

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2021-0120736
(43) 공개일자 2021년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/7048 (2006.01) *A23K 20/163* (2016.01)*A23L 33/125* (2016.01) *A61P 3/00* (2006.01)*C12N 5/077* (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/7048 (2013.01)*A23K 20/163* (2016.05)

(21) 출원번호 10-2020-0037837

(22) 출원일자 2020년03월27일

심사청구일자 2020년03월27일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김상훈

서울특별시 동작구 사당로23바길 9 104동 303호 (사당동, 동작삼성래미안아파트)

배인선

서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교 space21 이과대동 B204(회기동)

(74) 대리인

특허법인한일

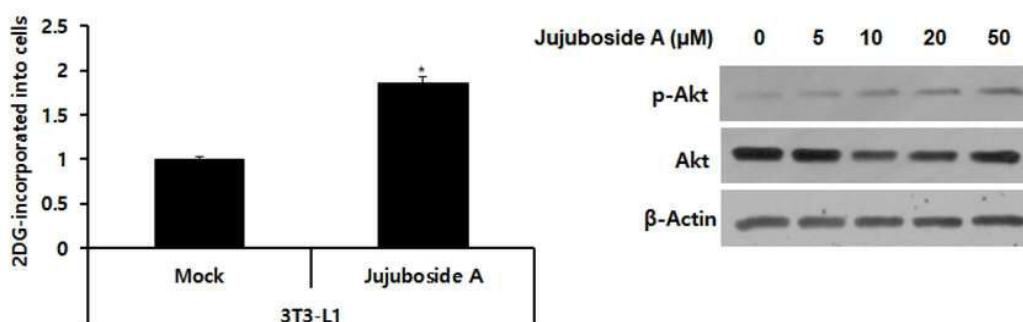
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 주주보사이드 A를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 주주보사이드 A를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 주주보사이드 A(jujuboside A)는 갈색화 과정을 통하여 백색지방 세포를 베이지 지방세포로 효과적으로 분화시키므로, 대사성 질환과 같은 대사성 질환의 예방, 개선 또는 치료를 목적으로 하는 다양한 산업에 적용할 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A23L 33/125 (2020.05)

A61P 3/00 (2018.01)

C12N 5/0653 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/328 (2013.01)

A23V 2200/332 (2013.01)

C12N 2501/33 (2013.01)

C12N 2501/999 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ0134712020

과제번호 PJ0134712020

부처명 경희대학교

과제관리(전문)기관명 농촌진흥청

연구사업명 공동연구사업 농축산물수확후 융복합실용화기술 개발

연구과제명 비만개선 소재의 지방세포 분화 조절 및 에너지 대사 촉진 연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 국립농업과학원

연구기간 2018.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

주주보사이드 A(jujuboside A)를 유효성분으로 포함하는, 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨병 및 인슐린 저항증(insulin resistance)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 주주보사이드 A는 백색지방세포를 베이지 지방세포로 분화시킴으로써 대사성 질환을 예방 또는 치료하는 것인, 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항의 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대사성 질환의 예방 또는 치료방법.

청구항 5

주주보사이드 A를 유효성분으로 포함하는, 대사성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 6

주주보사이드 A를 유효성분으로 포함하는, 대사성 질환의 예방 또는 개선용 사료 첨가제.

청구항 7

주주보사이드 A를 유효성분으로 포함하는, 백색지방세포의 베이지 지방세포로의 분화 유도용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 조성물은 인슐린(insulin), 텍사메타손(dexamethasone), 아이소부틸메틸詹틴(isobutylmethylxanthine)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 추가로 포함하는 것인, 백색 지방세포의 베이지 지방세포로의 분화 유도용 조성물.

청구항 9

제7항의 조성물을 백색지방세포에 처리하는 단계를 포함하는, 베이지 지방세포로의 분화 유도 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 주주보사이드 A를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 대사성 질환이란 생체 내 물질대사 장애에 의해서 발생하는 질환인 비만, 당뇨병, 인슐린 저항증(insulin resistance), 지질 대사 이상, 고중성지방혈증(hypertriglyceridemia), 유리지방산의 증가, 고밀도 콜레스테롤의 감소 또는 고혈압 등 및 이로부터 유발되는 다양한 합병증을 총칭하며, 발병 원인은 잘 알려져 있지 않으나, 일반적으로 인슐린 저항성(insulin resistance)이 근본적인 문제라고 추정된다. 인슐린 저항성이란 혈당을 낮추는 호르몬인 인슐린에 대한 몸의 반응이 감소하여 근육 및 지방세포가 포도당을 잘 섭취하지 못하게 되고, 이를 극복하고자 더욱 많은 인슐린이 분비되어 여러 가지 문제를 일으키는 것을 의미한다.

