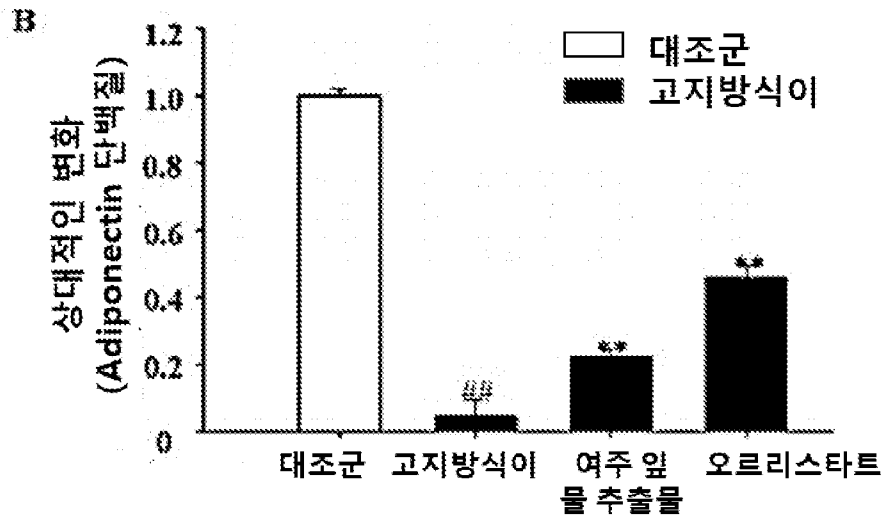
[도7i]



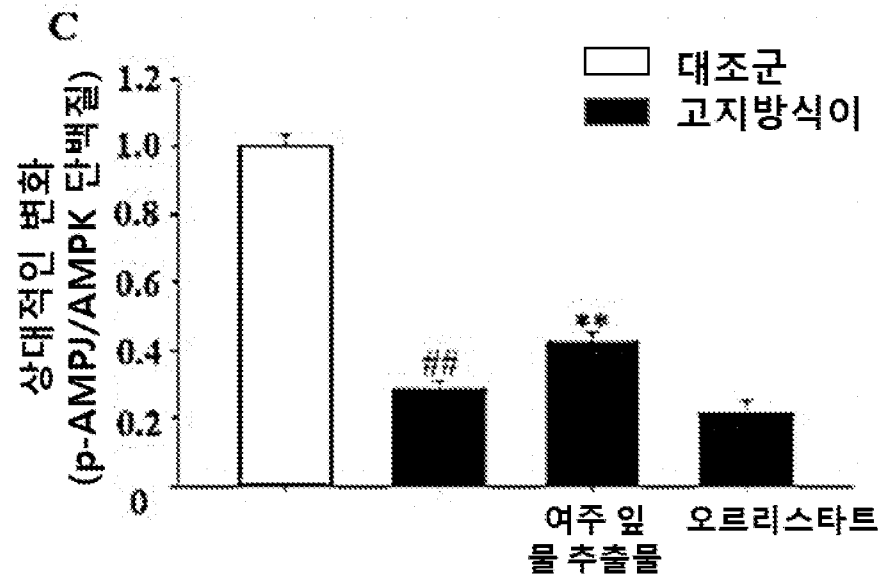


[도8a]

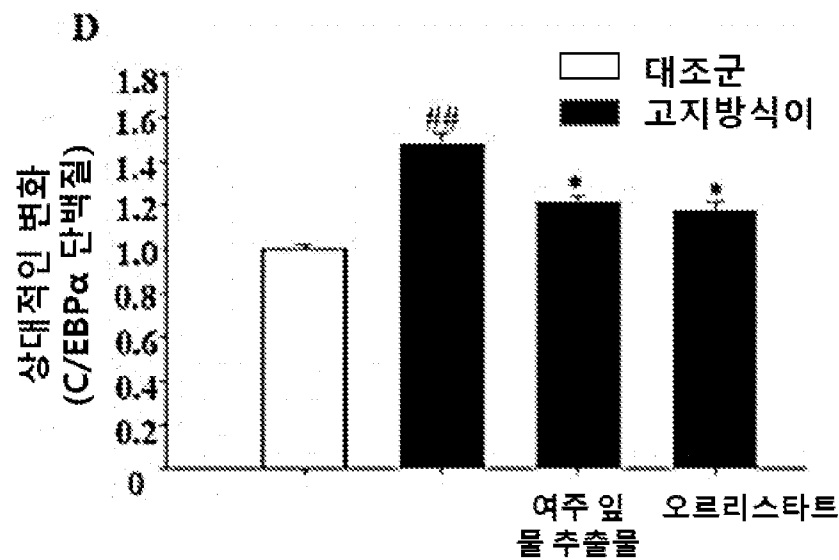


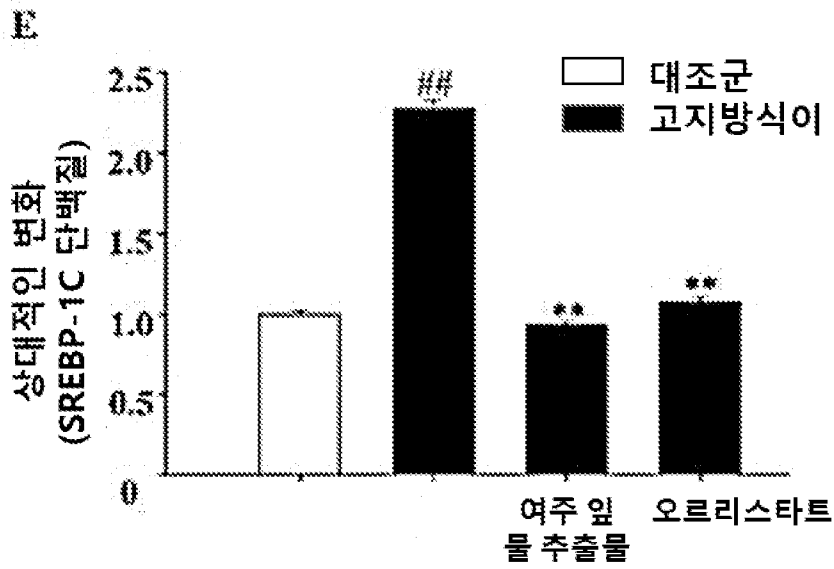


[도8c]

