



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년04월26일
(11) 등록번호 10-1851639
(24) 등록일자 2018년04월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/30 (2006.01) A61K 36/732 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A61K 36/732 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0010490
(22) 출원일자 2016년01월28일
심사청구일자 2016년01월28일
(65) 공개번호 10-2016-0094313
(43) 공개일자 2016년08월09일
(30) 우선권주장
1020150014069 2015년01월29일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
JP2011207796 A*
KR1019970073405 A*
WO2012105630 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
재단법인 전주농생명소재연구원
전북 전주시 덕진구 장동 452-80번지
(72) 발명자
김선영
전라북도 전주시 덕진구 솔내로 120, 403동 1006호 (송천동1가, 송천4차현대아파트)
김홍준
전라북도 전주시 완산구 신촌3길 1 우성중산타운 102동 902호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 2 항

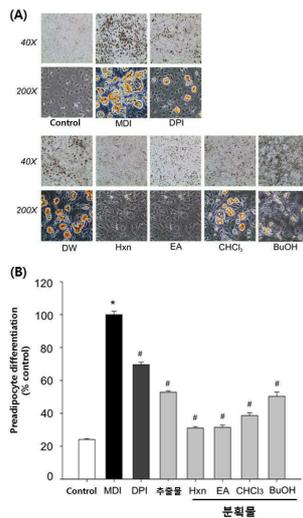
심사관 : 엄금희

(54) 발명의 명칭 **모과 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 항비만용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 모과 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 항비만용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 본 발명의 모과 추출물 또는 이의 분획물은 식물로부터 추출된 천연물질이므로 부작용 등이 문제되지 않으며, 지방세포의 분화 억제 및 세포 내 중성지방 축적 억제 효과를 지니므로써, 모과 추출물을 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 비만의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/332 (2013.01)

A23V 2300/14 (2013.01)

(72) 발명자

정승일

전라북도 전주시 덕진구 안덕원로 251 한신희플러스
스아파트 114동 1201호

김다혜

전라북도 전주시 완산구 물레방아3길 7

박은혜

전라북도 익산시 하나로8길 11, 305호

김상준

전라북도 전주시 완산구 흑석1길 89, 412호 (서서
학동)

김지애

전라북도 전주시 덕진구 사평1길 35

곽설화

전라북도 정읍시 신태인읍 양과2길 17

유강열

전라북도 전주시 완산구 화산천변로 55 코오롱하늘
채아파트 105동 1505호

윤지영

전라북도 익산시 무왕로20길 17 부영1차아파트
101-108

이보영

전라북도 완주군 이서면 갈산1로 71 805동 1404호
(갈산리, 전북혁신내이노힐스아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 모과(Chaenomelis Fructus) 씨를 제외한 과육을 3~8분 동안 증숙하고, 실온에서 건조하여 수분을 제거하는 단계;
- 2) 상기 단계 1) 이후에 40~50℃에서 16~20시간 동안 건조하는 단계;
- 3) 상기 단계 2)에서 건조한 모과를 분쇄하여 분말을 제조하는 단계;
- 4) 상기 모과 건조 분말 중량 대비 5~10배의 부피부로 물을 첨가하고, 80~110℃에서 2~5시간 동안 증탕하는 단계;
- 5) 상기 단계 4)에서 증탕하여 획득한 모과(Chaenomelis Fructus) 씨를 제외한 과육의 열수 추출물을 여과 및 동결건조하는 단계; 및
- 6) 상기 단계 5)의 동결건조한 모과 추출물을 물에 현탁시킨 후, 에틸아세테이트로 추출하고, 에틸아세테이트층을 분리한 후 감압농축하는 단계;를 포함하여 제조하며, C/EBP α , PPAR γ , SREBP-1c, 아디포넥틴(adiponectin), 페릴리핀(Perillipin) 및 지방산 결합 단백질 4(FABP4)의 발현을 억제하는 모과(Chaenomelis Fructus) 씨를 제외한 과육의 열수 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 비만의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

- 1) 모과(Chaenomelis Fructus) 씨를 제외한 과육을 3~8분 동안 증숙하고, 실온에서 건조하여 수분을 제거하는 단계;
- 2) 상기 단계 1) 이후에 40~50℃에서 16~20시간 동안 건조하는 단계;
- 3) 상기 단계 2)에서 건조한 모과를 분쇄하여 분말을 제조하는 단계;
- 4) 상기 모과 건조 분말 중량 대비 5~10배의 부피부로 물을 첨가하고, 80~110℃에서 2~5시간 동안 증탕하는 단계;
- 5) 상기 단계 4)에서 증탕하여 획득한 모과(Chaenomelis Fructus) 씨를 제외한 과육의 열수 추출물을 여과 및 동결건조하는 단계; 및
- 6) 상기 단계 5)의 동결건조한 모과 추출물을 물에 현탁시킨 후, 에틸아세테이트로 추출하고, 에틸아세테이트층

을 분리한 후 감압농축하는 단계;를 포함하여 제조하며, C/EBP α , PPAR γ , SREBP-1c, 아디포넥틴(adiponectin), 페릴리핀(Perillipin) 및 지방산 결합 단백질 4(FABP4)의 발현을 억제하는 모과(Chaenomeles Fructus) 씨를 제외한 과육의 열수 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 모과 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 항비만용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식생활의 서구화로 인해 비만인구는 전 세계적으로 폭발적인 증가를 보이고 있다. 일반적으로 체질량지수(body mass index, BMI) 25 이상을 과체중, 30 이상이면 비만으로 정의하지만 일본이나 우리나라의 경우에는 25 이상을 비만으로 정의하고 있다. 이 기준을 적용할 경우, 2012년 국민건강 영양 조사 결과에 의하면 한국에서 성인 3명 중 1명이 비만이다. 1980년과 2013년 사이 비만과 과체중은 성인에서 28%, 아동에서 47%까지 증가되었고, 1980년 BMI 25 이상인 인구의 수가 8억 5,700만 명에 달했던데 비해 2013년에는 21억 명까지 증가했다(Lancet 14: 60460-60469, 2014).

