



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2017년08월14일  
 (11) 등록번호 10-1767604  
 (24) 등록일자 2017년08월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 36/758* (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 36/758* (2013.01)  
*A23L 33/105* (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2015-0021974
- (22) 출원일자 2015년02월13일  
 심사청구일자 2015년02월13일
- (65) 공개번호 10-2015-0100511
- (43) 공개일자 2015년09월02일
- (30) 우선권주장  
 1020140021859 2014년02월25일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌  
 Open Access Scientific Reports. 2013. Vol. 2,  
 No. 3, pp. 1-8\*  
 한국식품영양학회지. 2013. 제26권, 제4호, 페이지  
 615-619\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
 한국생명공학연구원  
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
- (72) 발명자  
 이현선  
 대전광역시 유성구 과학로 125  
 김문옥  
 대전광역시 유성구 과학로 125  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
 손민

전체 청구항 수 : 총 5 항

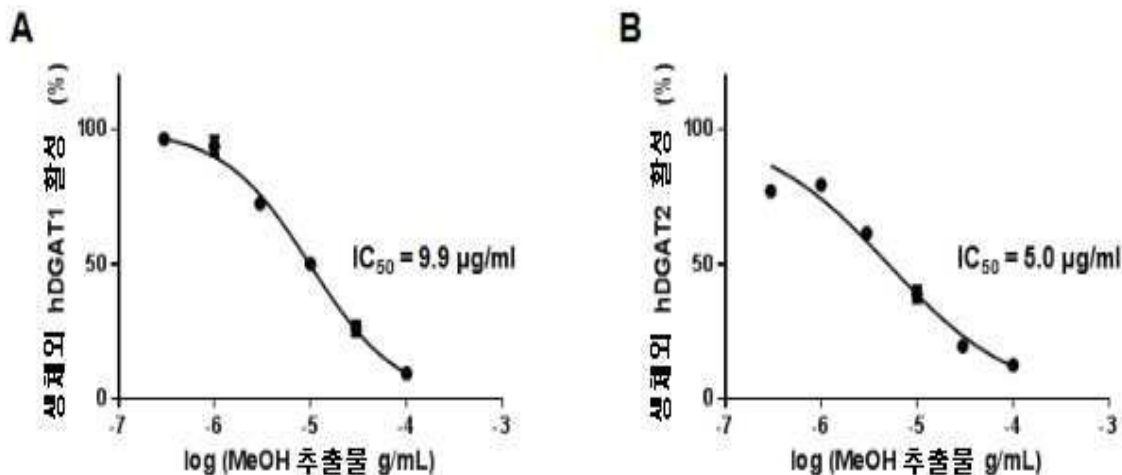
심사관 : 감유림

**(54) 발명의 명칭 개선초 추출물을 함유하는 대사성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물**

**(57) 요약**

본 발명은 개선초(*Zanthoxylum planispinum*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 개선초 추출물은 대사성 질환을 유발하는 디아실글리세롤 아실트랜스퍼라제(diacylglycerol acyltransferase(DGAT))와 pancreatic lipase의 활성을 효과적으로 억제하고, 인간유래 간세포(HepG2)와 십이지장선암세포(HuTu 80) 내의 중성지방 생합성을 저해하며, 동물 지질 경구부하시험(oral lipid tolerance test(OLTT))에서 위장관에서 중성지방의 흡수를 효과적으로 억제하여 중성지방의 혈중강화 효과를 나타내므로, 본 발명의 개선초 추출물은 비만, 제2형 당뇨, 인슐린저항성, 이상지질혈증, 간지방증(hepatic steatosis) 및 비알콜성 지방간(fatty liver) 등의 대사성 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

**대표도** - 도1



(72) 발명자

**오세량**

대전광역시 유성구 과학로 125

**조성찬**

대전광역시 유성구 과학로 125

**강종순**

대전광역시 유성구 과학로 125

**권은빈**

대전광역시 유성구 과학로 125

**금향**

중국 운남성 곤명시 오휘구 백운로 761번지 7동  
501호

**이와니**

중국 운남성 곤명시 오휘구 백운로 761번지 4동  
601호

**이상우**

대전광역시 유성구 과학로 125

**이중구**

대전광역시 유성구 과학로 125

**최상호**

대전광역시 유성구 과학로 125

**이창영**

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013072288

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단(대전)

연구사업명 과학기술국제화사업

연구과제명 해외식물 소재로부터 대사질환용 전임상 후보소재 발굴

기여율 1/1

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2013.10.01 ~ 2014.09.30

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

개산초(*Zanthoxylum planispinum*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 제2형 당뇨 또는 인슐린저항성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 개산초 추출물은 에탄올 또는 메탄올로 추출되는 것을 특징으로 하는 제2형 당뇨 또는 인슐린저항성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 개산초 추출물은 디아실글리세롤 아실트랜스퍼라제(diacylglycerol acyltransferase(DGAT)) 효소 활성을 저해하는 것을 특징으로 하는 제2형 당뇨 또는 인슐린저항성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 6

개산초 추출물을 유효성분으로 함유하는 제2형 당뇨 또는 인슐린저항성 질환의 예방 및 개선용 건강식품.

#### 청구항 7

삭제

#### 청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 개산초 추출물은 디아실글리세롤 아실트랜스퍼라제 효소 활성을 저해하는 것을 특징으로 하는 제2형 당뇨 또는 인슐린저항성 질환의 예방 및 개선용 건강식품.

## 발명의 설명

### 기술분야

본 발명은 개산초(*Zanthoxylum planispinum*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만, 제2형 당뇨, 인슐린저항성, 이상지질혈증, 간지방증(hepatic steatosis) 및 비알콜성 지방간(fatty liver) 등의 대사성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0001]

**배경 기술**

[0002] 대사장애는 일반적으로 심혈관 질병을 결정짓는 위험 요소로, 비만, 당뇨병, 인슐린 저항증(*insulin resistance*), 지질 대사 이상, 고중성지방혈증 (*hypertriglyceridemia*), 유리지방산의 증가, 고밀도 콜레스테롤의 감소 및 고혈압 등의 병들이 대사성 질환에 포함된다. 대사장애는 유전적인 결함으로 인해서 신체의 대사 과정에 문제가 생성되어 발생된다. 대부분 대사장애의 유전적 결함은 부모로부터 유전되며, 대사장애의 원인이 되는 유전자의 종류는 다양하다고 밝혀졌다. 대사과정은 신체에서 섭취한 음식을 사용할 수 있는 에너지로 전환하는 일련의 과정을 일컫는다. 신체는 효소를 이용하여 음식을 잘게 분해한 후 소화시킬 수 있는 간단한 형태로 만든다. 또한 세포내의 또 다른 효소는 음식물로부터 섭취할 수 없는 형태의 물질을 에너지원으로 사용하기 위하여 생성하는 역할을 한다. 즉, 대사장애의 유전적인 결함은 대사에 필요한 효소가 정상적으로 활동할 수 없거나, 신체가 생성하는 효소의 양이 극도로 감소하거나, 없어지는 경우에 발생한다. 또한 유전적 결함으로 인해 섭취된 물질이 분해되지 않고, 신체 내에서 독성을 갖게 되는 경우도 발생하며, 신체에서 필요한 물질을 대사과정을 통해서 공급할 수 없는 결과가 초래되기도 한다.

[0003] 현대 사회에서 비만은 다양한 원인에 의해 체내의 지방 축적량이 증가하여 발생하고 있으며, 체내의 과도한 지방 축적의 위험에 대해서는 그리스 시대부터 알려졌다고 하나, 이로 유도되는 병에 대해서는 지난 세기 비만이 영양부족을 제치고 주요한 문제로 자리매김하면서 그 중요성이 평가되기 시작하였다. 또한, 비만은 고혈압, 당뇨병, 심장질환, 동맥경화, 고지혈증과 같은 대사성 질환으로 발전할 수 있기 때문에 그 치료와 예방이 중요하다. 또한 근래에는 비만, 당뇨병, 고지혈증 등의 증가로 비 알코올성 지방 간염이 증가하고 있으며, 일부는 간경변증으로 진행되는 것으로 알려져 있다. 더욱이 지방간이 단순한 간 질환이 아니라 대사 질환의 초기 증상으로 여겨지면서 비만으로 인한 지방간의 조기 진단과 치료의 중요성이 커지고 있다.