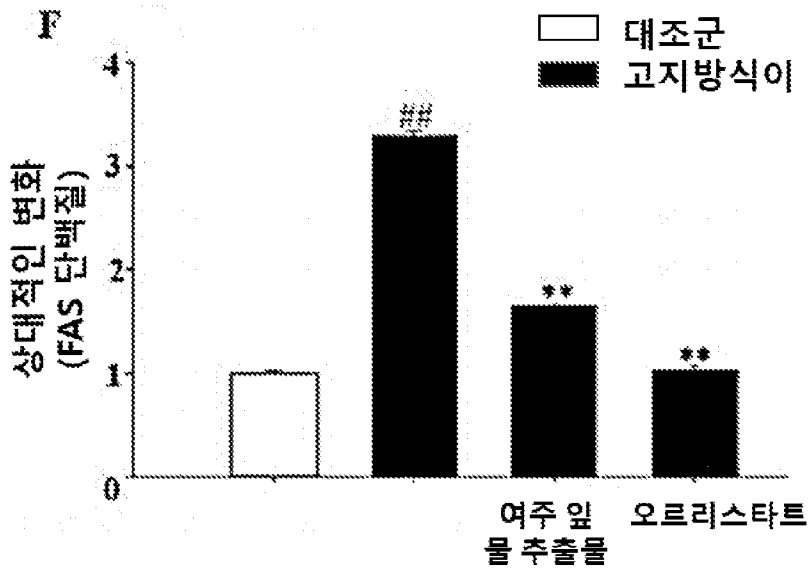


[도8d]