[0003] 비만(Obesity)이란 열량의 섭취와 소비의 불균형으로 발생하는 대사성 질환이며, 과잉된 열량으로 인해 지방 조직이 비정상적으로 증가된 상태를 말한다. 비만이 발생하여 그 상태가 지속되면 여러 질환을 유발하는데, 고혈압, 혈중 콜레스테롤 상승, 당뇨병, 신장 질환, 뇌졸중, 동맥경화증, 지방간, 관절염, 암, 수면, 무호흡증 등을 유발하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 비만은 지방전구세포(preadipocyte)의 분화 및 지방생성(adipogenesis) 과정에 의하여 지방세포(adipocyte)의 세포 내 중성지방(triglyceride, TG)의 축적으로 발생하며 이러한 지방생성 기전을 조절하는 것이 비만 억제의 효과적인 치료방법으로 알려져 있다(Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 25: 482-486, 2005).

[0005] 마우스(mouse) 유래 지방전구세포인 3T3-L1 세포는 지방세포형성분화를 연구하기 위해 사용되는 잘 확립된 세포주이다. 지방세포분화(adipocyte differentiation)는 형태, 호르몬 민감성 및 유전자 발현에서의 변화가 수반되는 복잡한 과정이다. 융합 지방전구세포는 클론 증식, 성장 정지 및 호르몬성 유도에 의한 지방세포 마커의 발현을 통해 지방세포가 된다. 몇몇 전사 인자는 지방세포분화에서 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. 지방세포의 형성과정에 관여하는 주요 전사인자로는 C/EBP α (CCAAT-enhancer-binding protein α)와 PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor γ)가 있다. C/EBP α 는 지방전구세포의 유사분열(mitosis)을 억제하는 것으로 알려져 있고, PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor γ)는 지방전구세포는 물론 근아세포(myoblast), C3H10T1/2 줄기세포(stem cell)의 지방세포분화를 유발하는 것으로 알려져 있다(Journal of Biological Chemistry 272: 21473-21478, 1997; Biochemical Pharmacology 50: 1949-1951, 1995).

[0006] PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor)와 직접 혹은 간접적으로 상호작용하는 또 다른 전사인자로서 ADD1/SREBP-1c(Adipocyte Determination and Differentiation-dependent factor 1/ Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c)은 지방세포 내의 지방합성을 촉진시키는 유전자이다(Cell 87: 377-389, 1996). SREBP-1c는 지방과 간 조직의 지방산(fatty acid)과 콜레스테롤(cholesterol) 대사에 매우 중요한 역할을 가지는 전사인자이며 지방세포에서 PPAR γ 의 발현을 유도하고 PPAR γ 의 리간드 결합 도메인(ligand-binding domain)의 활성화와 리간드 생산을 촉진시킨다. 이들 전사인자들은 지방세포의 분화시 발현되어 상호작용을 통해 아디포넥틴(adiponectin), 페릴리핀(perilipin), 지방산 결합 단백질 4(FABP4, fatty acid binding protein 4) 등의 지방분화 마커(marker) 유전자들의 발현을 증가시킨다(Nature Medicine 99: 557-566, 2013).

[0007] 상기 비만을 해소하고 적정한 체중을 유지하기 위한 비만치료 기전으로는 식욕의 조절, 지방의 소화 및 흡수 방해, 에너지 소비의 증가, 지질대사의 조절 등이 있다. 현재 대표적인 비만 치료제로는 오리스타트(Orlistat)가 주원료로 하는 제니칼(Xenical), 시부트라민(Sibutramine)을 원료로 하는 리덕틸(Reductil) 등이 시판되고 있으나, 시부트라민(Sibutramine)의 경우, 혈압을 높여 심혈관계 질환을 가진 환자에게 주의하여 사용해야 하며, 오리스타트(Orlistat)의 경우, 오심, 설사, 복통, 불면증, 혈압상승, 지방변, 지용성 비타민 흡수 방해 등을 유도한다고 보고되고 있다. 또한 지방간의 치료제로서는 클로피브레이트(clofibrate)로 대표되는 피브레이트계 약제 등이 임상에서 사용되고 있으나, 간기능 장애 등의 부작용이 보고되고 있다(Atherosclerosis. 92:31-40, 1992).

[0008] 따라서, 상대적으로 안전성에 대한 문제가 발생할 가능성을 최소화할 수 있을 것으로 기대되는 천연물 중에서 항비만 효과는 높고 부작용은 미약한 비만 치료약물의 개발이 요구되고 있다. 즉, 상기 지방세포의 분화과정을 저해하면서, 부작용은 미약한 천연물 유래 물질에 대한 개발이 요구되고 있다.