[0004] 복강 내의 내장지방은 대사적으로 매우 활발하여, 여러 가지 물질들을 분비하는데, 이러한 물질들은 혈압을 올리고, 혈당조절 호르몬인 인슐린의 역할을 방해하여 고인슐린혈증, 인슐린저항성 및 혈당 상승을 초래함으로써 당뇨병의 위험을 높이고, 혈관 내 염증이나 응고를 유도하여 동맥경화를 촉발하며, 심혈관 질환의 위험을 높이고, 이렇게 유발된 고혈압, 당뇨병 및 고인슐린혈증 또한 심혈관질환의 위험을 높이는 것으로 알려져 있다.

[0005] 포유동물에서 지방조직은 기능적으로 다른 두 가지 유형의 지방 즉, 백색지방과 갈색지방으로 구성되어 있으며, 이에 따른 지방세포도 백색지방세포와 갈색지방세포의 형태로 존재하는 것으로 알려져 있다. 지방을 에너지원으로 저장하는 백색지방세포와는 달리 갈색지방세포는 저장된 지방을 분해하여 열에너지를 방출시켜, 비만 및 대사 질환에 유익한 것으로 알려져 있다.

[0006] 최근, 운동, 추위, 매운 음식 섭취 등으로 교감신경이 활성화되면 백색지방세포에서 미토콘드리아 발열(mitochondrial thermogenesis)에 관여하는 UCP1(uncoupling protein 1)이 발현되면서 베이지 지방세포(beige adipocyte)로 전환된다는 사실이 알려졌다. 베이지 지방세포에는 다량의 미토콘드리아가 존재하고, 다수의 작은 지방구를 가지며, 지방을 산화하여 열을 발생시킨다. 베이지 지방세포는 갈색지방세포와 유사하게 비만 및 대사 질환에 유익한 것으로 알려져 있으며, 인간에게서 발견되는 유익한 갈색지방세포는 대부분 베이지 지방세포로 알려져 있다.

[0007] 한편, 주주보사이드 A(jujuboside A)는 사포닌의 일종으로 숙면을 돕고 신경 안정에 도움을 준다고 알려져 있다.

[0008] 그러나, 주주보사이드 A가 대사성 질환에 어떠한 영향을 미치는지는 아직까지 알려진 바 없다.