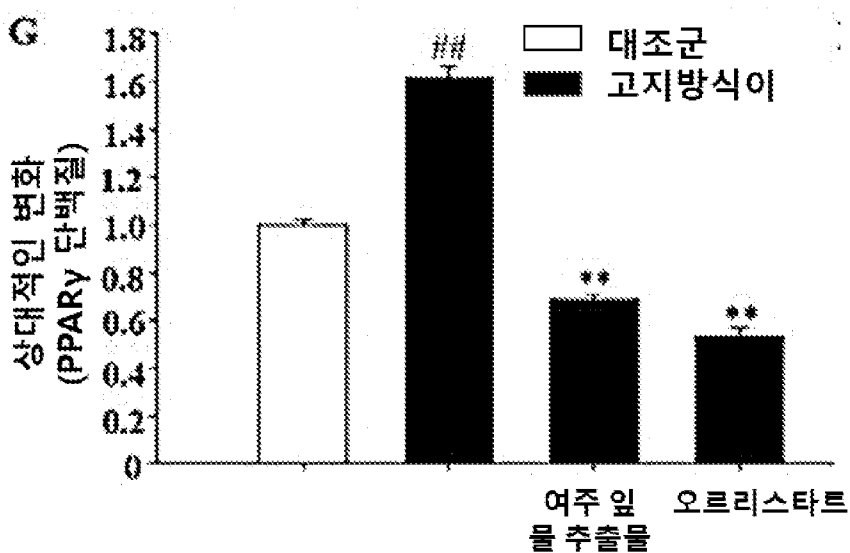


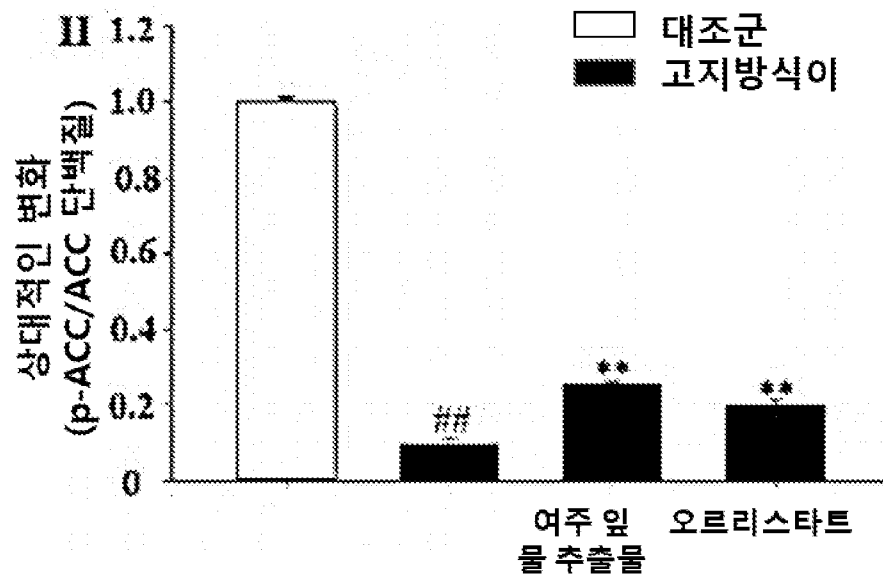


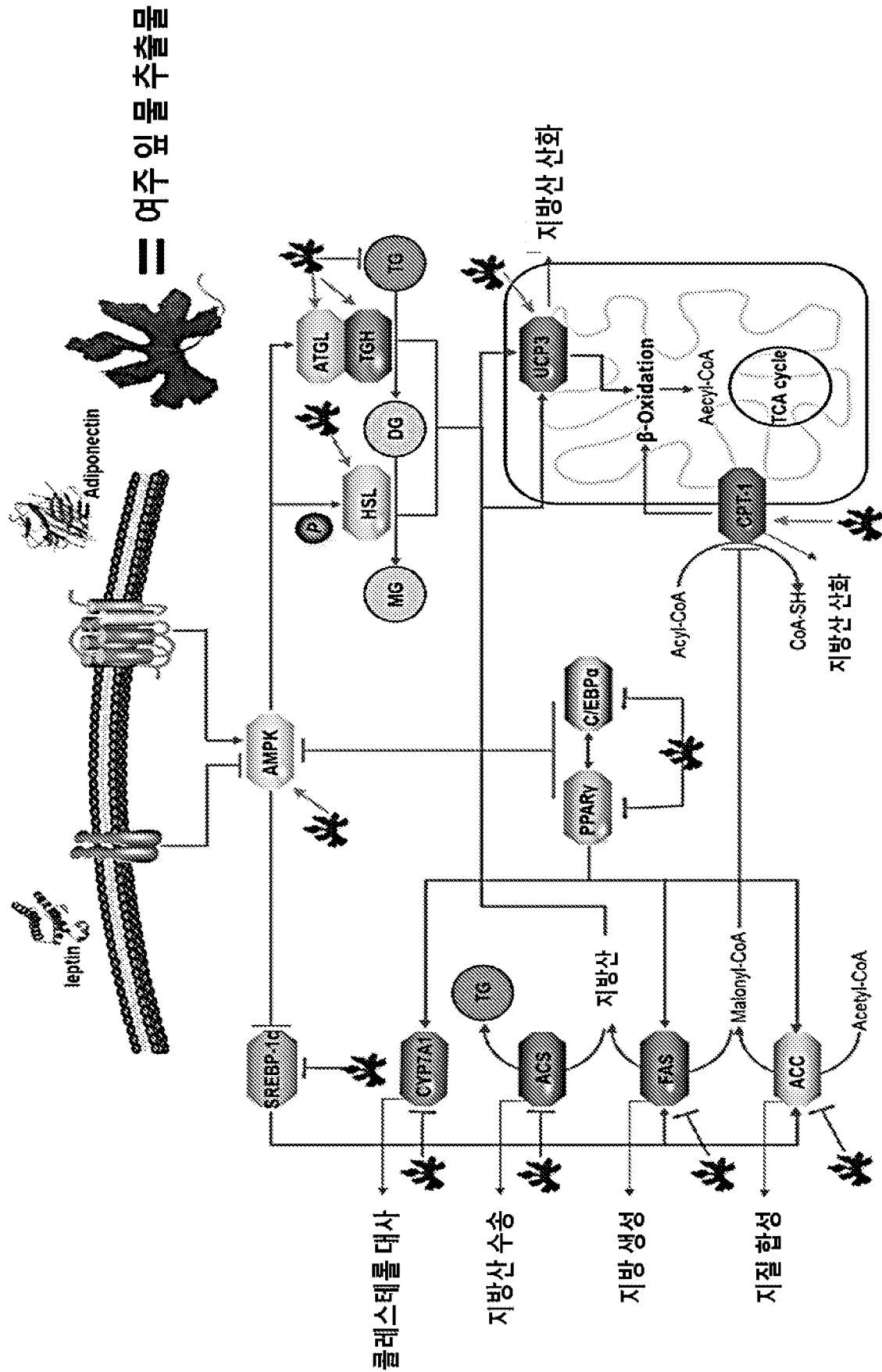
[도8f]



[도8g]