[0009] 한편, 모과(Chaenomeles Fructus)는 중국이 원산지로서 장미과(Rosaceae) 목과속(Chaenomeles Lindl.)에 속하며 낙엽관목 또는 소교목이다. 한방에서는 모과가 비위를 소화시키며 습을 제거하는 약물로 인식되어 급성 위장병, 각기병, 근육통, 관절염, 신경통에 효험있는 약재로 처방되고 있다. 또한 진해, 거담, 폐렴, 기관지염 등에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0010] 한국공개특허 제2014-0043610호에 모과나무 추출물을 유효성분으로 하는 과민성 면역질환 예방 또는 개선용 약학 조성물에 대해 개시되어 있고, 한국공개특허 제2009-0024033호에 목과(모과를 말린 약재)를 포함한 한방 재료들로 구성된 비만, 고혈압 등을 위한 건강보조제 및 그 제조방법에 대해 개시되어 있다. 하지만 본 발명의 모과 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 항비만용 조성물에 대해 아직 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 모과(Chaenomeles Fructus) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 비만 의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다. 본 발명에 따른 모과 추출물 또는 이의 분획물을 3T3-L1 지방전구세포에 처리하였을 때, 지방분화 억제 및 세포 내 중성지방 축적 억제 효과를 나타내었으며, 이는 세포 독성에 의해 나타난 효능이 아닌 지방세포 형성에 관여하는 주요한 전사인자인 C/EBP α, PPARγ 및 SREBP-1c의 발현과 지방분화 마커 유전자인 아디포넥틴(adiponectin), 페릴리핀(Perillipin) 및 지방산 결합 단백질 4(FABP4)의 발현을 감소하는 효능을 나타낸 것임을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 모과(Chaenomeles Fructus) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 비만의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 모과 추출물(Chaenomeles Fructus) 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 모과(Chaenomeles Fructus) 추출물 또는 이의 분획물은 식물로부터 추출된 천연물질이므로 부작용 등이 문제되지 않으며, 지방세포의 분화억제 및 세포 내 중성지방 축적 억제 효과를 지니므로써, 모과 추출물 또는 이의 분획물을 함유하는 것을 특징으로 하는 비만의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 모과 추출물을 처리하였을 때, 3T3-L1 지방전구세포 분화의 억제활성을 나타낸 것이다. Control은 아무것도 처리하지 않은 음성 대조군; 오리스타트(Orlistat)는 양성 대조군; (A)는 3T3-L1 지방전구세포 분화의 억제활성을 나타낸 현미경 사진; (B)는 3T3-L1 지방전구세포 분화의 억제활성을 나타낸 그래프이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 모과 추출물을 처리하였을 때, 3T3-L1 지방전구세포의 세포생존율(cell viability)을 나타낸 것이다. Control은 아무것도 처리하지 않은 음성 대조군이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 모과 추출물을 처리하였을 때, 3T3-L1 지방전구세포 분화 후의 중성지방(triglyceride) 축적의 억제활성을 나타낸 것이다. Control은 아무것도 처리하지 않은 음성 대조군; 오리스타트(Orlistat)는 양성 대조군이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 모과 추출물을 처리하였을 때, 3T3-L1 지방전구세포 분화 후의 C/EBP α, PPARγ 및 SREBP-1c의 발현 억제 효능을 나타낸 것이다. Control은 아무것도 처리하지 않은 음성 대조군; 오리