[0004] 비만에 의한 만성질환 유발 기전의 하나로 과도한 에너지 공급이 에너지 저장조직인 지방조직의 한계를 넘어서 간, 근육, 췌장, 심장 등 비 지방조직에 중성지방 형태로 축적되며 혈중 유리지방산의 증가에 의한 세포사멸과 염증, 지방산 합성증가, 지방산 산화속도 감소, 근육과 간에서의 인슐린 내성 증가, 췌장에서의 인슐린 생성 감소와 베타세포 사멸, 심장에서의 심부전, 심근경색, 간에서의 비알콜성 지방간(*non-alcoholic fatty liver (NAFLD)*) 등의 문제가 발생한다고 알려져 있다. 따라서, 지방의 흡수, 지방생합성 억제와 지방산화 증대를 통한 조직의 지방축적의 억제는 비만, 인슐린저항성, 당뇨, 지방간 및 대사증후군의 예방 및 치료의 효율적인 전략이 될 수 있다.

[0005] 중성지방의 대표적인 형태인 트리글리세라이드(*triglycerides(TG)*)의 생합성에 있어서 결정적인 효소는, 아실 코에이(*acyl CoA*) 및 디아실글리세롤(*diacylglycerol*)로부터 TG를 생성하는데 촉매작용을 하는 디아실글리세롤 아실트랜스퍼라제(*diacylglycerol acyltransferase(DGAT)*)라는 효소로서 포유동물의 다양한 조직에서 발견된다. DGAT는 중성지방 합성의 주경로인 글리세롤 포스페이트(*glycerol phosphate*) 경로의 마지막 단계에서 디아실글리세롤(*diacylglycerol*)의 하이드록실기에 지방산 아실코에이(*fatty acyl-CoA*)를 결합시켜 TG를 합성하는 효소이다. 지금까지, DGAT는 2가지 이소체(*isoform*)인 DGAT1 및 DGAT2이 있는 것으로 밝혀져 있다. 이들의 생화학적 기능은 유사하나 조직분포(DGAT1은 소장과 지방조직, DGAT2는 간과 지방조직에서 주로 발현) 및 속해 있는 유전자 군(DGAT1은 ACAT 패밀리, DGAT2는 MGAT 패밀리)이 달라 이들의 TG 생합성에 대한 역할이 다를 것으로 예상된다(Yen CE., Stone SJ, Koliwad S, Harris C, and Farese RV. 2008. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J. Lipid Research*. 49: 2283-2301).

[0006] 최근, 미국의 글래드스톤 심장질환연구소에 실행한 DGAT1 유전자 결핍 마우스를 이용한 DGAT 기능 연구에서, DGAT1 결핍 마우스에 고지방식이를 투여한 결과, 체중 증가(*diet-induced obesity*)가 효과적으로 억제되었고 인슐린(*insulin*)과 렙틴(*leptin*)에 대한 감수성이 증대되어 당대사(*glucose metabolism*)가 개선된다는 증거를 제시하고 있다. 또한, 후속 연구 결과에서는 인슐린에 민감한 조직인 지방조직, 골격근, 간, 췌장의 베타세포(*beta-cell*) 등에서 중성지방 생합성 과정을 촉매하는 효소인 DGAT1를 선택적으로 저해하는 것이 비만과 제2형 당뇨의 예방 및 치료에 효과적임이 밝혀져 부상되고 있다(Chen HC, et al., *Trends Cardiovasc. Med.*, 10, 188-192, 2000; Farese Jr. et al., *Curr. Opin. Lipidol.*, 11, 229-234, 2000; A. Subauste et. al.,

*Currunt Drug Target-Immun, Endocrine & Metabol Disorders*, 3, 263-270, 2003; Y. Yu et. al. *Anal of Medicine*, 36. 252-261).

[0007] DGAT1의 활성을 저해시키면 DGAT의 중성지방을 합성하는 효소 촉매 반응이 차단 또는 합성 효율의 감소가 일어난다. 중성지방 합성에 관여하는 최종 단계의 효소인 DGAT를 저해하여 중성지방의 생합성을 억제할 경우, 지방조직 내의 지방의 축적이 억제되고 지방세포의 크기가 감소하고, 운동량의 증가와 짝풀림(uncoupling) 단백질의 발현증가에 의해 에너지 소비가 증가함으로써, 고지방식이에 의해 유도된 체중 증가가 억제된다(Smith SJ. et al., *Nature genetics*, 25, 87-90, 2000; Chen et al., *J Clin Invest.*, 109(8), 1049-1055, 2002; Chen et al., *J Clin Invest.*, 111, 1715-1722, 2003; Chen et al. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 284, E213-218, 2003).

[0008] 또한, DGAT1의 저해는 골격근, 간, 췌장 등의 비 지방조직(non-adipose tissue)에서 지방의 축적을 억제함으로써 인슐린 저항성을 개선시키는 것으로 알려져 있다. 즉, 세포가 인슐린에 의해 자극받으면 IRS-1(insulin receptor substance-1)의 세린(serine)부위의 인산화(inhibitory phosphorylation)가 감소되고 타이로신(tyrosine) 부위의 인산화가 증가됨으로써, PI-3K(phosphatidylinositol-3 kinase), PKB(protein kinase B, Akt), PKC $\lambda$ (proteinkinaseC $\lambda$ )등을 거치는 인슐린 신호전달의 활성화를 통하여 당 수송체인 GLUT-4의 수가 늘어난다. 세포내에서 DGAT1의 활성이 저해될 경우, PI-3K, PKB 및 PKC $\lambda$ 의 활성이 증가하면서 막으로 엑소사이토시스되는 GLUT-4 수가 증가하게 되고 최종적으로 세포내로 유입되는 포도당의 수가 증가하게 된다. 즉, DGAT1의 활성 억제는 인슐린 민감성을 증가시킨다(Chen et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25(3), 482-486, 2005; Chen et al., *J Clin Invest.* 111(11), 1715-22, 2003; Chen et al., *J Clin Invest.* 109(8), 1049-1055, 2002; Chen et al., *Diabetes.* 51(11), 3189-3195, 2002; *Subauste and burant.*, *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 3(4), 263-270, 2003). DGAT1 저해와 인슐린 저항성 극복의 직접적인 관련성이 밝혀지면서, DGAT1 저해가 인슐린 분비량은 정상이나 인슐린 저항성을 가지게 되면서 포도당 흡수가 장애를 받는 제2형 당뇨병의 치료의 표적으로 작용하는 것을 알 수 있다.

[0009] 한편, DGAT2의 경우, 동물실험을 포함한 다양한 연구에서 생체 내 TG의 생합성에 DGAT2가 주로 기여하는 것으로 알려져 있다. DGAT2 결핍(knockout) 마우스는 TG를 거의 합성해내지 못하고 비정상적인 피부층으로 인해서 태어난 후 얼마 지나지 않아 죽게 되는 것과는 달리, DGAT1 결핍 마우스는 TG 수준이 약간 감소하고 마우스의 생존에는 문제가 없음을 보여주고 있다(Stone SJ, Myers HM, Watk Feingold KR, Elias PM, 및 Farese RV. 2004. *J. Biol. Chem.* 279: 11767-11776; Smith SJ, Cases S, Jensen DR, Chen HC, Sande E, Tow B, Sanan DA, Raber J, Eckel RH, 및 Farese RV. 2000. *Nat. Genet.* 25: 87-90).

[0010] 지방간 동물모델에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드(Antisense oligonucleotide(ASO))를 이용하여 DGAT1 또는 DGAT2의 발현량을 감소시킨 결과, 단지 DGAT2의 양을 감소한 경우에만 지방간 증상이 완화되고 간에서의 포도당 생성물이 현저히 감소하는 것을 나타냈다. DGAT2가 지방간을 포함한 관련 대사성 질환의 치료를 위한 분자표적으로 활용될 수 있음을 강하게 증명하고 있다(Choi CS, Savage DB, K $\mu$ larni A, Yu XX, Liu ZX, Morino K, Kim S, Distefano A, Samuel VT, Neschen S, Zhang D, Wang A, Zhang XM, Kahn M, Cline GW, Pandey SK, Geisler JG, Bhanot S, Monia BP, Sh $\mu$ lman GI. 2007. *J. Biol. Chem.* 282: 22678-88; Yu XX, Murray SF, Pandey SK, Booten SL, Bao D, Song XZ, Kelly S, Chen S, McKay R, Monia BP, Bhanot S. 2005. *Hepatology.* 42: 362-71; Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, Bhanot S, Monia BP, Li YX, Diehl AM. 2007. *Hepatology.* 45: 1366-74).