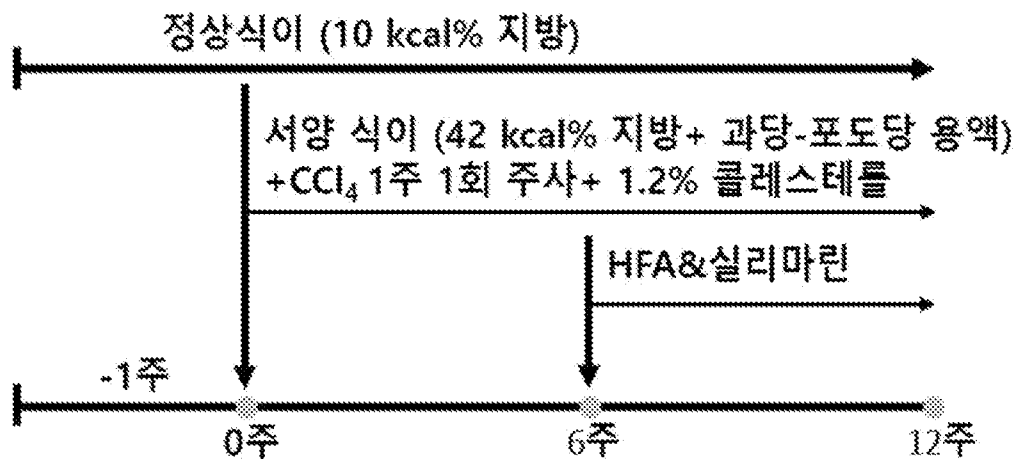


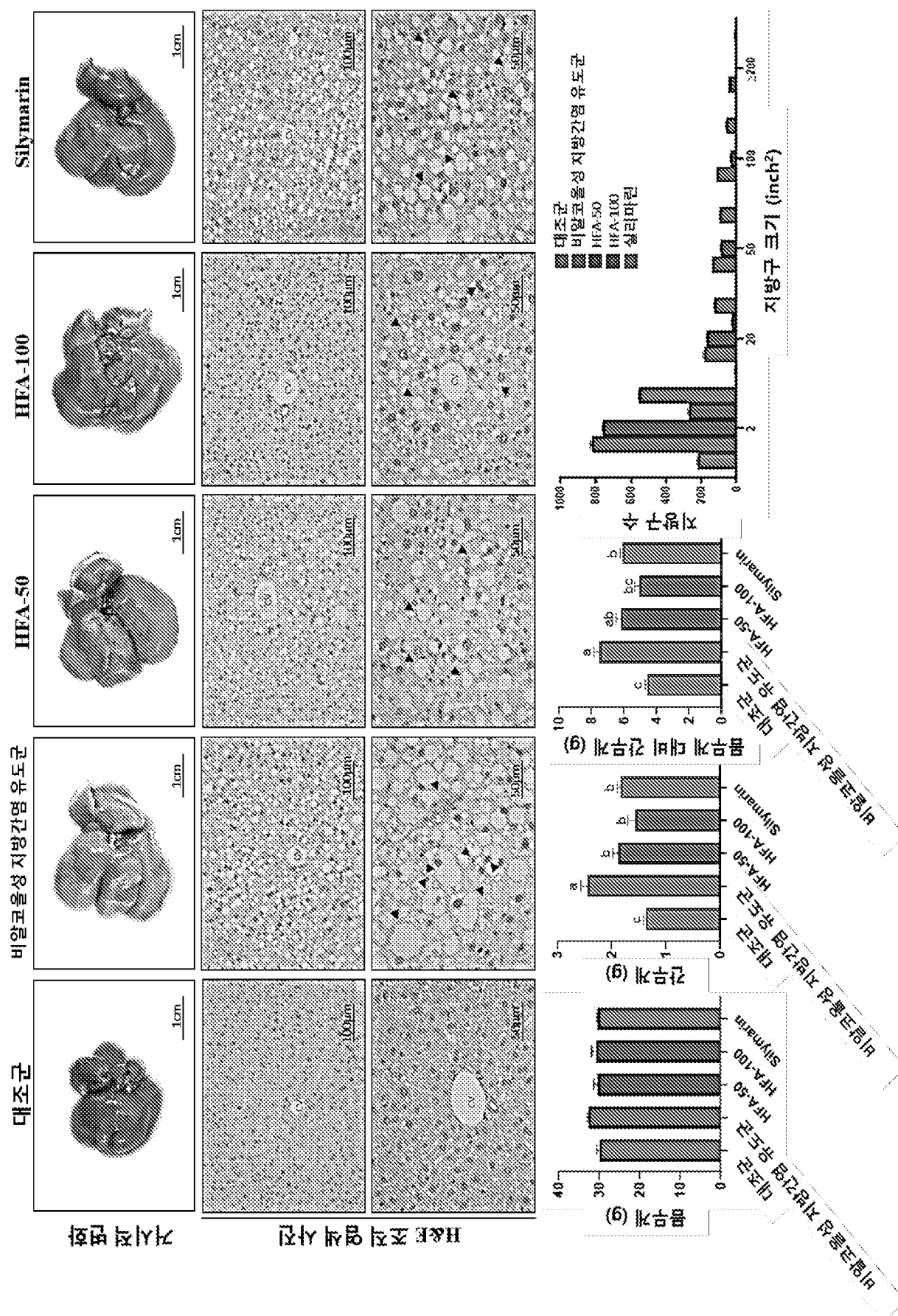


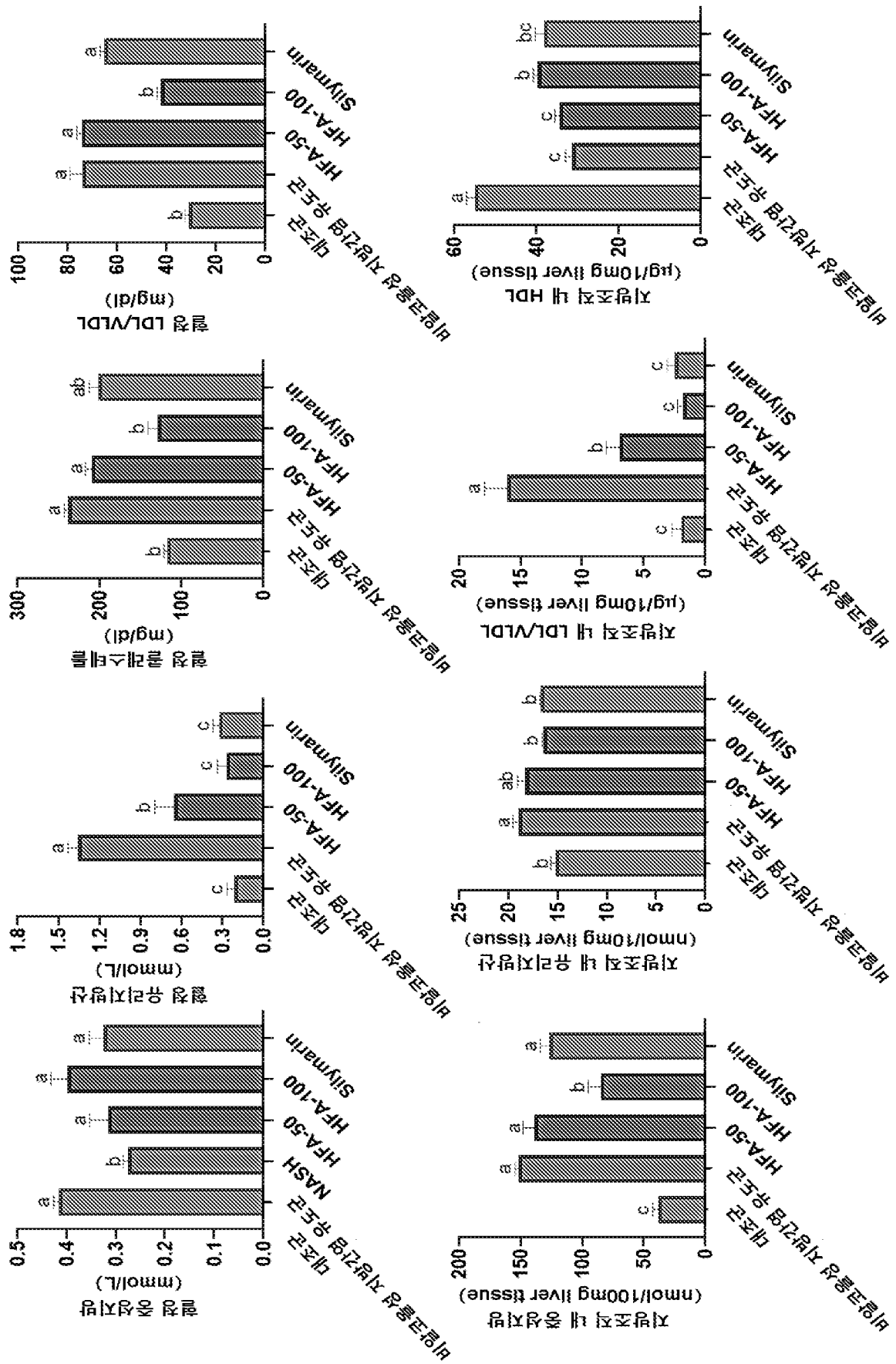


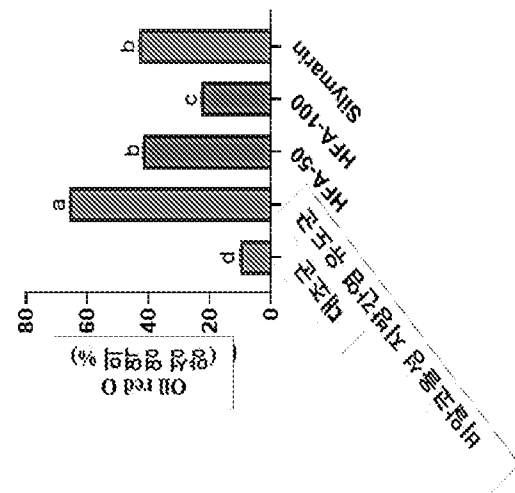
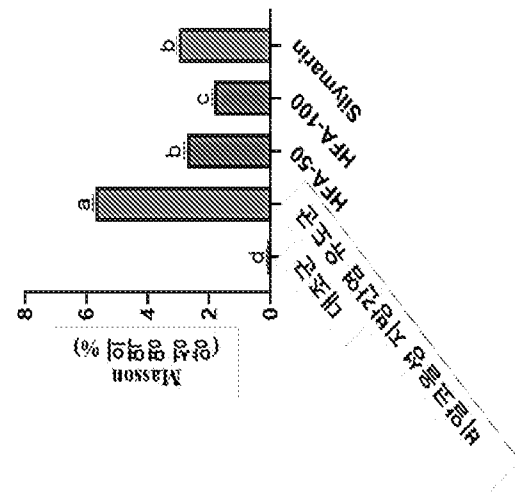
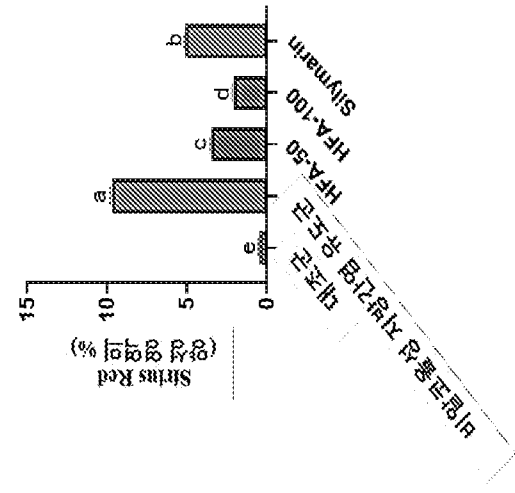
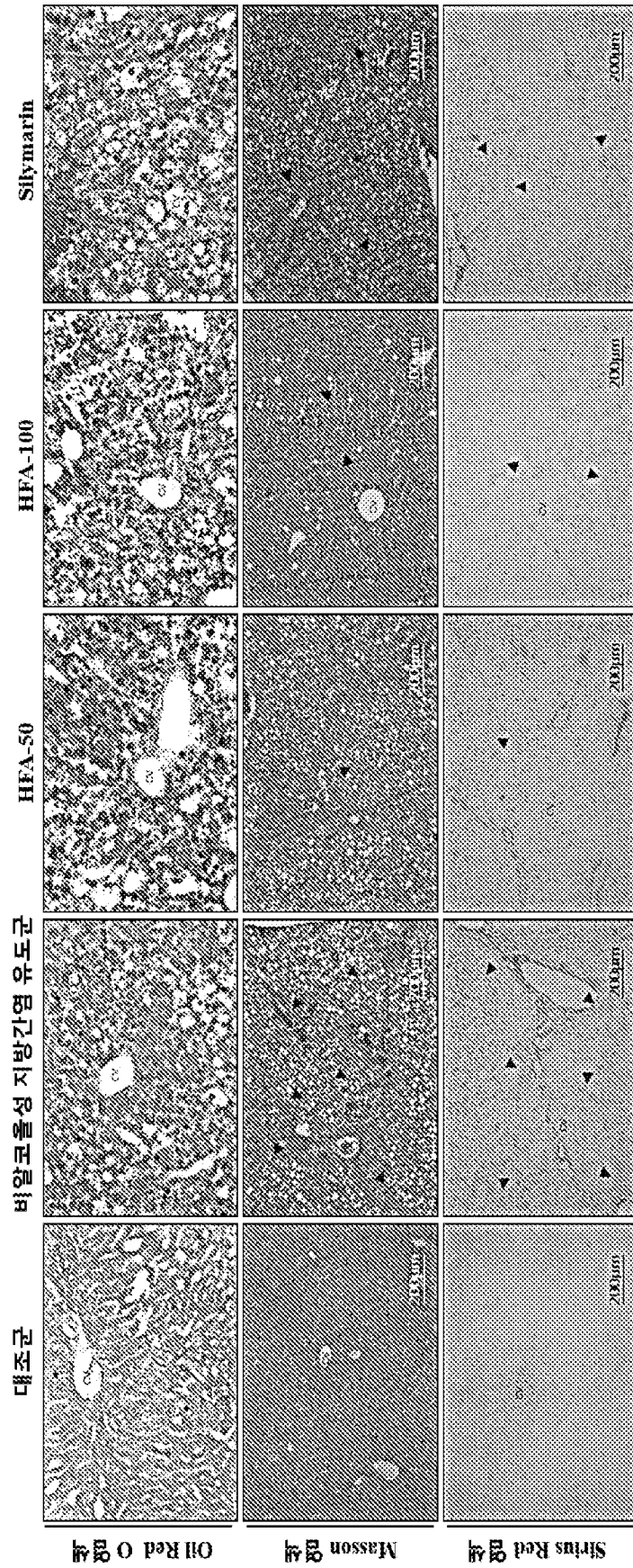