스타트(Orlistat)는 양성 대조군; β -Actin은 로딩 컨트롤(loading control)이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 모과 추출물을 처리하였을 때, 3T3-L1 지방전구세포 분화 후의 아디포넥틴(adiponectin), 페릴리핀(perillipin) 및 지방산 결합 단백질 4(FABP4)의 발현 억제 효능을 나타낸 것이다. Control은 아무것도 처리하지 않은 음성 대조군; 오리스타트(Orlistat)는 양성 대조군; β -Actin은 로딩 컨트롤(loading control)이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 정상 식이, 고지방 식이 및 고지방 식이 + 모과 추출물을 섭취한 각각의 마우스 사진(A) 및 체중(body weight) 변화를 나타낸 그래프(B)이다. *는 정상식이 대조군에 대비하여 고지방 식이군의 체중 증가가 통계적으로 유의하다는 것을 의미하며, #은 고지방 식이군에 대비하여 고지방 식이+모과추출물 섭취군의 체중 감소가 통계적으로 유의하다는 것을 의미하며, p값이 0.05 미만인 것을 의미한다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 정상 식이, 고지방 식이 및 고지방 식이 + 모과 추출물을 섭취한 각각의 마우스 모델의 지방 및 간 조직의 조직학적 검정 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 모과 추출물로부터 얻은 용매별 분획물들을 처리하였을 때, 3T3-L1 지방전구세포 분화의 억제활성을 나타낸 현미경 사진(A) 및 그래프(B)이다. *는 대조군(control)에 대비하여 지방분화 유도물질인 MDI 처리군의 지방분화 증가가 통계적으로 유의하다는 것을 의미하며, #은 지방분화 유도물질인 MDI 처리군에 대비하여 양성 대조군인 DPI 및 본 발명의 모과 추출물로부터 얻은 분획물들의 지방분화 억제가 통계적으로 유의하다는 것을 의미하며, p값이 0.05 미만인 것을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 모과 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 비만의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 비만의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에서, 상기 모과 추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 에틸 아세테이트 또는 이들의 혼합용매의 추출물일 수 있고, 바람직하게는 물 추출물일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 모과의 열수 추출물일 수 있으며, 더 더욱 바람직하게는 1) 모과 씨를 제외한 과육을 3~8분 동안 증숙하고, 실온에서 건조하여 수분을 제거하는 단계; 2) 상기 단계 1) 이후에 40~50℃에서 16~20시간 동안 건조하는 단계; 3) 상기 단계 2)에서 건조한 모과를 분쇄하여 분말을 제조하는 단계; 4) 상기 모과 건조 분말 중량 대비 5~10배의 부피부로 물을 첨가하고, 80~110℃에서 2~5시간 동안 중탕하는 단계; 및 5) 상기 단계 4)에서 중탕하여 획득한 모과 추출물을 여과 및 동결건조하는 단계를 거쳐 수행하는 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.
- [0018] 또한, 상기 분획물은 모과 추출물의 에틸아세테이트 분획물일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0019] 또한, 상기 모과 추출물은 추출처리에 의해 얻어지는 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 조정제물 또는 정제물 중 어느 하나를 포함하는 것으로 한다.
- [0020] 상기 건강기능식품 조성물은 비만을 예방하거나 개선하기 위해 섭취할 수 있는 것이면 특별히 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명의 건강기능식품 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 건강기능식품 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 건강기능식품 조성물에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있다.
- [0022] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 건강기능식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0023] 또한, 본 발명의 건강기능식품 조성물은 식품, 특히 기능성 식품으로 제조될 수 있다. 본 발명의 기능성 식품은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효성분 이외에 천연 탄수화물 또는 향미제를 추가 성분

으로서 포함시킬 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등), 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로오스 등), 올리고당, 폴리사카라이드(예컨대, 텍스트린, 시클로텍스트린 등), 또는 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리스리톨 등)인 것이 바람직하다. 상기 향미제는 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아 추출물 등)와 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다.

[0024] 상기 건강기능식품 조성물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 더 함유할 수 있다. 이러한 상기 첨가되는 성분의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강기능식품 조성물 100 중량부에 대하여 0.01-0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0025] 또한, 본 발명은 모과 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0026] 본 발명의 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물 또는 이의 분획물을 0.02 내지 80 중량%, 바람직하게는 0.02 내지 50 중량%로 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하여 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명에 따른 조성물의 약학적 투여 형태는 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명에 따른 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한 다양한 화합물 혹은 혼합물을 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 추출물 또는 이의 분획물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 갈슘카보네이트, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이 외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명의 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물 또는 이의 분획물은 1일 0.0001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 또한, 본 발명에 의한 약학 조성물은 단독으로 투여되거나 다른 약제와 동등하게 또는 다른 약제를 보조하기 위해 함께 투여될 수 있다. 또한, 각 제형의 조성물에 있어서, 상기한 필수 성분인 조성물 이외의 다른 성분들은 기타 외용제의 제형 또는 사용목적 등에 따라 당업자가 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 이 경우 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승 효과가 일어날 수 있다.

[0031] 본 발명의 추출물 또는 이의 분획물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0032] 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 통상

의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0033] **실시예 1. 모과 추출물 및 이의 분획물의 제조**

[0034] 본 발명에 이용된 모과는 모과나무(*Chaenomeles sinensis* Koehne)를 건조한 한약재로 울산에 소재한 광명당제약 으로부터 공급받아 우석대학교 한의학과 방제학교실에서 동정되어진 것을 제공받아 재료로 사용하였다. 모과씨 를 제외한 과육을 절단하여 5분 동안 증숙한 후 실온에서 건조하여 수분을 제거하고, 최종적으로 45℃의 건 조기에서 18시간 동안 건조하였다. 건조한 모과는 분쇄하여 분말로 제조한 다음, 분말 200g에 증류수 1,000ml를 첨가하여 90℃에서 3시간 동안 추출하고 여과하여 모과 추출물을 제조하였다. 여과한 모과 추출물은 동결건조기 에서 건조하여 분말 형태로 회수하였다. 상기 분말 형태인 모과 추출물(578g)을 3,000ml의 증류수에 현탁시킨 후 동량의 헥산으로 추출하고, 헥산층을 분리한 후 감압 농축하여 헥산 분획물(0.31g)을 수득하였으며, 이와 동 일한 방법으로 클로로포름(0.35g), 에틸아세테이트(1.35g) 및 부탄올(24.91g) 분획물을 순차적으로 수득하였다.