[0011] 노바티스(Novartis), 화이자(Pfizer), 비엠에스(BMS) 및 아스트라제네카(AstraZeneca)를 비롯한 몇몇 거대 제약회사에서 비만, 당뇨, 지방간, 고지혈증 등을 포함한 대사성 질환의 분자표적으로서 DGAT1을 결정하고 활발히 그 억제제 개발 프로그램을 진행하였으며, 현재 그 중 일부가 임상 시험 중에 있다(Zhao et al. *J. Med. Chem.* 51, 380-383, 2008; Birch et al. 52, 1558-1568, 2009; Dow, *Metabolic Disease Drug Discovery &*

Development, Half Moon Bay, CA, USA, 2009; Yun et al. 237<sup>th</sup> ACS National Meeting, Salt Lake City, UT, USA: Abs: MEDI-256, 2009). 또한, 국내에서도 일부 제약회사 및 정부출연연구소 등에서 DGAT1의 억제물질 개발 및 이를 이용한 대사성 질환의 치료제 개발 연구를 진행 중에 있다. 그러나, DGAT2를 분자표적으로 하는 신약 개발 프로그램은 국내외에서 거의 보고되지 않은 상황이다.

[0012] 특히, 천연물로부터 추출한 DGAT 효소 저해제로서, *Aphanamixis grandifolia*로부터 분리된 디테르펜계의 aphadilactones A-D(J. Org. Chem. 79, 599-607, 2014), 관동화(*Tussilago farfara*)로부터 분리된 세스퀴테펜계 물질 (Park et al. J. Agric. Food Chem. 56, 10493-10497, 2008), 호초와 필발로부터 알카마이드계(alkamide, J. Agric. Food Chem. 54, 9759-9763, 2006), 인삼으로 분리한 폴리아세틸렌계(Lee et al. *Planta Med.* 70, 199-200, 2004), 오수유로부터 퀴놀론 알칼로이드(quinolone alkaloids, Ko et al. *Planta Med.* 68, 1131-1133, 2002), 단삼의 탄시논계(tanshinones, Ko et al., *Arch. Phar. Res.* 25, 446-448, 2002), 고삼으로부터 분리한 프레닐플라보노이드계(Prenylflavonoids, Chung et al. *Planta Med.* 70, 258-260, 2004) 등이 알려져 있다. 그 외에 일본의 기타사토 연구소의 오무라(Omura) 그룹에서 보고한 저해제로서 로셀리핀(roselipins)(US6432682(2002), US6608185(2003)), 코클리오퀴논 에이 및 에이원(cochlorioquinone A and A1, *J. Antibiot.*, 56, 967, 2003; *J. Antibiot.*, 57, 59, 2004), 아미덱신(amidepsines) 및 크산토후몰(xanthohumols), 그 외 에이코사펜타에노익에시드(eicosapentaenoic acid), 2-브로모옥타노에이트(2-bromooctanoate), 나이아신(niacin) 등이 보고된바 있으나(Rustan et al., *J. Lipid. Res.*, 29, 1417-1426, 1988; Ganji et al. *J. Lipid. Res.*, 45, 1835-1845), 개산초의 DGAT 효소 저해 활성에 대해서는 알려진 바 없다.

[0013] 개산초(*Zanthoxylum planispinum*)는 운향과(Rutaceae)의 초피나무속(*Zanthoxylum*)에 속하는 식물로서 우리나라를 비롯하여 중국 등지에 분포되어 있으며 감기 및 치통의 치료에 민간약으로 사용되어 왔다. 그러나, 상기 개산초는 리그난계 성분을 가지고 있고, 항산화 활성 및 항균활성만이 보고되어 있을 뿐, 지금까지 대사성 질환에 대한 연구는 알려진 바가 거의 없다(Yang et al. *Helvetica Chimica Acta*, 92, 1657-1664, 2009; Deng et al. *Food Chemistry*, 125, 1430-1435, 2009).

[0014] 이에 본 발명자들은 대사성 질환의 치료에 있어서 DGAT의 중요성을 감안하여 천연물로부터 DGAT를 억제하는 활성물질을 탐색하기 위해 노력한 결과, 개산초 추출물이 DGAT 효소와 pancreatic lipase 효소 활성을 저해하고, 동물모델에서 위장관에서 지방의 흡수와 재합성을 억제하여 혈중 중성지방 강하효과를 나타냄을 확인하였다. 이로써 개산초 추출물이 비만, 제2형 당뇨, 인슐린저항성, 고지혈증, 간지방증 및 비알콜성 지방간 등의 대사성 질환의 예방 및 치료 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성시켰다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 목적은 개산초(*Zanthoxylum planispinum*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

#### 과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 개산초(*Zanthoxylum planispinum*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 아울러, 본 발명은 개산초 추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

**발명의 효과**

[0018] 본 발명의 개산초(*Zanthoxylum planispinum*) 추출물은 대사성 질환을 유발하는 DGAT1 및 DGAT2의 활성, pancreatic lipase을 효과적으로 억제하고, 세포내 중성지방의 생합성을 저해하며, 동물을 이용한 지질 경구부하시험(oral lipid tolerance test(OLTI))에서 혈중 내 중성지방 강하 효과가 나타나므로 비만, 제2형 당뇨, 이상지질혈증, 간지방증 및 비알콜성 지방간 등의 대사성 질환의 예방 및 치료에 유효성분으로서 유용하게 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0019] 도 1은 개산초(*Zanthoxylum planispinum*) 메탄올 추출물을 농도별(0.3, 1, 3, 10, 30 및 100  $\mu\text{g/ml}$ )로 처리하여 DGAT1(diacylglycerol acyltransferase 1) 및 DGAT2의 저해활성을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 HepG2(인간유래 간세포) 및 HuTu 80(인간유래 십이지장선암세포)내에서의 중성지방 생합성에 대한 개산초 추출물의 저해 활성을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 pancreatic lipase에 대한 개산초 메탄올 추출물의 농도 의존적인 저해활성을 나타낸 도이다.

도 4는 동물 지질 경구부하시험(OLTT)을 이용하여 개산초 메탄올 추출물에 의한 혈중지질 강하효과를 나타낸 도이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0020] 이하, 본 발명의 용어를 상세히 설명한다.

[0021] 본 발명에서, 용어 “투여”는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며 물질의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0022] 또한, 상기 “투여”는 본 발명의 조성물을 세포로 “전신 전달” 또는 “국소 전달” 하여 도입되는 것을 뜻한다. “전신 전달”은 유기체 내에 조성물의 광역 생체분포를 유발하는 전달을 지칭한다. 일부 투여 기술은 특정한 조성물의 전신 전달을 유발하고, 다른 것들에는 그렇지 않을 수 있다. 상기 전신 전달은 유용한, 바람직하게는 치료적으로 유효한 양의 조성물이 신체의 대부분에 노출되는 것을 의미한다. 일반적으로, 광역 생분포를 얻기 위하여, 조성물이 투여 부위와 멀리 떨어진 질환 부위에 도달하기 전에 빠르게 분해되거나 제거되지 않도록(예를 들면, 최초 통과 기관(간, 폐 등)에 의해 또는 빠른 비특이적 세포 결합에 의해) 혈액내에서 수명이 요구된다.

[0023] 본 명세서에 사용된 “국소 전달”은 유기체 내에서 표적 부위에 조성물을 직접 전달하는 것을 지칭한다. 예를 들면, 조성물은 질환 부위, 예를 들면 종양, 또는 다른 표적 부위 또는 표적 기관 등에 직접 주사함으로써 국소 전달될 수 있다.