[0009] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 대사성 질환 개선 효과가 우수하면서 안전성이 높아 부작용이 적은 천연물 유래 신규 물질을 연구하던 중, 주주보사이드 A가 대사성 질환 개선 효과가 있는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 하나의 목적은 주주보사이드 A(jujuboside A)를 유효성분으로 포함하는, 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대사성 질환의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 하나의 목적은 주주보사이드 A를 유효성분으로 포함하는, 대사성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 하나의 목적은 주주보사이드 A를 유효성분으로 포함하는, 대사성 질환의 예방 또는 개선용 사료 첨가제를 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 주주보사이드 A를 유효성분으로 포함하는, 백색지방세포의 베이지 지방세포로의 분화 유도용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0017] 이하에서는, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0018] 한편, 본 발명에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.
- [0019] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0021] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 주주보사이드 A(jujuboside A)를 유효성분으로 포함하는, 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0022] 본 발명에서 용어, "대사성 질환"은 생체 내 물질대사 장애에 의해서 발생하는 질환을 총칭한다. 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨병, 인슐린 저항증(insulin resistance), 지질 대사 이상, 고중성지방혈증(hypertriglyceridemia), 유리지방산의 증가, 고밀도 콜레스테롤의 감소 또는 고혈압 등 및 이로부터 유발되는 다양한 합병증을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 있어서, 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨병 및 인슐린 저항증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 본 발명에서 용어, "주주보사이드 A(jujuboside A)"는 대추(*Ziziphus jujube*)의 씨앗에서 분리된 일종의 사포닌으로 불안, 항산화 및 항염증 등의 여러 생물학적 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 본 발명에 있어서, 상기 주주보사이드 A는 대추(*Ziziphus jujube*)의 씨앗으로부터 유래하는 것일 수 있으나, 상기 대추 외 다른 식물로부터 분리 또는 화학적으로 합성된 주주보사이드 A를 배제하는 것이 아니며, 산업적으로 사용가능한 주주보사이드 A라면 제한 없이 포함할 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 주주보사이드 A 뿐만 아니라 주주보사이드 A의 약학적으로 허용 가능한 염을 추가로 포함할 수 있다. 상기 염의 종류는 특별히 제한되지는 않는다. 다만, 개체, 예컨대 포유류에게 안전하고 효과적인 형태인 것이 바람직하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 상기 용어, "약학적으로 허용 가능한"은 의약학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 또는 알레르기 반응 등을 유발하지 않고 원하는 용도에 효과적으로 사용 가능한 물질을 의미한다.
- [0027] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용 가능한 염"이란 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다. 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레인산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 주주보사이드 A를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 이때, 상기 조성물에 포함되는 주주보사이드 A의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 중량% 내지 10 중량%로, 바람직하게는 0.001 중량% 내지 1 중량%를 포함할 수 있고, 또는, 조성물 내에 5 μ M 내지 100 mg, 20 μ M 내지 100 mg, 구체적으로는 50 μ M 내지 100 mg, 보다 구체적으로는 50 μ M 내지 60 mg으로 포함할 수 있다.
- [0030] 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결

합제, 습윤제, 분해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.

[0033] 본 발명에서 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 질병의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 약학적 조성물은 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 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 다양한 포유동물에 다양한 경로로 투여할 수 있으며, 투여의 방식은 당업계의 통상적인 방법이라면 제한없이 포함하며, 예를 들어, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 인간에 적용되는 의약품뿐만 아니라, 동물 의약품의 형태로도 사용될 수 있다.

[0036] 본 발명의 일 실시예에서는, 주주보사이드 A가 세포독성 없이 베이지 지방세포 관련 유전자들의 발현을 증가시켜 지방세포의 갈색화를 유도하며(도 1 내지 2), 지방세포에서 미토콘드리아 신생을 촉진시키며 기초호흡량, 최대호흡량, ATP 생산 등 미토콘드리아의 기능을 향상시키는 것을 확인하였다(도 3 내지 4). 뿐만 아니라, 주주보사이드 A가 지방세포에서의 포도당 유입 활성을 증가시키고, Akt 경로를 활성화시키는 것을 확인하였다(도 5).

[0037] 상기 "베이지 지방세포(beige adipocyte)"는 백색지방세포에서 운동이나 추위 등의 자극에 의해 유도되며, 백색 지방세포의 형질은 감소되거나 갈색지방세포의 형질인 미토콘드리아 발열(mitochondrial thermogenesis)에 관여하는 UCP1이 발현되면서 전환된 지방세포이다. 상기 백색지방세포의 베이지 지방세포로의 분화는 '백색지방세포의 갈색화'로도 명명될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 베이지 지방세포는 갈색 지방세포와 유사하게 비만 및 대사 질환에 유익한 것으로 알려져 있으며, 인간에게서 발견되는 유익한 갈색지방세포는 대부분 베이지 지방세포로 알려져 있다.

[0038] 즉, 상기 주주보사이드 A는 백색지방세포를 베이지 지방세포로 분화(백색지방세포의 갈색화)시킴으로써 대사성 질환을 예방 또는 치료하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0039] 상기 분화 유도된 베이지 지방세포는 지방세포의 갈색화에 따른 표현형을 가질 수 있다. 상기 갈색화에 따른 표현형은 예를 들면, 인슐린 민감성 향상, 산소 소비 증가, 세포 내 미토콘드리아 함량 및 활성 증가, UCP1 등의 베이지 지방세포 마커 유전자의 발현량 증가 및 단백질의 발현량 증가 및 이들의 조합을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0040] 이와 같이, 주주보사이드 A는 지방세포의 갈색화를 유도함으로써 비만에 대한 치료 효과가 있다. 뿐만 아니라, 주주보사이드 A는 인슐린 저항성을 개선함으로써 당뇨병 및 인슐린 저항증에 대한 치료 효과가 있는 바, 비만,

당뇨병 및 인슐린 저항증을 포함하는 대사성 질환의 치료에 적용할 수 있다.