[0035] **실시예 2. 모과 추출물의 3T3-L1 지방전구세포 분화 억제 활성**

[0036] 마우스 유래 3T3-L1 지방전구세포(preadipocytes)는 ATCC(American Type Culture Collection, USA)에서 구입하 여 사용하였다. 세포는 10% NBS(New born calf serum, Thermo Scientific, USA), 항생제-항진균제 (Antibiotic-antimycotic)를 함유한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Thermo Scientific)에서 37℃, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 분화를 위해 세포주를 100% 컨플루언스(Confluence) 시킨 후 지방분화유도물질인 MDI(Isobutylmethylxanthine 0.5mM, dexametason 1µM, insulin 10µg/ml)와 10% FBS(Fetal bovine serum, Thermo Scientific)을 함유한 DMEM 배지를 사용하여 2일 동안 배양하였다. 배양 2일 후, 인슐린(Insulin) 10µg /ml만을 첨가한 DMEM(Containing 10% FBS)으로 교체하여 2일 추가 배양한 뒤, 배양 5일째부터 10% FBS만을 포 함한 DMEM 배지로 교체하여 배양 8일째 되는 시점까지 배양하였다. 모과 추출물은 분화 배지 교환 시 매번 동일 농도로 처리하였다.

[0037] 모과 추출물의 농도별 처리에 따른 3T3-L1 지방전구세포 분화에 미치는 영향을 비교하기 위하여 분화가 종료된 후 10% 포르말린(Formalin) 수용액으로 고정하고 Oil Red O 작업용액(Oil Red O : DW = 3 : 2)으로 지방을 염 색하였다. 염색된 Oil Red O는 100% 이소프로판올(Isopropanol)을 이용하여 추출한 후 효소면역분석법(Enzyme-linked immunospecific assay, ELISA, Perkin Elmer, Victor2 1420, Multilabel Counter)을 이용하여 490nm에 서 흡광도를 측정함으로써, 지방분화에 미치는 모과 추출물 및 이의 분획물의 억제효능을 판단하였다.

[0038] 그 결과, 도 1에 개시한 바와 같이 지방분화유도물질인 MDI만 처리한 대조군에 비해 모과 추출물을 처리한 군 에서 농도가 증가할수록 지방과립(Lipid droplet) 생성이 현저히 억제되는 것을 현미경으로 확인하였으며, 염색 된 Oil red-O를 이소프로필 알코올(Isopropyl alcohol)로 추출하여 정량한 결과에서도 유의한 억제 효능을 확인 하였다.

[0039] **실시예 3. 모과 추출물의 지방세포에 대한 독성비교(MTT 분석)**

[0040] 상기 실시예 1에서 제조된 모과 추출물의 지방세포에 대한 세포생존에 미치는 영향을 확인하기 위하여 96-웰 마 이크로플레이트에 1.0×10⁴ 세포/웰의 농도가 되도록 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양한 후 3T3-L1 지방 전구세포에 모과 추출물을 처리한 48시간 후, 5mg/ml의 (MTT)(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액 10µl를 첨가하고 4시간 추가 배양 후, 침전물을 디메틸 설펝시드(Dimethyl sulfoxide, DMSO)를 가하여 용해시킨 뒤 효소면역분석법(Enzyme-linked immunospecific assay, ELISA, Perkin Elmer, Victor2 1420, Multilabel Counter)을 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율(Cell viability)은 아무것도 처리하지 않은 대조군(음성 대조군)의 흡광도를 기준으로 산출하였다.

[0041] 그 결과, 도 2에서 개시한 바와 같이 상기 실시예 2에서 지방전구세포의 분화억제를 보인 농도를 포함한 모든 처리 농도에서 세포생존율에 영향이 없음을 확인하였다.

[0042] **실시예 4. 모과 추출물의 중성지방(Triglyceride) 축적 억제 효과**

[0043] 중성지방은 중요한 에너지원이지만 과도하게 생성되면 지방세포에 흡수되고 저장되어 비만의 원인으로 작용한다. 인슐린(Insulin) 자극에 의해 미분화 지방세포인 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화하였을 때, 모과 추출물 처리에 따른 세포 내 중성지방(Triglyceride)의 축적에 대한 억제활성은 트리글리세리드 분석키트(Triglyceride assay kit, Asanpharm, Korea)를 사용하여 측정하였다.

[0044] 모과 추출물을 농도별로 처리한 후 생성된 중성지방 함량을 비교한 결과, 도 3에 개시한 바와 같이 50~400 μ g/ml의 모든 농도에서 50% 이상의 억제 효능이 있는 것으로 확인되었고, 특히 최대 처리 농도인 400 μ g/ml에서는 아무것도 처리하지 않은 대조군(음성 대조군)과 유사한 억제 효과가 있음을 보였다.

[0045] **실시예 5. 면역 블로팅법(Immunoblotting)을 통한 지방분화 관련 단백질 발현 조절능 분석**

[0046] 분화된 3T3-L1 지방전구세포를 인산 완충 식염수(Phosphate Buffer Saline, PBS)에 1회 세척하고 차가운 RIPA buffer(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1mM sodium orthovanadate, 120mM sodium chloride, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml aprotinin)를 넣어 용균(Lysis)시킨 후 10,000 \times g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 동일한 양의 단백질(20 μ g/ml)을 SDS-폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel)을 사용하여 전기영동한 후, 폴리비닐-디플루오라이드(PVDF, Poly-Vinyl Difluoride) 멤브레인(Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)에 옮겼다. 5% 탈지유(Skim milk, 0.1% Tween 20 containing PBS, PBST) 용액에서 1시간 동안 비특이적 결합 부위(non-specific binding site)를 블로킹(Blocking)한 뒤 1차 항체(Anti-C/EBP α , anti-SREBP-1c, anti-PPAR γ , anti-adiponectin, anti-perilipin, anti-FABP4, anti- β -actin (1:2,500), Cell Signaling Technology, USA)로 상온에서 1시간 30분간 배양하고 2차 항체(Anti-rabbit IgG 또는 anti-mouse IgG linked with horseradish peroxidase, SantaCruz Biotechnology, Inc. USA)로 상온에서 1시간 배양하였다. ECL(Enhanced chemiluminescence) 용액을 이용하여 항체가 결합된 단백질을 탐지하였다.