[0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0025] 본 발명은 개산초 추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0026] 상기 개산초 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다:

[0027] 1) 개산초에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0028] 2) 단계 1)의 추출물을 식힌 후 여과하는 단계; 및

- [0029] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하는 단계.
- [0030] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 개산초는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있으며, 천연, 잡종 또는 변종 수련의 모든 기관, 예를 들어, 뿌리, 가지, 줄기, 잎, 꽃을 모두 포함하는 것이 바람직하고, 잎과 줄기를 포함한 지상부인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0031] 상기 방법에 있어서, 상기 추출물은 물, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>2</sub>의 알코올 또는 이들의 혼합물인 용매로 추출되는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다. 추출 방법으로는 여과법, 열수추출, 침지추출, 환류냉각추출 및 초음파추출 등 당업계의 통상적인 방법을 이용하는 것이 바람직하다. 상기 열수추출 방법으로는 1회 내지 5회 추출하는 것이 바람직하고, 3회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 상기 추출용매는 건조된 개산초에 0.1 내지 10배 첨가할 수 있으며, 0.3 내지 5배 첨가하는 것이 바람직하다. 추출온도는 20℃ 내지 40℃인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 12 내지 48시간인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0032] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 상기 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0033] 상기 대사성 질환은 비만, 제2형 당뇨, 인슐린저항성, 간지방증(hepatic steatosis) 및 비알코올성 지방간(fatty liver)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0034] 상기 개산초 추출물은 지질대사 과정에서 비만, 당뇨병, 고지혈증, 지방간 등과 같은 대사성 질환을 유발하는 디아실글리세롤 아실트랜스퍼라제(diacylglycerol acyltransferase(DGAT))의 효소활성을 저해시키는 것이 바람직하다.
- [0035] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 개산초를 분쇄하여 메탄올, 에탄올 또는 물에 각각 침지하여 추출한 후, 추출액을 여과하고, 감압 농축하여 메탄올 추출물, 에탄올 추출물, 물 추출물을 수득하였다. 그런 다음, 개산초 추출물의 인간 DGAT1 & DGAT2 효소 저해 활성을 측정된 결과, 본 발명의 개산초 추출물은 농도-의존적으로 DGAT의 효소활성을 저해함을 확인하였다(표 1, 표 2 및 도 1 참조).
- [0036] 또한, 본 발명의 개산초 메탄올 추출물에 의한 세포내에서의 중성지방 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 인간 유래 간세포인 HepG2 및 인간유래 십이지장선암세포인 HuTu 80을 이용하여 세포내에서의 중성지방 생합성 저해 활성을 측정된 결과, HepG2 세포에 개산초 추출물을 1, 3, 10 및 30 µg/ml의 농도로 처리하고 [<sup>14</sup>C]글리세롤을 기질로 사용했을 때 세포내의 중성지방 생성을 매우 효과적으로 저해하였으며, HuTu 80세포에 개산초 추출물을 1, 3, 10 및 30 µg/ml의 농도로 처리하고 [<sup>14</sup>C]올레이트를 기질로 사용했을 때에도 농도-의존적인 중성지방 생합성 저해효과를 확인하였다(표 3 및 도 2 참조).
- [0037] 또한, 본 발명의 개산초 추출물을 마우스에 경구 투여하고, 고지방식이로 콘 오일(corn oil)을 투여하여 혈중에 나타나는 중성지방의 농도 변화를 관찰한 결과, 본 발명의 추출물이 투여된 마우스는 대조군 마우스와 대비하여 중성지방 농도의 상승을 억제하는 효과가 우수한 것을 확인하였다(표 4 및 도 4 참조).
- [0038] 따라서, 본 발명의 개산초 추출물은 장피세포에서 DGAT효소 활성을 저해하고, 중성지방의 재합성을 억제하며, 동물실험 결과, 위장관에서 지방의 흡수를 유의적으로 억제함으로써 비만, 당뇨병, 고지혈증, 지방간 등의 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 조성물의 총 중량에 대하여 본 발명의 개산초 추출물을 0.1 내지 99.9 중량%를 유효성분으로 함유하고, 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 상기 고형제에는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스(sucrose), 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 제조될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘스테아레이트



(magnesium stearate), 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 과라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0041] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라, 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사 방식을 선택하는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 피부 외용으로 사용한다.
- [0042] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 개별 투약량은 구체적으로 유효 약물이 1회에 투여되는 양을 함유한다.
- [0043] 일일 투여량은 개산초 추출물의 양을 기준으로 0.01 내지 1000 mg/kg이고, 바람직하게는 30 내지 500 mg/kg이고, 더욱 바람직하게는 50 내지 300 mg/kg이며, 하루 1 내지 6회 투여될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0045] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0046] 상기 대사성 질환은 비만, 제 2형 당뇨, 인슐린저항성, 간지방증 및 비알코올성 지방간으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나 이에 한정하지 않는다.
- [0047] 상기 개체는 척추동물이고, 구체적으로는 포유동물이고, 더욱 구체적으로는 쥐, 토끼, 기니아피그, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이며, 더욱 더 구체적으로는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물일 수 있다.
- [0048] 따라서, 본 발명의 개산초 추출물은 장피세포에서 DGAT효소 활성을 저해하고, 중성지방의 재합성을 억제하며, 동물실험 결과, 위장관에서 지방의 흡수를 유의적으로 억제함으로써 비만, 당뇨병, 고지혈증, 지방간 등의 대사성 질환의 예방 또는 치료 방법에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0049] 상기 약학적으로 유효한 양이란 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이나, 이에 한정되는 것은 아니다. 투여량은 특정 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여기간, 투여방법, 제거율, 질환의 중증도 등에 따라 달라질 수 있다.
- [0050] 상기 약학적 조성물은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 비경구 투여시 복강내 주사, 직장내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.
- [0051] 또한, 본 발명은 개산초 추출물을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 및 개선용 건강식품용 조성물을 제공한다.
- [0052] 본 발명의 개산초 추출물은 장피세포에서 DGAT효소 활성을 저해하고, 중성지방의 재합성을 억제하며, 동물실험 결과, 위장관에서 지방의 흡수를 유의적으로 억제함으로써 비만, 당뇨병, 고지혈증, 지방간 등의 대사성 질환의 예방 또는 개선용 건강식품에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 건강식품은 개산초 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 개산초 추출물을 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, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0054] 본 발명의 건강식품 중의 하나인 건강 음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 g당 일반적으로 약 0.01 - 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 - 0.03 g의 범위에서 선택할 수 있다.

[0055] 상기 외에 본 발명의 건강식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 상기 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 - 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0056] 또한, 본 발명은 개산초 분획물을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0057] 상기 개산초 분획물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[0058] 1) 개산초에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0059] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계;

[0060] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하여 개산초의 추출물을 제조하는 단계; 및

[0061] 4) 단계 3)의 개산초 추출물을 추가적으로 유기용매로 추출하여 개산초 분획물을 제조하는 단계.

[0062] 상기 방법에 있어서, 단계 4)의 유기용매는 노르말-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 부탄올인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 상기 분획물은 개산초 추출물을 물에 현탁시킨 후 노르말-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 노르말-부탄올 및 물로 순차적으로 계통 분획하여 수득한 노르말-헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 노르말-부탄올 분획물 또는 물 분획물 중 어느 하나인 것이 바람직하며, 에틸아세테이트 분획물임이 더욱 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 상기 분획물은 상기 개산초 추출물로부터 분획 과정을 1 내지 5회, 바람직하게는 3회 반복하여 수득할 수 있고, 분획 후 감압 농축하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0063] 따라서, 본 발명의 개산초 추출물은 위장관에서 pancreatic lipase 효소활성을 저해하여 식이를 통해 흡수된 중성지방의 가수분해를 억제하고, 장상피세포에서 DGAT효소 활성을 저해하여 중성지방의 재합성을 억제하였으며, 동물실험 결과, 위장관에서 지방의 흡수를 유의적으로 억제하여 혈중 중성지방의 상승을 억제함을 나타냄으로써, 개산초 분획물을 비만, 당뇨병, 고지혈증, 지방간 등의 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

[0064] 이하, 본 발명을 실시예, 실험예 및 제조예에 의하여 상세히 설명한다. 단, 하기의 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0065] <실시예 1> 개산초(*Zanthoxylum planispinum*) 추출물의 제조

[0066] <1-1> 개산초 메탄올 추출물의 제조

[0067] 5 g의 건조된 개산초(해외생물소재은행, 한국생명공학연구원)를 분쇄하고 메탄올 100 ml에 침지하여 2 일간 2회 추출하였다. 추출액을 여과하고, 감압 농축하여 메탄올 추출물 490 mg을 얻었다.

[0068] <1-2> 개산초 에탄올 추출물의 제조

[0069] 5 g의 건조된 개산초를 분쇄하고 에탄올 100 ml에 침지하여 2 일간 2회 추출하였다. 추출액을 여과하고, 감압 농축하여 에탄올 추출물 403 mg을 얻었다.

[0070] <1-3> 개산초 물 추출물의 제조

[0071] 5 g의 건조된 개산초를 분쇄하고 물 100 ml에 침지하여 2 일간 2회 추출하였다. 추출액을 여과하고, 감압 농축하여 물 추출물 750 mg을 얻었다.