9주령 C57BL/6 수컷 마우스

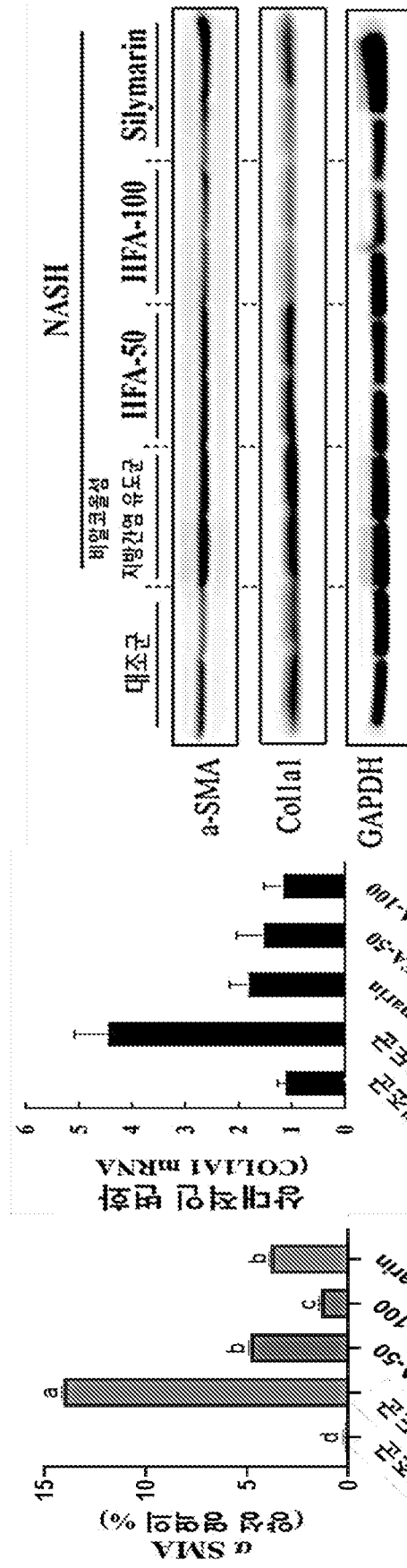
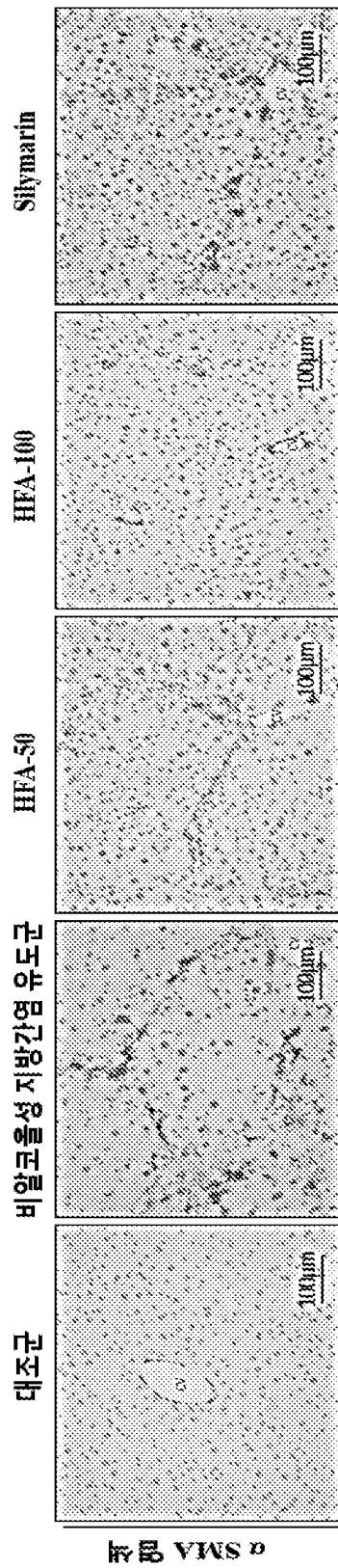
그룹	수	투여량
대조군	8	
비알콜성 지방간염 유도군	8	
비알콜성 지방간염 유도군 +HFA 50 mg/kg	8	50 mg/kg/일
비알콜성 지방간염 유도군 +HFA 100 mg/kg	8	100 mg/kg/일
비알콜성 지방간염 유도군 +실리마린 10 mg/kg	8	10 mg/kg/일