[0047] **(1) 모과 추출물의 지방전사인자(Adipogenic transcription factor) 발현 조절 효능**

[0048] 3T3-L1 지방전구세포 분화시 모과 추출물을 50~400 μ g/ml의 농도로 처리한 뒤 면역블로팅법을 통하여 지방전구세포의 분화와 관련된 지방전사인자인 C/EBP α , SREBP-1c 및 PPAR γ 의 발현 조절능을 분석하였다. 그 결과, 도 4에 개시된 바와 같이 모과 추출물 처리 농도가 200 μ g/ml 이상에서는 C/EBP α , PPAR γ 및 SREBP-1c의 발현을 유의하게 억제하였다.

[0049] **(2) 모과 추출물의 지방세포화 단백질(Adipogenic protein) 발현 조절 효능**

[0050] 3T3-L1 지방전구세포 분화시 모과 추출물을 50~400 μ g/ml의 농도로 처리한 뒤 면역블로팅법을 통하여 지방분화 마커 유전자인 아디포넥틴(Adiponectin), 페릴리핀(Perilipin) 및 지방산 결합 단백질 4(FABP4)의 발현 조절능을 비교하였다. 그 결과, 도 5에 개시된 바와 같이 상기 지방전사인자(Adipogenic transcription factor)의 발현 조절 효능 결과와 마찬가지로 200 μ g/ml 이상의 농도에서 지방세포화 단백질(Adipogenic protein)의 발현이 감소하였다.

[0051] **실시예 6. 모과 추출물의 체중 감소 효과**

[0052] 본 발명의 모과 추출물의 체중 감소 효과를 확인하기 위해 본 실시예 6을 실시하였다. 비만 마우스 모델은 생후 5주부터 13주까지 8주간 고지방 식이(총칼로리의 60% 지방함유 식이: D12492. Research diet)를 공급하여 단시일 내에 대조군(총칼로리의 6.5% 지방함유 식이: Purina Rodent chow 5008; Ralston-purina)에 비해 현저한 체중증가(25%이상 체중증가)를 보이며, 사람에서의 중증비만과 유사한 비만동물 모델을 완성하였다. 이때, 사용된 마우스는 미국의 잭슨 실험실(Jackson lab.)에서 C57BL/6J계 4주령된 마우스를 구입하여 1주일 적응기간을 거친 후 5주령부터 사용하였다. 실험 전 5주령 평균체중은 22.7 \pm 0.35g이었으며, 비만 모델로 완성된 14주령의 평균체중은 35.0 \pm 1.4g로 대조군의 평균체중 26.0 \pm 0.96g과 현저한 체중차이를 보였다. 본 실시예 6에 사용된 각 군당 비만 마우스의 수는 5~6 마리로 하였고, 고지방 식이(총칼로리의 60% 지방함유식이: D12492. Research diet)를 그대로 유지하였으며, 본 발명의 모과 추출물을 식염수에 용해하여 매일 하루에 한 번씩 500mg/kg로 경구

투여하였으며, 일주일 간격으로 체중변화를 측정하였다. 사육실의 온도는 25 ± 2 °C로 유지하였고 낮/밤 주기는 12시간 주기로 교차하였으며, 물과 고지방 식이는 자유로이 먹도록 하였다. 그 결과, 도 6에 개시된 바와 같이 고지방 식이 대조군에서 정상 식이 대조군에 비해 약 37% 체중이 증가하였으며, 고지방 식이를 섭취한 비만 마우스에 본 발명의 모과 추출물을 500mg/kg으로 투여한 군에서는 고지방 식이 대조군에 비해 약 9%의 체중 감소 효과를 보였다.