[0072] <실험예 1> DGAT1(diacylglycerol acyltransferase 1) 및 DGAT2 효소 활성저해도 실험

[0073] 상기 <실시에 1>에서 제조한 추출물에 의한 DGAT 효소 활성 저해 효과를 알아보기 위하여, 효소원으로서 인간 DGAT1 또는 DGAT2를 각각 sf9 곤충세포에 과발현시켰다. 상기 sf9 곤충세포로부터 얻은 hDGAT1 또는 hDGAT2 효소를 사용하여 DGAT의 효소활성 저해도 및 DGAT1 또는 DGAT2의 선택성을 조사하였다.

[0074] 구체적으로, 인간 유래 DGAT의 효소저해 활성 측정을 위하여, 인간 hDGAT1 또는 hDGAT2를 과발현시킨 sf9 곤충 세포로부터 분리한 마이크로솜 단백질을 효소원으로 사용하였고, 콜만의 다수가 이용한 방법(Coleman et al, *Methods Enzymol.*, 98-103, 1992)에 따라 기질로서 1,2-디아실글리세롤(Sigma, D0138) 및 [<sup>14</sup>C]올레오일-코에이(Amersham, CFA583)를 사용하여 효소 반응 후 생성된 [<sup>14</sup>C]트리아실글리세롤의 방사능의 양을 측정하였다.

[0075] 더욱 구체적으로, 반응액(175 mM Tris-HCl(pH 8.0), 20 μl의 소의 혈청 알부민(10 mg/ml), 100 mM의 염화마그네슘(4 mM MgCl<sub>2</sub>: DGAT2 효소활성), 30 μM의 [<sup>14</sup>C]올레오일 코에이(0.02 μCi, Amersham) 및 200 μM 1, 2-디아실글리세롤에 디메틸설폭사이드에 녹인 본 발명의 추출물 10.0 μl를 가하고, 분리한 마이크로솜 단백질을 30 μg(32 μg: DGAT2 효소활성)을 넣은 후 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 1.5 ml의 반응 종결액(2-프로판올:헵탄:물 = 80:20:2, v:v:v)을 가하여 반응을 정지시켰다. 상기 반응으로 생성된 [<sup>14</sup>C]트리아실글리세롤을 추출하기 위하여, 1 ml의 헵탄 및 0.5 ml의 증류수를 가하여 진탕한 후 상등액 1 ml을 취하고 여기에 2 ml의 알칼리성 에탄올 용액(에탄올:0.5 N 소듐히드록시드:물 = 50:10:40, v:v:v)을 가하여 진탕하였다. 상기 진탕액의 상등액 0.65 ml을 취하여 LSC(liquid scintillation counter)로 방사능의 양을 측정하고 DGAT의 저해활성을 하기 수학적 1로 계산하였다.

수학적 1

$$\text{저해활성(\%)} = 1 - [(T - B) / (C - B)] \times 100$$

[0076] T : 효소 반응액에 본 발명의 추출물을 넣은 시험군의 DPM 값,  
 [0077] C : 효소 반응액에 본 발명의 추출물을 넣지 않은 대조군의 DPM 값, 및  
 [0078] B : 효소원을 넣지 않고 본 발명의 추출물을 넣은 대조군의 DPM 값.

[0080] 상기 <실시에 1>에서 제조한 개산초의 메탄올, 에탄올 및 물 추출물을 30 μg/ml 및 100 μg/ml의 농도로 처리하여 hDGAT1 1 및 2의 효소 활성에 대한 저해능력을 측정하였고, 특히 메탄올 추출물을 0.3, 1, 3, 10, 30 및 100

μg/ml의 6개의 농도로 처리하여 50%의 저해활성을 나타내는 농도(IC<sub>50</sub>)를 구하였다.

[0081] 상기 실험결과를 하기 [표 1] 및 [표 2]에 정리하여 나타냈다.

[0082] 그 결과, [표 1] 및 도 1에 나타난 바와 같이, 개산초 추출물(메탄올, 에탄올 및 물 추출물)의 hDGAT에 대한 저해활성이 우수하게 나타났고, 그 중에서 메탄올 추출물이 가장 강한 저해활성을 나타냈으며, 에탄올 및 물 추출물 순으로 나타났다. 또한, [표 2]에 나타난 바와 같이 메탄올 추출물은 농도-의존적으로 hDGAT 저해활성을 나타내었으며 50%의 저해활성을 나타내는 농도인 IC<sub>50</sub>는 DGAT1 및 DGAT2 각각에 대해 9.9와 5.0 μg/ml로 매우 우수한 저해활성을 나타내는 것을 확인하였다(표 1, 표 2 및 도 1).

**표 1**

개산초 추출물의 DGAT 저해활성

[0083]

	저해율(%)			
	DGAT1		DGAT2	
	30 μg/ml	100 μg/ml	30 μg/ml	100 μg/ml
메탄올 추출물	73.5	90.2	80.2	87.3
에탄올 추출물	31.1	55.2	42.3	62.1
물 추출물	20.3	32.1	23.2	34.8

**표 2**

메탄올 추출물의 농도별 DGAT 저해활성

[0084]

	저해율(%)					
	0.3 μg/ml	1 μg/ml	3 μg/ml	10 μg/ml	30 μg/ml	100 μg/ml
DGAT1	3.5	6.0	27.0	50.0	73.5	90.2
DGAT2	22.2	20.0	38.3	61.0	80.2	87.3

[0085] <실험예 2> 개산초 메탄올 추출물의 세포내에서의 중성지방 생합성 저해 효과확인

[0086] <2-1> HepG2 세포내에서의 중성지방 생합성 저해 확인

[0087] 본 발명의 개산초 추출물에 의한 세포내에서의 중성지방 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, HepG2 세포를 이용하여 1 종의 기질에 대한 중성지방 생합성 저해 활성을 측정하였다.

[0088] 구체적으로, HepG2 세포를 ATCC에서 분양받았고, 2 mM L-글루타민이 포함된 최소필수배지(Minimum essential medium(MEM)); 1.5 g/L 탄산수소 나트륨(sodium bicarbonate), 0.1 mM 불필수 아미노산(nonessential amino acids) 및 1 mM 피루브산 나트륨(sodium pyruvate)을 함유하도록 제조된 earle's BSS 배지에 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 1% 항생제(100 U/ml 페니실린(penicillin) 및 100 g/ml 스트렙토마이신(streptomycin)을 첨가하여 37°C 및 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 세포내에서의 hGPAT1 효소 활성은 배양된 HepG2 세포에서 생성된 중성지방의 양으로 측정하였다. 효소활성 저해 물질로서 본 발명의 개산초 메탄올 추출물을 각각 첨가한 후 중성지방 생성물의 감소를 효소 저해제의 효과로서 결정하였다. 24 웰(well) 배양접시에 웰 당 1 × 10<sup>6</sup> 세포/ml의 세포수로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 FBS가 존재하지 않는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지로 교환하고 기질로서 [<sup>14</sup>C]글리세롤([<sup>14</sup>C]glycerol)을 첨가시키고 18시간 동안 반응시켰다. 상기 추출물은 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide(DMSO))에 녹여 사용하였으며, 대조군에는 본 발명의 추출물을 넣지 않고 디메틸설폭사이드만으로 반응을 시켰다. 대조군에서 생성된 중성지방의 생성물을 100으로 하였다.

[0089] 반응이 끝난 세포내에서 중성지방의 생성된 양을 측정하기 위하여, 세포를 흡수되지 않고 배지 중에 남아있는 기질인 [<sup>14</sup>C]글리세롤을 제거하고 인산완충식염수(PBS)로 1회 세척한 후 0.5 ml의 추출용매(헥산(hexane) : 아이

소프로판올(isopropanol) = 3:2, v:v)를 첨가하여 중성지방을 포함한 전체 지방을 추출하였다. 상기 추출 용매로 30 분씩 2회 추출하였고, 얻어진 추출액(1 ml)을 질소가스를 통해 농축하였다. 추출용매를 제거한 후 전체 지방을 유기용매(클로로포름:메탄올 = 2:1)에 녹여 박층 크로마토그래피(TLC: 실리카겔(silica gel) 60F<sub>254</sub>, 두께: 0.5 mm, Merck)에 점적하여 전개용매(헥산:디에틸에테르:아세트산 = 80:20:1, v:v:v)상에서 전개하였다. TLC 상에서 중성지방(Rf값: 0.4)을 분리한 후 TLC 판을 방사능 에너지를 감광할 수 있는 필름에 3 시간 동안 감광한 후, 이미지 분석(BAS-1500, Fuji Photo Film Co. Ltd.)을 통해 중성지방의 [<sup>14</sup>C] 방사능 양을 측정하였다. 추출 후 남아 있는 세포는 0.1 N 수산화나트륨 0.3 ml에 녹여 반응에 이용된 세포의 단백질 농도 측정에 이용하였다. 중성지방의 방사능 양을 측정하여 단백질 농도로 나눈 값을 실험값으로 하여 각 시험군 사이의 실험 오차를 보정하여, 본 발명의 개산초 추출물에 의한 중성지방의 생성률을 산출하였다. 그 결과, [표 3] 및 도 2에 나타낸 바와 같이, HepG2 세포에 개산초 추출물을 각각 1, 3, 10 및 30 µg/ml의 농도로 처리하고 [<sup>14</sup>C]글리세롤을 기질로 사용했을 때, 세포내의 중성지방 생성률을 농도-의존적으로 9%, 28%, 58%, 86%의 저해활성을 나타내는 것을 확인하였다(표 3 및 도 2).