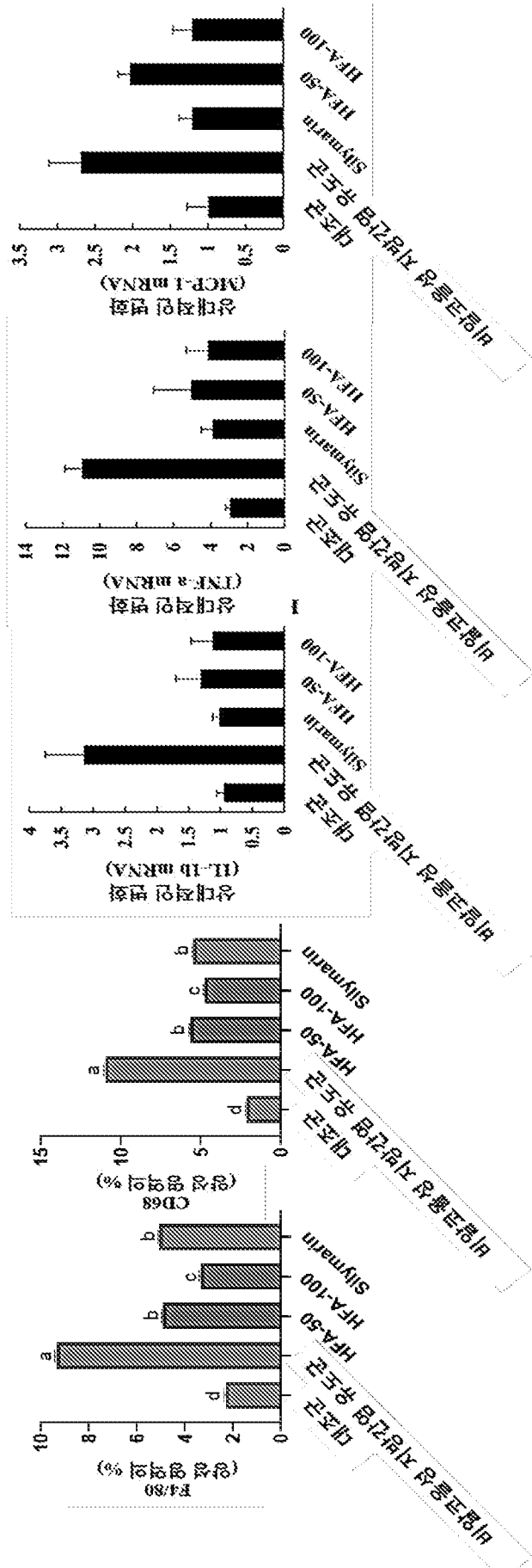
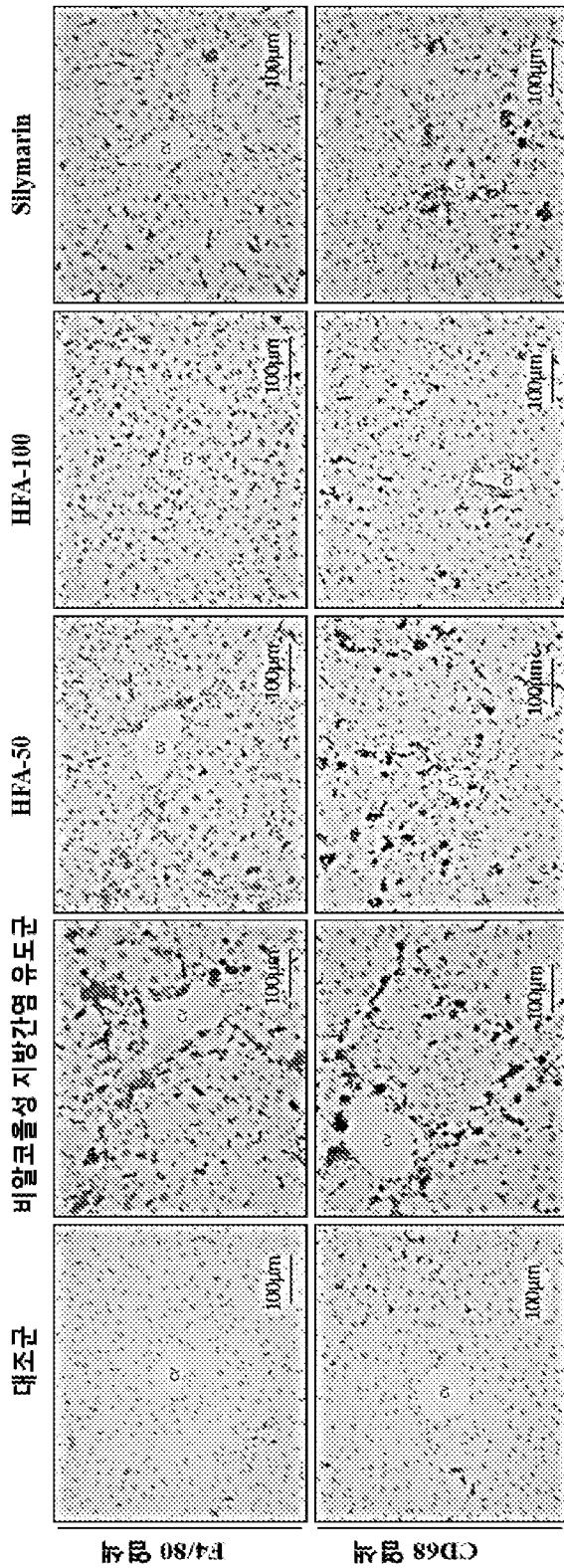