[0053] **실시예 7. 모과 추출물의 지방 및 간 조직의 조직학적 검정**

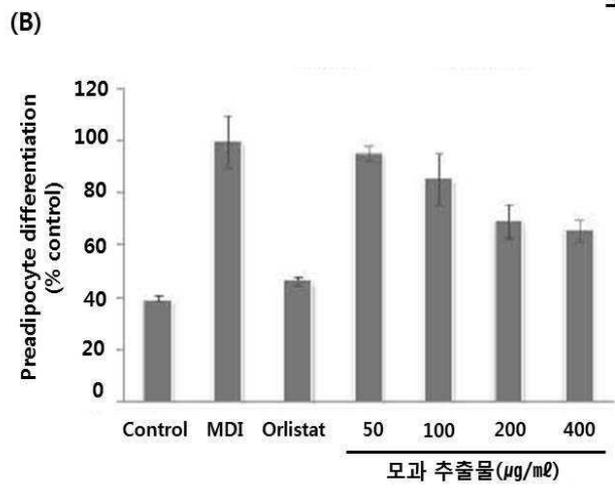
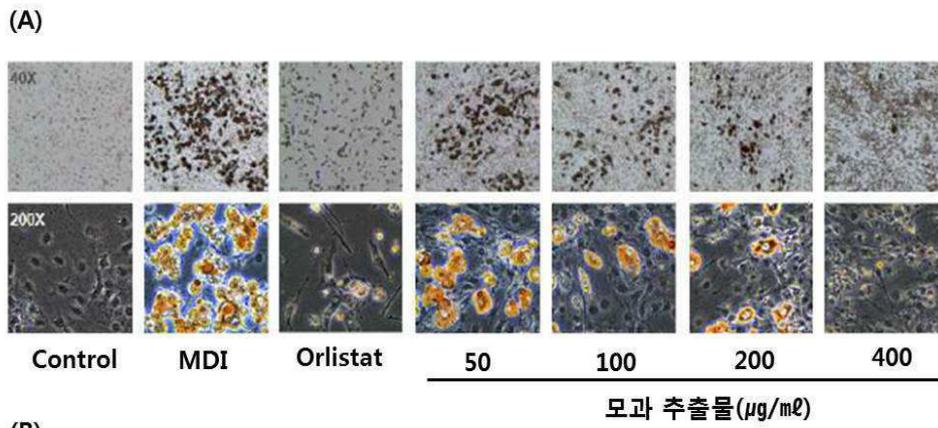
[0054] 상기 실시예 6의 모델 마우스(정상 식이, 고지방 식이 및 고지방 식이+모과추출물)에서 분리한 조직을 10% 인산 완충 포르말린(phosphate-buffered formalin)에서 하루 이상 고정하며, 12시간 이상 흐르는 물에서 포르말린을 세척한 후 60% 에탄올에서 1시간, 70% 에탄올에서 1시간, 80% 에탄올에서 1시간, 90% 에탄올에서 1시간, 95% 에탄올에서 1시간, 100% 에탄올에서 1시간씩 단계적으로 탈수시켰다. 자일렌(Xylen)에서 1시간씩 3번의 투명과정 후 파라핀에서 1시간씩 2번 침투과정을 실시하였다. 포매과정(embedding)을 거쳐 약 4 μm의 두께로 박절(section)하여 슬라이드의 물기를 없애고 마운팅 용액(Sigma, MO, USA)을 떨어뜨려 영구보존 할 수 있도록 하였다. 도 7에 개시된 바와 같이, 정상 식이 대조군에 비해 고지방식이 대조군의 지방 세포 크기가 증가하였고, 간 조직에서도 지방과 염증소견이 확인되었다. 반면, 본 발명의 모과 추출물 투여군에서는 지방 세포 크기와 간 지방 축적 및 염증이 효과적으로 억제된 것을 확인할 수 있었다.

[0055] **실시예 8. 모과 추출물로부터 얻은 용매별 분획물들의 3T3-L1 지방전구세포 분화 억제 활성**

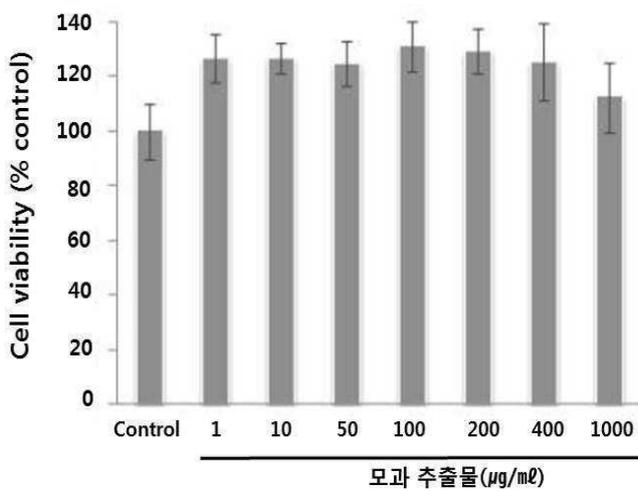
[0056] 마우스 유래 3T3-L1 지방전구세포(pre-adipocytes)에 지방분화를 유도하였으며, 100 μg/mL의 모과 추출물 및 이의 용매별 분획물들을 처리한 후 Oil red O를 이용하여 생성된 지방의 양을 측정함으로써 지방분화에 미치는 모과 추출물 및 이의 용매별 분획물들의 효능을 판단하였다. 그 결과, 도 8에 개시된 바와 같이 모과 추출물을 처리한 군에 비해 용매별 분획물들을 처리한 군에서 지방과립(lipid droplet) 생성이 현저히 억제되는 것을 현미경으로 확인하였으며, 염색된 Oil red O를 이소프로필 알코올(isopropyl alcohol)로 추출하여 정량한 결과에서도 유의한 억제 효능을 확인하였다. 용매별 분획물들 중 핵산 및 클로로포름 분획물은 독성으로 인해 비특이적 결과를 보였으며, 에틸아세테이트 분획물이 가장 효과적인 것을 확인할 수 있었다.