[0090] <2-2> HuTu 80 세포내에서의 중성지방 생합성 저해 확인

[0091] HuTu 80 세포를 24-웰 배양접시에 2×10<sup>5</sup> (cells/well)로 각각 분주하였다. 24시간 후에, FBS가 존재하지 않는 DMEM 배지로 교환하고 본 발명의 개산초 메탄올 추출물 및 기질을 동시에 처리하였다. 기질로서 0.5 µCi [<sup>14</sup>C]올레이트를 각각 첨가하였고 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 세포로 흡수되지 않거나 반응에 사용되지 않은 기질을 PBS로 2회 세척한 후, 1 ml의 추출 용매(n-헥산/2-프로판올=3/2, v/v)를 첨가하여 중성지방을 포함한 전체 지방을 추출하였다. 얻어진 추출액은 질소가스를 이용하여 농축하였다. 추출용매를 제거한 전체 지방은 유기용매(클로로포름/메탄올=2/1, v/v)에 녹여, 박층 크로마토그래피(TLC: silica gel 60F<sub>254</sub>, 0.5mm, Merck)에 점적한 후 전개용매 (n-헥산/디에틸 에테르/아세트산 =80/20/1, v/v/v)상에서 전개하였다. 박층 크로마토그래피(TLC) 상에서 중성지방(R<sub>f</sub>값 : 0.4)을 분리한 후, 방사선원소 에너지를 감광할 수 있는 필름(imaging plate 필 Fujifilm, BAS-MS 2040)에 3시간 감광하고, 이미지 분석(FLA 7000)을 수행하여 중성지방의 방사선량을 측정하였다.

[0092] 추출 후 남아있는 세포를 0.1N NaOH 0.3 ml에 녹여 반응에 이용된 세포의 단백질 농도를 측정하였다. 단백질 정량은 로우리법(Lowry method)을 기초로 하는 바이오-라드사(Bio-Rad)의 단백질 정량 키트를 사용하였다. 96-웰 둥근 바닥 배양접시에 단백질을 분주한 후 1 ml의 단백질 분석 시약(bio-rad, alkaline copper tartrate solution)에 20 µl의 단백질 시약 S(bio-rad, surfactant solution)를 첨가한 혼합용액을 25 µl씩 웰에 분주하여 구리 이온과 단백질 사이의 반응을 유도하였다. 반응이 끝난 후, 시약 B(bio-rad, folin reagent)를 각 웰에 200 µl씩 분주하여 폴린 시약(folin reagent)을 이용한 환원 반응을 진행시켰다. 단백질 양은 폴린 시약이 환원되면서 청색으로 발색되는 정도의 흡광도를 750 nm에서 측정하였고, BSA를 표준물질로 사용하여 표준곡선을 구하여 각 흡광도에 해당하는 단백질 농도를 정량하였다. 측정된 중성지방의 방사선량을 단백질 농도로 나눈 값을 실험값으로 사용하였다. 그 결과, 도 2 및 [표 3]에 나타낸 바와 같이, 인간 십이지장 선암(duodenal adenocarcinoma) 세포인 HuTu 80에 개산초 메탄올 추출물을 각각 3, 10, 30 µg/ml의 농도로 처리하고 [<sup>14</sup>C]올레이트를 기질로 사용하여 세포내에서의 중성지방 생합성 억제효과를 측정된 결과, 30 µg/ml의 농도에서 약 21%의 양호한 저해활성을 나타내는 것을 확인하였다(도 2 및 표 3).

[0093] 따라서, 상기에서 알 수 있는 바와 같이, 개산초의 메탄올 추출물은 세포내의 DGAT를 저해함으로써 중성지방의 생합성을 농도-의존적으로 억제하였다.

표 3

[0094] HepG2 세포 및 HuTu 80 세포내에서 개산초 추출물의 중성지방 생합성 저해 활성

	중성지방 생성률(대조군 대비 백분율%)					T863 (1.0 uM)
	대조군 (DMSO)	1 µg/ml	3 µg/ml	10 µg/ml	30 µg/ml	
HepG2 세포	100	91.0±7.4	72.0±6.1	42.0±0.6	14.0±0.8	-

HuTu 80 세포	100	-	95.0±4.5	91.0±1.8	79.0±1.1	15.0±0.8
------------	-----	---	----------	----------	----------	----------

[0095] <실험예 3> 개산초 메탄올 추출물의 pancreatic lipase 저해활성 확인

[0096] 본 발명의 개산초 메탄올 추출물의 pancreatic lipase 억제효과를 측정하기 위하여 4-methylumbelliferyl oleate (4-MUO) 시약을 이용하여 시험하였다.

[0097] 구체적으로, DMSO에 녹인 시료 2.5 μl를 96 well plat에 분주한 후, 여기에 22.5 μl의 증류수를 첨가하여 잘 혼합하여 주었다. 이 용액에 다시 Dulbecco's phosphate buffered에 녹인 4-MUO 50 μl (0.5 mM)를 첨가한 후, pancreatic lipase (0.5 μg/ml) 25 μl를 첨가하여 잘 혼합한 다음 10분 동안 37 °C에서 반응시켰다. 각각의 반응용액에 sodium citrate(pH 4.2) 100 ml을 분주하여 반응을 정지시킨 다음, lipase에 의해 유리된 4-methylumbelliferone를 fluorescence microplate reader(FlexStation 3, Molecular devices, USA)를 이용하여 여기파장(excitation wavelength) 350 nm, 방출파장(emission wavelength) 460 nm에서 형광정도를 측정하였다.

[0098] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이 시료를 10, 100, 300 μg/ml의 농도로 처리하였을 때 pancreatic lipase에 대한 농도 의존적인 저해활성을 나타냄으로써 식이를 통해 장으로 들어온 중성지방의 가수분해를 억제하여 혈중 중성지방 농도의 상승을 억제할 가능성을 보였다(도 3).

[0099] <실험예 4> 개산초 메탄올 추출물의 마우스를 이용한 단회 경구투여 독성시험

[0100] 본 발명의 개산초 메탄올 추출물의 급성독성 정보를 얻기 위한 목적으로 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0101] 구체적으로, SPF(Specific Pathogens Free; 특정 병원체 부재) 상태의 6주령 암컷 ICR 마우스에 시험물질을 0.5 및 1 g/kg 으로 단회경구투여하여 14일간의 사망률, 일반증상, 체중, 부검조건을 관찰하였다.

[0102] 그 결과, 시험한 결과는 하기와 같았다.

[0103] (1) 시험기간중 사망동물은 관찰되지 않았다.

[0104] (2) 일반증상의 경우, 모든 용량투여군에서 시험물질의 투여에 기인한 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았다.

[0105] (3) 체중변화의 경우, 최고용량군(1 g/kg)에서 투여 첫째날 유의한 체중 감소가 관찰되었으나 다음날부터 서서히 회복되었으며, 저용량군(0.5 g/kg)에서는 시험기간동안 유의한 체중감소는 없었다.

[0106] (4) 부검조건인 경우, 시험물질의 투여에 기인한 어떠한 이상조건도 관찰되지 않았다.

[0107] 따라서, 시험물질인 개산초 메탄올 추출물의 마우스에 대한 단회 경구투여는 0.5 및 1 g/kg 용량에서 사망률, 일반증상, 체중 및 부검조건에 있어서 독성학적인 변화를 야기시키지 않았다.

[0108] <실험예 5> 개산초 메탄올 추출물의 동물 지질 경구부하시험(oral lipid tolerance test(OLTI))

[0109] 동물실험을 하기와 같이 실행하였다.