- [0041] 본 발명은 주주보사이드 A가 백색지방세포를 베이지 지방세포로 분화시키고 인슐린 저항성을 개선함으로써 대사성 질환 치료 효과가 있음을 최초로 밝힌 것에 의의가 있다.
- [0043] 본 발명에서 용어, "예방"은 상기 조성물의 투여에 의해 대사성 질환을 억제하거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 조성물의 투여에 의해 대사성 질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0045] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대사성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [0046] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.
- [0047] 본 발명에서 용어, "개체"는 대사성 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 제외한 모든 동물을 의미하며, 본 발명의 약학적 조성물을 대사성 질환의 의심 개체에 투여함으로써, 개체를 효율적으로 치료할 수 있다.
- [0048] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 대사성 질환의 의심 개체에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0050] 본 발명의 약학적 조성물은 대사성 질환을 예방 또는 치료 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 개체에도 적용가능하다. 예를 들면, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간동물, 조류 및 어류 등 어느 것이나 사용할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 비 경구, 피하, 복강 내, 폐 내 및 비강 내로 투여될 수 있고, 국부적 치료를 위해, 필요하다면 병변 내 투여를 포함하는 적합한 방법에 의하여 투여될 수 있다. 본 발명의 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 본 발명의 다른 하나의 양태는 주주보사이드 A를 유효성분으로 포함하는, 대사성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0053] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.
- [0054] 본 발명에서 용어, "개선"은 상기 조성물을 이용하여 대사성 질환의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.
- [0055] 본 발명의 식품 조성물은 주주보사이드 A 뿐만 아니라 주주보사이드 A의 식품학적으로 허용 가능한 염을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물에 포함될 수 있는 식품학적으로 허용 가능한 염은 식품학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성되는 산부가염 또는 염기에 의해 형성되는 금속염이 유용하다. 하나의 예로, 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있다. 무기산으로는 염산, 황산, 브롬산, 아황산 또는 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레인산, 푸마산, 글루콘산, 메탄술폰산 등을 사용할 수 있다. 또한, 금속염으로는 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속염, 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 사용할 수 있다. 그러나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 상기 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다.
- [0057] 본 발명의 식품 조성물에 포함할 수 있는 성분으로는, 필수 성분으로 유효성분을 함유하는 외에 다른 성분에는 특별히 제한이 없으며 통상의 식품과 같이 여러 생약 추출물, 식품 보조 첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 식품 조성물에서 유효성분의 함량은 사용 목적(예방, 개선 또는 치료적 처

치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 이때, 상기 조성물에 포함되는 유효성분의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 중량% 내지 10 중량%로, 바람직하게는 0.001 중량% 내지 1 중량%를 포함할 수 있다.

[0058] 또한, 상기 식품 보조 첨가제는 당업계에서 통상적인 식품 보조 첨가제, 예를 들어 향미제, 풍미제, 착색제, 증진제, 안정화제 등을 포함할 수 있다.

[0059] 상기 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 것 이외에 향미제로서 천연 향미제(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0060] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 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, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0061] 본 발명에서 상기 건강보조식품은 건강기능식품 및 건강식품 등을 포함할 수 있다.

[0062] 상기 건강 기능(성) 식품(functional food)이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다.

[0063] 본 발명의 식품 조성물을 포함하는 식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나다.

[0065] 본 발명의 다른 하나의 양태는 주주보사이드 A를 유효성분으로 포함하는, 대사성 질환의 예방 또는 개선용 사료 첨가제를 제공하는 것이다.

[0066] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.

[0067] 본 발명에서 용어, "사료 첨가제"는 영양적 또는 특정 목적을 위하여 사료에 미량으로 첨가되는 물질을 총칭하는 것으로, 본 발명에서는 대사성 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 첨가되는 물질을 의미한다. 여기서, 동물이란 가축 및 애완동물을 포함하는 개념이다.