도면

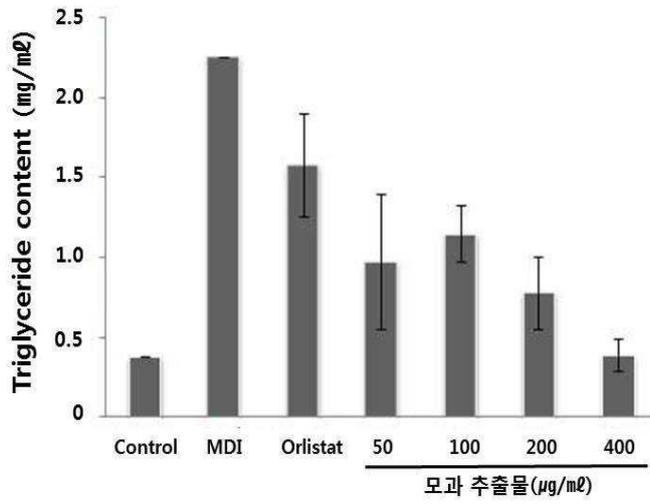
도면1



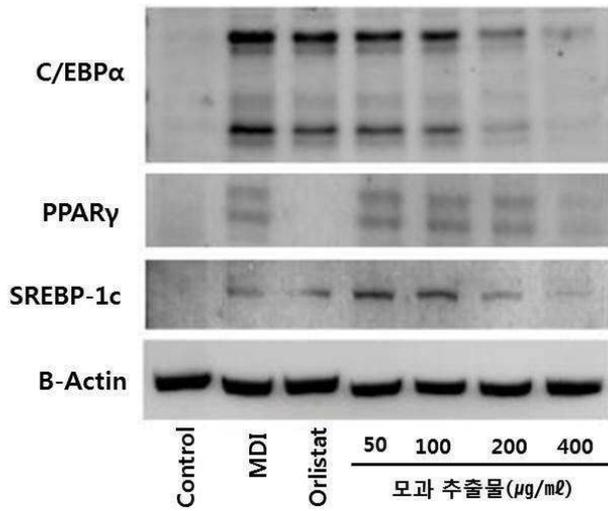
도면2



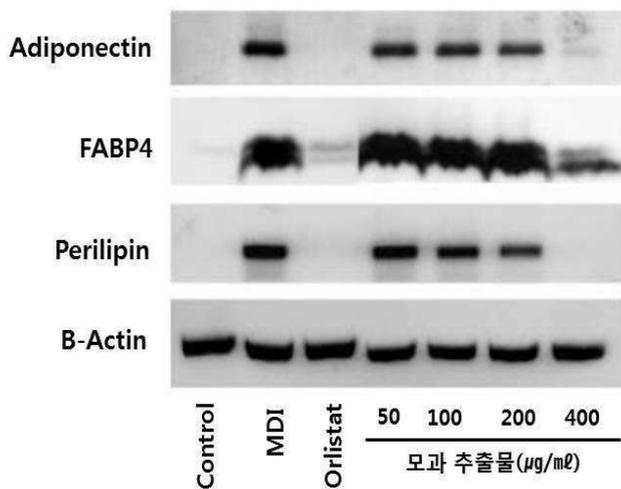
도면3



도면4



도면5

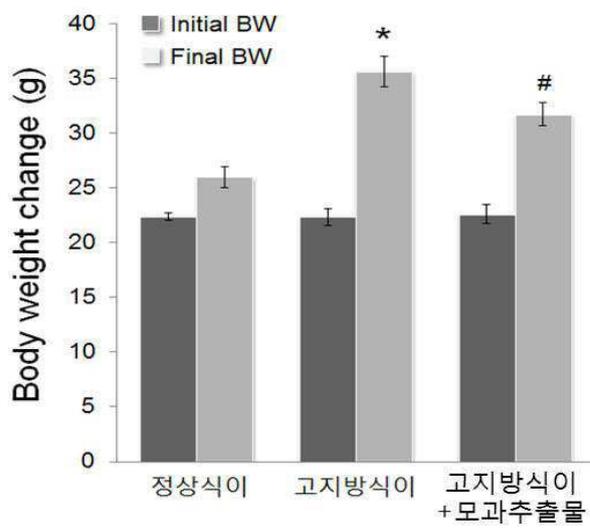


도면6

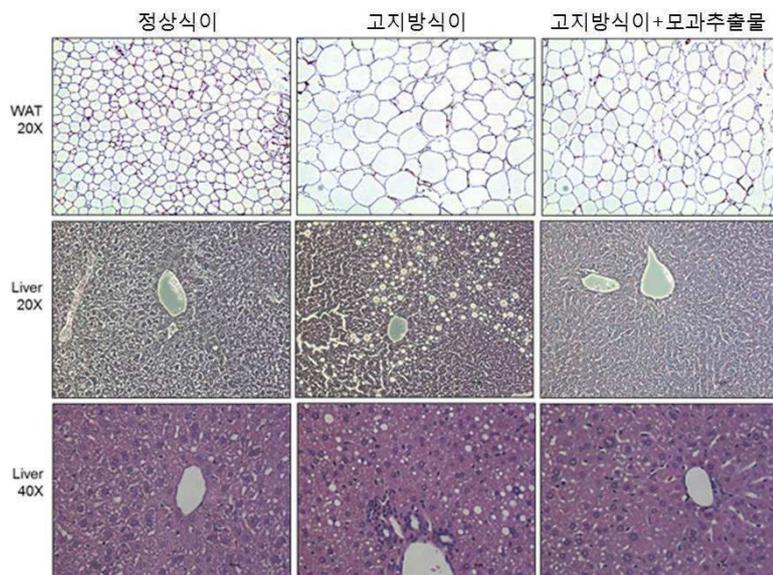
(A)



(B)



도면7



도면8