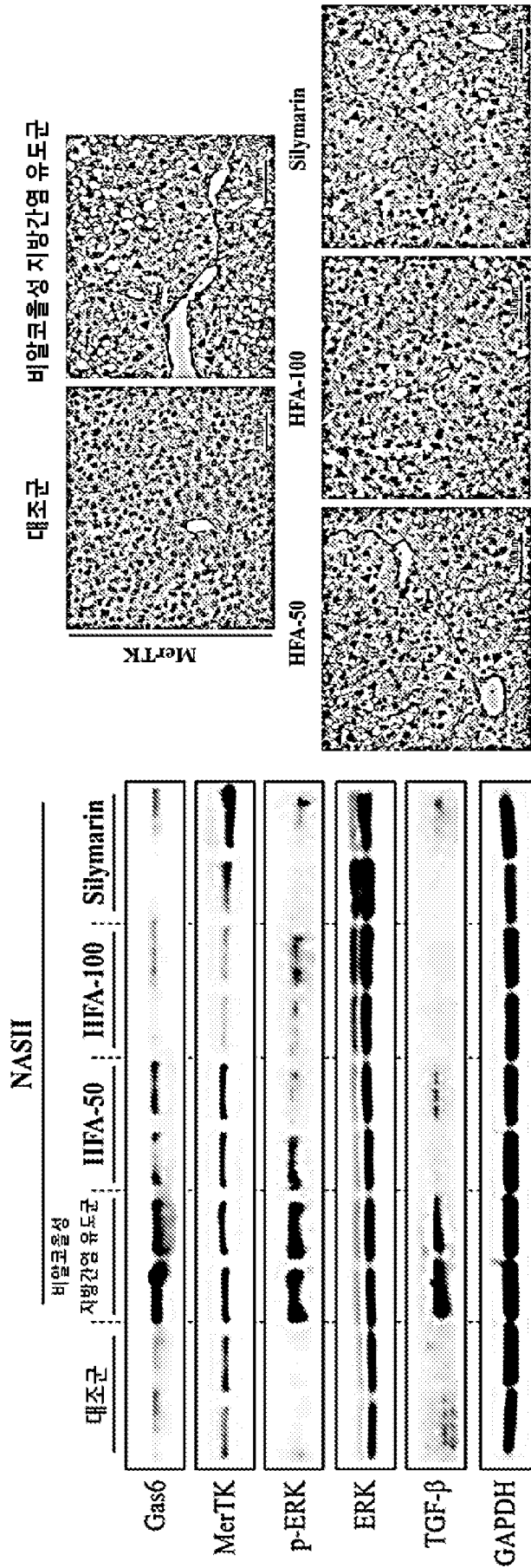






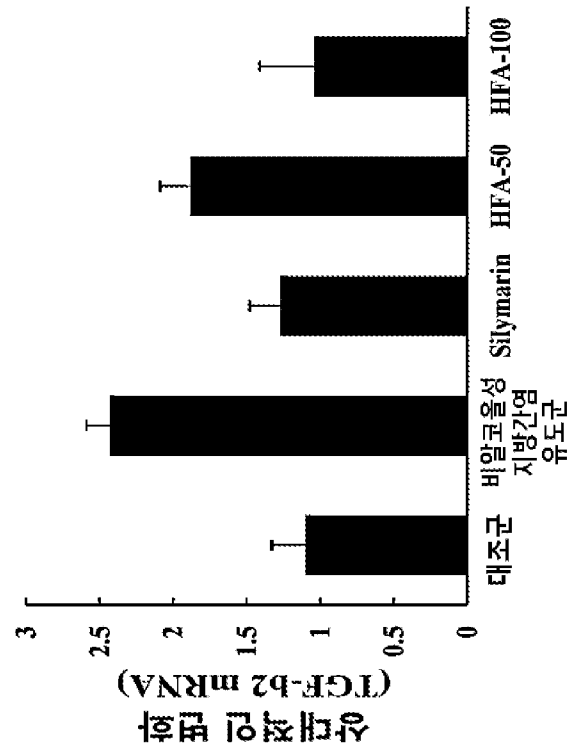
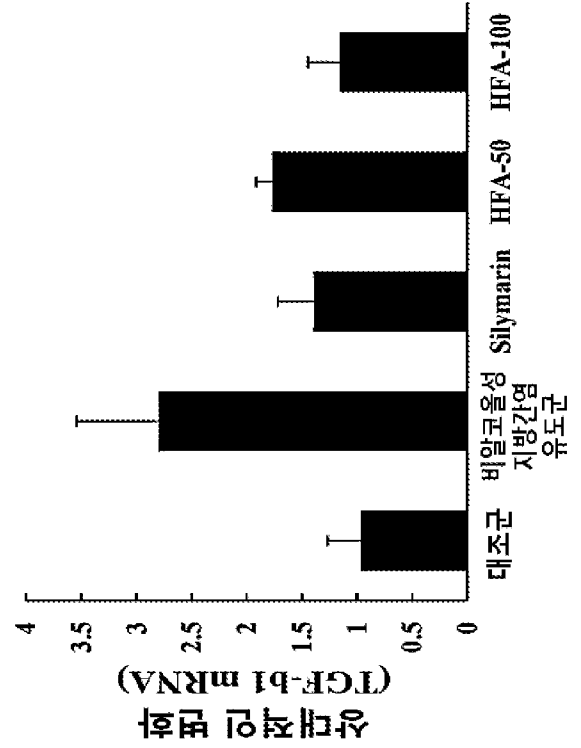