[0068] 본 발명의 사료 첨가제에 포함할 수 있는 성분으로는, 필수 성분으로 유효성분을 함유하는 외에 다른 성분에는 특별히 제한이 없다. 본 발명의 사료 첨가제에는 품질 저하를 방지하기 위해 첨가되는 결착제, 유화제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있고, 효용 증대를 위하여 첨가되는 아미노산제, 비타민제, 효소제, 생균제, 향미제, 비단백태 질소화합물, 규산염제, 완충제, 착색제, 추출제, 올리고당 등을 추가로 포함할 수 있으며, 그 외에도 사료 혼합제 등을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0070] 본 발명의 다른 하나의 양태는 주주보사이드 A를 유효성분으로 포함하는, 백색지방세포의 베이지 지방세포로의 분화 유도용 조성물을 제공하는 것이다.

[0071] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.

[0072] 본 발명의 백색지방세포의 베이지 지방세포로의 분화유도용 조성물은 백색지방세포의 베이지 지방세포로의 분화를 위한 유도물질로서 당업계에 알려진 물질을 추가로 포함할 수 있고, 이에 특별히 제한은 없으나, 구체적으로 인슐린(insulin), 덱사메타손(dexamethasone), 아이소부틸메틸잔테인(isobutylmethylxanthine, IBMX)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0073] 상기 분화 유도된 베이지 지방세포는 지방세포의 갈색화에 따른 표현형을 가질 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0075] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 백색지방세포의 베이지 지방세포로의 분화 유도용 조성물 조성물을 백색 지방세포에 처리하는 단계를 포함하는, 베이지 지방세포로의 분화 유도 방법을 제공하는 것이다.

[0076] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.

발명의 효과

[0078] 본 발명에 따른 주주보사이드 A(jujuboside A)는 갈색화 과정을 통하여 백색지방 세포를 베이지 지방세포로 효과적으로 분화시키므로, 대사성 질환과 같은 대사성 질환의 예방, 개선 또는 치료를 목적으로 하는 다양한 산업에 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0080] 도 1은 주주보사이드 A 처리 농도에 따른 세포생존율 분석 결과이다.

도 2는 주주보사이드 A 처리 농도에 따른 발열성 유전자(상단 좌), 발열성 단백질(상단 우) 및 베이지 지방세포 표지 유전자(하단)의 발현 분석 결과이다.

도 3은 주주보사이드 A 처리 농도에 따른 미토콘드리아 전자전달계에서의 복합체 아단위 유전자(좌) 및 단백질(우)의 발현 분석 결과이다.

도 4는 주주보사이드 A 처리 농도에 따른 산소 소비량 분석 결과이다.

도 5는 주주보사이드 A 처리에 따른 포도당 흡수율 분석 결과(좌) 및 Akt 발현 분석 결과(우)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0081] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0083] 실시예 1. 지방세포에 대한 주주보사이드 A(jujuboside A)의 세포독성 검정

[0084] 주주보사이드 A가 지방세포에서 독성을 나타내는지 확인하기 위해 세포생존율 분석을 실시하였다.

[0085] 구체적으로, 3T3-L1 세포는 10% FBS(Fetal bovine serum)와 1% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM(Eagle's minimal essential medium) 배지를 이용하여 37℃의 5% CO₂를 포함하는 가습 인큐베이터에서 배양하였다.

[0086] 배양된 3T3-L1 세포를 96웰 플레이트에 5x10⁴ 세포/웰의 밀도로 분주하고 48시간 동안 배양하였다. 배양 48시간 후, 다양한 농도의 주주보사이드 A(5, 10, 20 및 50 μM) 또는 대조군으로서 주주보사이드 A를 처리하지 않은 무처리군을 48시간 배양하였다. 배양 완료 후, EZ-cytox 세포생존율 분석키트(Daeil lab service)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 세포 생존율에 대한 효과를 측정하였다. Vmax 마이크로플레이트 분광광도계(microplate spectrophotometer) (Molecular Devices)를 이용하여 450 nm에서 광학 밀도를 측정함으로써 검출하였다. 결과 값은 대조군에서 생존한 세포와 비교하여 백분율로 나타내었다.

[0087] 그 결과, 주주보사이드 A는 농도와 관계없이 세포생존율에 차이가 없어, 세포독성이 없는 것을 확인하였다(도 1).