[0110] 구체적으로, 8주령의 수컷 C57BL/6J마우스를 대한 바이오 링크로부터 구입하여 청정 동물사육실(온도 22 ± 3?, 습도 50 ± 10 %, 조명 12시간 주기)에서 1주일 동안 순화시킨 후 실험하기 하루 전에 16시간 동안 절식하여 실험에 이용하였다. 실험에 사용한 사료는 방사선으로 멸균된 마우스용 고형사료(Harlan, IN, USA)를 본 발명의 개산초 메탄올 추출물 투여 전에 16시간 동안의 절식 기간을 제외하고, 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였으며, 음용수는 고압멸균기로 멸균시킨 후, 실험기간 전반에 걸쳐 항상 자유롭게 충분히 마실 수 있도록 하였다.

[0111] C57BL/6J마우스를 용매대조군 또는 실험군으로 구분하여 각 5마리씩 배정하였고, 본 발명의 개산초 메탄올 추출물을 하기와 같이 투여하였다. 정상대조군에는 투여매체(0.5% CMC; carboxy methyl cellulose)만을 투여하고, 실험군에는 개산초 메탄올 추출물을 300 mg/kg 농도로 경구 투여하였다. 모든 실험군 동물에 대하여 본 발명의 개산초 메탄올 추출물을 투여하기 전 16시간 동안 절식시킨 뒤 경구 투여용 존대를 사용하여 각각의 해당 추출물을 경구로 1회 투여하였고, 60분 후 콘 오일을 6 ml/kg 액량으로 경구 투여하였다. 콘 오일을 투여하기 직전에 채혈(0시간)하였으며, 콘 오일 투여 후시간별(2 시간 및 4 시간)로 후완와정맥동(retro-orbital sinus)으로부터 헤파린(heparin)이 처리된 모세관(capillary tube)을 이용하여 직접 혈액을 채취하였다. 이 후, 채취된 혈

액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈장을 분리한 후, 중성지방의 농도를 자동혈액화학분석기(Hitachi 7150, Japan)로 직접 분석하였다. 상기 결과를 하기 [표 4]에 나타냈다.

[0112] 그 결과, [표 4] 및 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 실시예 <1-1>에서 제조된 개산초 메탄올 추출물은 마우스에 100, 300, 500mg/kg의 용량을 투여되었을 경우, 혈중 중성지방의 농도를 저하시키는 효과가 우수한 것을 확인하였다. 더욱 구체적으로, 용매대조군으로서 카르복실 메틸 셀룰로오즈(CMC: carboxy methyl cellulose)가 투여된 마우스는 고지방식이인 콘 오일을 투여하고 2시간이 경과한 경우, 투여 전과 대비하여 약 5.3배, 4시간이 경과한 경우에는 투여 전과 대비하여 약 2.1배로 중성지방의 농도가 증가한 것으로 확인되었다. 반면, 본 발명에 따른 개산초 메탄올 추출물을 300 mg/kg 투여한 마우스는 콘 오일을 투여하고 2시간이 경과한 경우, 투여 전과 대비하여 약 1.0배, 4시간이 경과한 경우에는 약 0.97배로 용매대조군 대비 중성지방의 농도가 현저하게 감소함이 확인되었다. 상기 결과로부터 본 발명에 따른 개산초 추출물은 위장관에서 pancreatic lipase를 억제하여 식이를 통해 섭취된 중성지방의 가수분해를 저해하고 장피세포에서의 DGAT 효소활성의 저해를 통해 중성지방의 재합성을 억제하여 위장관에서의 지방의 흡수를 억제함으로써 마우스의 혈중 중성지방의 농도를 억제하는 것을 확인하였다(표 4).

**표 4**

개산초 메탄올 추출물의 동물 지질 경구부하시험

(n=5)	투여량 (mg/kg)	혈청 TG (mg/dl)		
		0시간	2시간	4시간
용매대조군 (0.5% CMC)	0	40.7±6.0	213.4±105.2	83.3±22.4
메탄올 추출물	100 mg/kg	39.3 ± 6.4	158.4 ± 118.7	64.6 ± 22.1
	300 mg/kg	34.6±9.3	35.1±18.4***	33.6±15.4***
	500 mg/kg	41.9 ± 8.0	57.9±17.8**	44.9±21.9**
T863 <sup>1)</sup>	10 uM	32.6±8.1	30.1±7.7**	22.0±6.9***

[0114] 유효숫자(t-테스트): \* p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (용매 대조군 대비)

[0115] 1) T863:DGAT1 선택적 저해제 (Cao et al., J. Biol. Chem. 48, 41838-41851, 2011)

[0116] <제조예 1> 약학적 제제의 제조

[0117] <1-1> 산제의 제조

[0118] 실시예 <1-1>의 개산초 메탄올 추출물 0.1 g

[0119] 유당 1.5 g

[0120] 탈크 0.5 g

[0121] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0122] <1-2> 정제의 제조

[0123] 실시예 <1-1>의 개산초 메탄올 추출물 0.1 g

[0124] 락토오스 7.9 g

[0125] 결정성 셀룰로오스 1.5 g

[0126] 마그네슘 스테아레이트 0.5 g

- [0127] 상기의 성분들을 혼합한 후 직타법(direct tableting method)으로 정제를 제조하였다.
- [0128] <1-3> 캡슐제의 제조
- [0129] 실시예 <1-1>의 개산초 메탄올 추출물 0.1 g
- [0130] 옥수수전분 5.0 g
- [0131] 카르복시 셀룰로오스 4.9 g
- [0132] 상기의 성분들을 혼합하여 분말을 제조한 후, 상기 분말을 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라 경질 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0133] <1-4> 주사제의 제조
- [0134] 실시예 <1-1>의 개산초 메탄올 추출물 0.1 g
- [0135] 주사용 멸균 증류수 적량
- [0136] pH 조절제 적량
- [0137] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플 당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조하였다.
- [0138] <1-5> 액제의 제조
- [0139] 실시예 <1-1>의 개산초 메탄올 추출물 0.1 g
- [0140] 이성화당 10.0 g
- [0141] 만니톨 5.0 g
- [0142] 정제수 적량
- [0143] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고, 적량의 레몬향을 첨가한 후 상기의 성분을 혼합하였다. 상기 혼합물에 정제수를 첨가하여 전체를 100으로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조하였다.
- [0144] <제조예 2> 건강식품의 제조
- [0145] <2-1> 밀가루 식품의 제조
- [0146] 상기 실시예 <1-2>의 개산초 에탄올 추출물의 0.5 내지 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 상기 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.
- [0147] <2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조
- [0148] 상기 실시예 <1-2>의 개산초 에탄올 추출물의 0.1 내지 5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육 가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.
- [0149] <2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조
- [0150] 상기 실시예 <1-2>의 개산초 에탄올 추출물의 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.



[0151] <2-4> 유제품(dairy products)의 제조

[0152] 상기 실시예 <1-2>의 개산초 에탄올 추출물 5 내지 10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0153] <2-5> 선식의 제조

[0154] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다. 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다. 상기 실시예 <1-2>의 개산초 에탄올 추출물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다. 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 상기 실시예 <1-3>의 개산초 에탄올 추출물을 하기의 비율로 배합하여 제조하였다:

- [0155] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),
- [0156] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),
- [0157] 상기 실시예 <1-2>의 개산초 에탄올 추출물(3 중량부),
- [0158] 영지(0.5 중량부), 및
- [0159] 지황(0.5 중량부).