비알코올성 지방간염 유도군

대조군



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/019212

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A23L 33/10(2016.01)i; A23L 33/00(2016.01)i; A61K 31/192(2006.01)i; A61P 3/04(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i; A23K 20/111(2016.01)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(2016.01); A23F 3/16(2006.01); A23F 3/30(2006.01); A61K 36/42(2006.01); A61P 3/00(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 여주(momordica charantia), 비만(obesity), 지방(fat), 지방간(fatty liver), 하이드로 페룰산(hydroferulic acid)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	FAN, M. et al. Comparative Analysis of Metabolite Profiling of Momordica charantia Leaf and the Anti-Obesity Effect through Regulating Lipid Metabolism. Int. J. Environ. Res. Public health. 24 May 2021, vol. 18, pp. 1-20. See abstract; and pages 1-6 and 10-16.	1,2,4-11,13,15-23 3,14
Y	콜마비엔에이치(주). 쓴오이(여주)의 혈당개선 건강기능식품 개발. 여주 추출물의 대량생산공정 개발 및 제품화 연구. 2017, pp. 1-311 (KOLMAR BNH CO., LTD. Development of hypoglycemic health functional food using bitter melon(Momordica charantia). Research on Mass Production Process Development and Commercialization of Momordica charantia Extract.) See pages 13 and 149.	3,14
A	MA, Y. et al. Ferulic acid ameliorates nonalcoholic fatty liver disease and modulates the gut microbiota composition in high-fat diet fed ApoE-/- mice. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2019, vol. 113, pp. 1-10. See abstract; and pages 1-10.	1-11,13-23
A	KR 10-2013-0066958 A (HAMYANG AGRICULTURAL UNION CORPORATION et al.) 21 June 2013 (2013-06-21) See claims 1-8; and paragraph [0006].	1-11,13-23
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 March 2023		Date of mailing of the international search report 21 March 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/019212

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2016-0044257 A (SANGJI UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 25 April 2016 (2016-04-25) See claims 1-4.	1-11,13-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/019212

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.: **12, 24**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 12 and 24 pertain to a method for treatment of the human body or animals by surgery or therapy, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/019212

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
KR	10-2013-0066958	A	21 June 2013	KR	10-1300386 B1	26 August 2013
KR	10-2016-0044257	A	25 April 2016	None		

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A23L 33/10(2016.01)i; A23L 33/00(2016.01)i; A61K 31/192(2006.01)i; A61P 3/04(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i; A23K 20/111(2016.01)i																	
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A23L 33/10(2016.01); A23F 3/16(2006.01); A23F 3/30(2006.01); A61K 36/42(2006.01); A61P 3/00(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 여주(momordica charantia), 비만(obesity), 지방(fat), 지방간(fatty liver), 하이드로페룰산(hydroferulic acid)																	
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X Y</td> <td>Fan, M. 등, "Comparative Analysis of Metabolite Profiling of Momordica charantia Leaf and the Anti-Obesity Effect through Regulating Lipid Metabolism", Int. J. Environ. Res. Public health, 2021.05.24, 18권, 페이지 1-20 초록; 페이지 1-6, 10-16</td> <td>1,2,4-11,13,15-23 3,14</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>콜마비엔에이치(주), "쓴오이(여주)의 혈당개선 건강기능식품 개발", 여주 추출물의 대량생산공정 개발 및 제품화 연구, 2017, 페이지 1-311 페이지 13, 149</td> <td>3,14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Ma, Y. 등, "Ferulic acid ameliorates nonalcoholic fatty liver disease and modulates the gut microbiota composition in high-fat diet fed ApoE-/- mice", Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 113권, 페이지 1-10 초록; 페이지 1-10</td> <td>1-11,13-23</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2013-0066958 A (함양영농조합법인 등) 2013.06.21 청구항 1-8; 단락 [0006]</td> <td>1-11,13-23</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X Y	Fan, M. 등, "Comparative Analysis of Metabolite Profiling of Momordica charantia Leaf and the Anti-Obesity Effect through Regulating Lipid Metabolism", Int. J. Environ. Res. Public health, 2021.05.24, 18권, 페이지 1-20 초록; 페이지 1-6, 10-16	1,2,4-11,13,15-23 3,14	Y	콜마비엔에이치(주), "쓴오이(여주)의 혈당개선 건강기능식품 개발", 여주 추출물의 대량생산공정 개발 및 제품화 연구, 2017, 페이지 1-311 페이지 13, 149	3,14	A	Ma, Y. 등, "Ferulic acid ameliorates nonalcoholic fatty liver disease and modulates the gut microbiota composition in high-fat diet fed ApoE-/- mice", Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 113권, 페이지 1-10 초록; 페이지 1-10	1-11,13-23	A	KR 10-2013-0066958 A (함양영농조합법인 등) 2013.06.21 청구항 1-8; 단락 [0006]	1-11,13-23
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항															
X Y	Fan, M. 등, "Comparative Analysis of Metabolite Profiling of Momordica charantia Leaf and the Anti-Obesity Effect through Regulating Lipid Metabolism", Int. J. Environ. Res. Public health, 2021.05.24, 18권, 페이지 1-20 초록; 페이지 1-6, 10-16	1,2,4-11,13,15-23 3,14															
Y	콜마비엔에이치(주), "쓴오이(여주)의 혈당개선 건강기능식품 개발", 여주 추출물의 대량생산공정 개발 및 제품화 연구, 2017, 페이지 1-311 페이지 13, 149	3,14															
A	Ma, Y. 등, "Ferulic acid ameliorates nonalcoholic fatty liver disease and modulates the gut microbiota composition in high-fat diet fed ApoE-/- mice", Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 113권, 페이지 1-10 초록; 페이지 1-10	1-11,13-23															
A	KR 10-2013-0066958 A (함양영농조합법인 등) 2013.06.21 청구항 1-8; 단락 [0006]	1-11,13-23															
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																	
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																	
국제조사의 실제 완료일 2023년03월20일(20.03.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년03월21일(21.03.2023)															
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373															

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2016-0044257 A (상지대학교산학협력단) 2016.04.25 청구항 1-4	1-11,13-23

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: **12, 24**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 12, 24는 수술 또는 치료에 의한 사람 또는 동물의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제 17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0066958 A	2013/06/21	KR 10-1300386 B1	2013/08/26
KR 10-2016-0044257 A	2016/04/25	없음	