[0160] <2-6> 건강보조식품의 제조

[0161]	실시예 <1-3>의 개산초 물 추출물	100 mg
[0162]	비타민 혼합물	적량
[0163]	비타민 A 아세테이트	70 $\mu$ g
[0164]	비타민 E	1.0 mg
[0165]	비타민 B1	0.13 mg
[0166]	비타민 B2	0.15 mg
[0167]	비타민 B6	0.5 mg
[0168]	비타민 B12	0.2 $\mu$ g
[0169]	비타민 C	10 mg
[0170]	비오틴	10 $\mu$ g
[0171]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0172]	엽산	50 $\mu$ g
[0173]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0174]	무기질 혼합물	적량
[0175]	황산제1철	1.75 mg
[0176]	산화아연	0.82 mg
[0177]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0178]	제1인산칼륨	15 mg
[0179]	제2인산칼슘	55 mg
[0180]	구연산칼륨	90 mg

[0181]	탄산칼슘	100 mg
[0182]	염화마그네슘	24.8 mg

[0183] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 후, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0184] <제조예 3> 건강음료의 제조

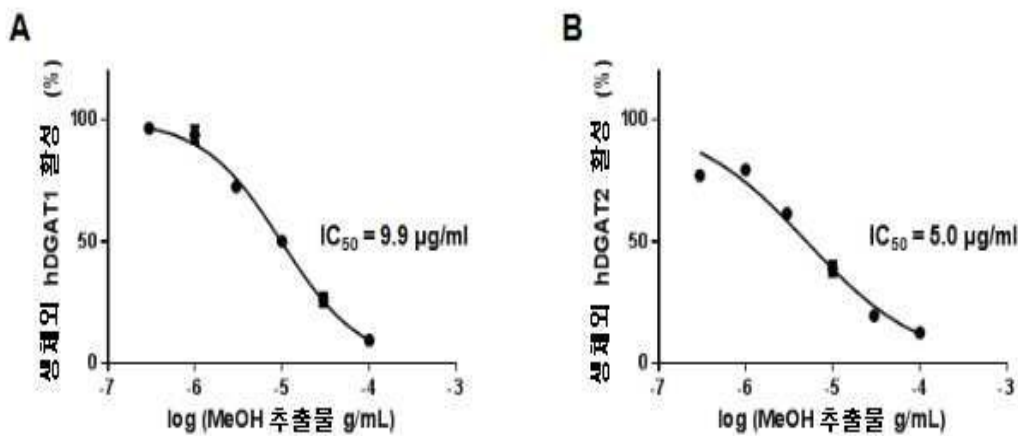
[0185]	실시예 <1-3>의 개산초 물 추출물	100 mg
[0186]	구연산	100 mg
[0187]	올리고당	100 mg
[0188]	매실농축액	2 mg
[0189]	타우린	100 mg
[0190]	정제수를 가하여 전체	500 ml

[0191] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 후, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 1 l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 후, 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

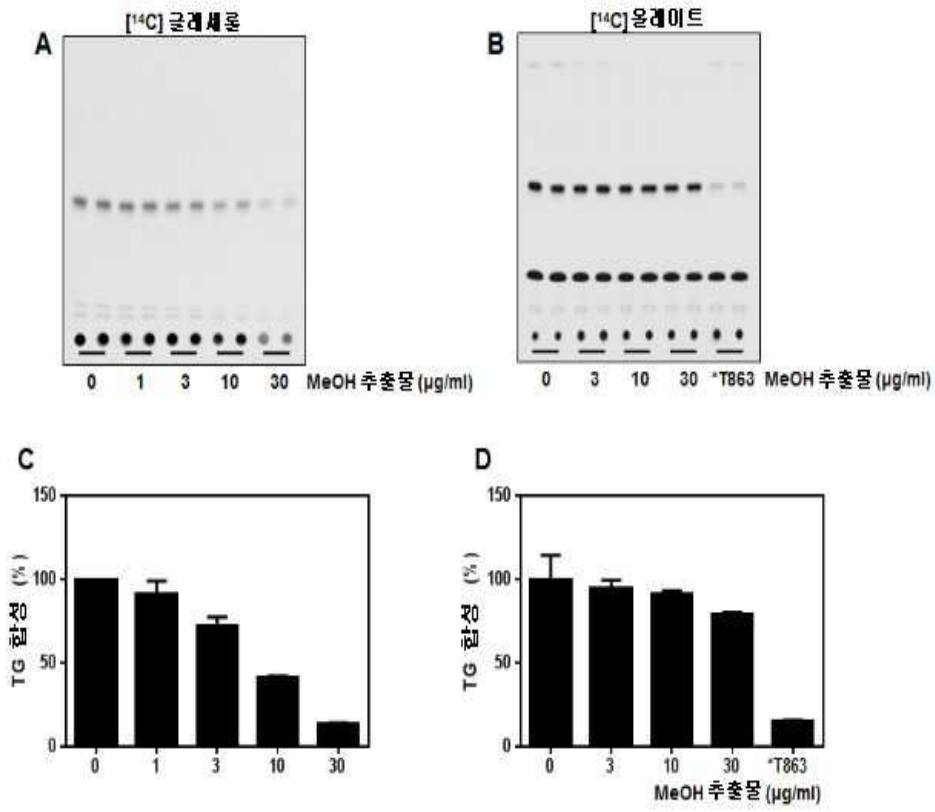
[0192] 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

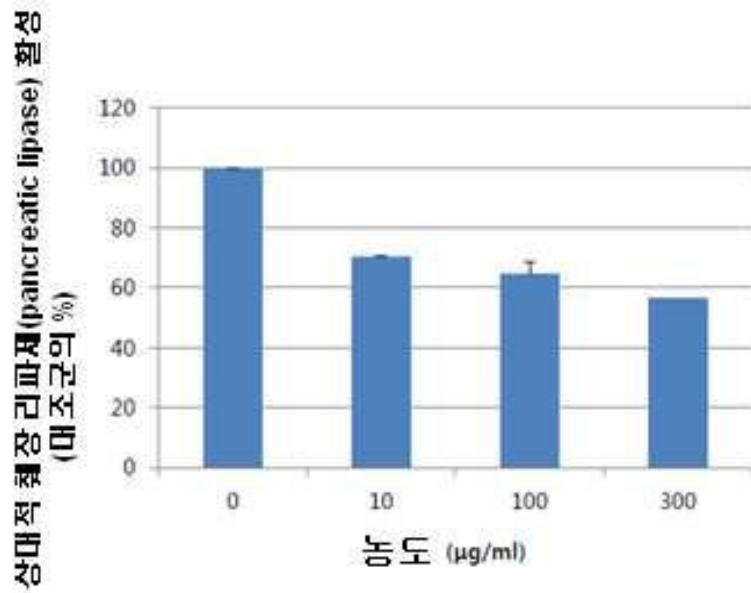
도면1



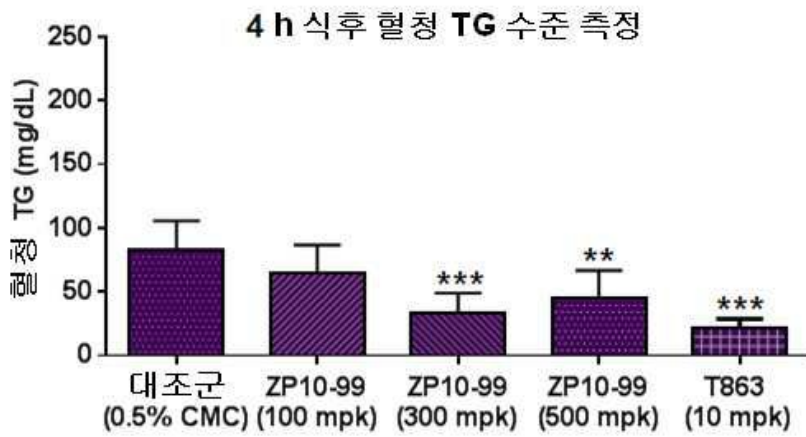
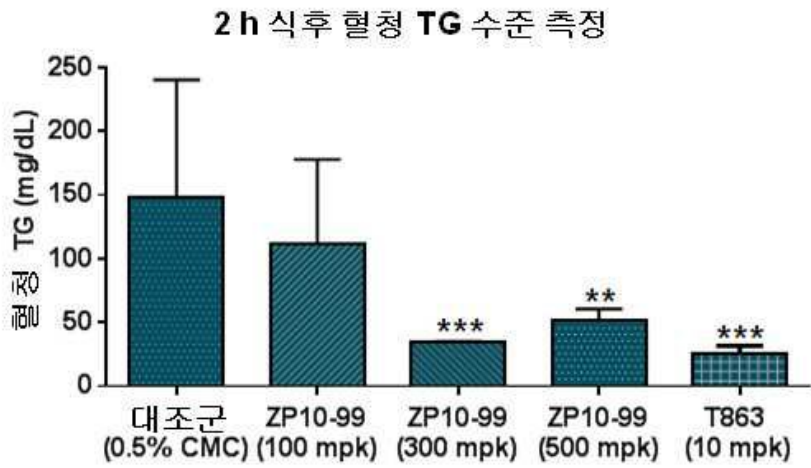
도면2



도면3



도면4



C57BL/6, n=7, 콘 오일 6 ml/kg, p.o.

\*P<0.05, \*\*P<0.01 및 \*\*\*P<0.001 vs 대조군 (0.5% CMC)