[0089] 실시예 2. 주주보사이드 A에 의한 지방세포의 갈색화 여부 검정

- [0090] 주주보사이드 A가 백색지방세포를 베이지 지방세포로 유도하여 갈색화를 유도하는지 알아보기 위해 베이지 지방 세포에서 높게 발현되는 유전자들의 발현을 조사하였다. 실시예 1과 동일한 방법으로 배양한 3T3-L1 세포에 인 술린 10 $\mu\text{g/ml}$, 텍시메타손 1 μM , IBMX(isobutylmethylxanthine) 0.5 mM을 처리한 후 농도별(5, 10, 20 및 50 μM)로 주주보사이드 A를 처리하여 발열성 유전자들인 UCP1(uncoupling protein 1)과 PGC(Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator)-1 α , 베이지 지방세포 표지 유전자들인 CD137(a member of the tumor necrosis factor (TNF) receptor family), Ear2(V-erbA-related protein 2), CD40(TNFRSF5, Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5) 및 Cited1(Cbp/P300 Interacting Transactivator With Glu/Asp Rich Carboxy-Terminal Domain 1)의 mRNA 발현 수준을 조사하고, UCP1의 단백질 발현 수준을 조 사하였다.
- [0091] 구체적으로, mRNA 발현량을 조사하기 위해, 전체 RNA는 TRIsure (Bioline)를 사용하여 주주보사이드 A 처리된 세포 및 주주보사이드 A 처리되지 않은 대조군으로부터 각각 추출되었다. cDNA는 MMLV-역전사효소 키트(MMLV- reverse transcriptase kit, promega)를 사용하여 합성되었다. UCP1, PGC-1 α , CD137, Ear2, CD40 또는 Cited1 의 발현은 Roto gene Q PCR 기기(Qiagen)을 이용하여 측정되었다. 유전자 발현은 β -액틴(β -actin)으로 표준화 하였다. 이때 사용된 프라이머 서열은 하기와 같다
- [0093] UCP1_F: 5'-AGG CTT CCA GTA CCA TTA GGT-3' (서열번호 1)
- [0094] UCP1_R: 5'-CTG AGT GAG GCA AAG CTG ATT T-3' (서열번호 2)
- [0095] PGC-1 α _F: 5'-TAT GGA GTG ACA TAG AGT GTG CT-3' (서열번호 3)
- [0096] PGC-1 α _R: 5'-CCA CTT CAA TCC ACC CAG AAA G-3' (서열번호 4)
- [0097] CD137_F: 5'-CGT GCA GAA CTC CTG TGA TAA C-3' (서열번호 5)
- [0098] CD137_R: 5'-GTC CAC CTA TGC TGG AGA AGG-3' (서열번호 6)
- [0099] Ear2_F: 5'-GAG GAC GAT TCG GCG TCA C-3' (서열번호 7)
- [0100] Ear2_R: 5'-GTA ATG CTT TCC ACT GGA CTT GT-3' (서열번호 8)
- [0101] CD40_F: 5'-TGT CAT CTG TGA AAA GGT GGT C-3' (서열번호 9)
- [0102] CD40_R: 5'-ACT GGA GCA GCG GTG TTA TG-3' (서열번호 10)
- [0103] Cited1_F: 5'-AAC CTT GGA GTG AAG GAT CGC-3' (서열번호 11)
- [0104] Cited1_R: 5'-GTA GGA GAG CCT ATT GGA GAT GT-3' (서열번호 12)
- [0106] 단백질 발현량을 조사하기 위해, 1 x 프로테아제 억제제(Roche)를 포함하는 차가운 용해 버퍼(50 mM Tris-HCl, pH 8, 150mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS)를 이용하여 주주보사이드 A 처리된 세포 및 주주보사이드 A 처리되지 않은 대조군을 용해하였다. 이후, 세포 용해물을 4°C에서 20분 동안 배양하고, 15 분 동안 14,000xg로 원심분리 하였다. 단백질 분리 키트(Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 상층액의 단백질 농도를 결정하였다. 샘플 버퍼(100 mM Tris-HCl, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1% 2-mercaptoethanol, 2% glycerol, 0.01% bromophenol blue, pH 7.6)에서 95°C로 5분 동안 변성된 단백질 샘플들(15 μg)을 10% 폴리아 크릴아마이드겔에 로딩하고 전기영동 하였다. 분리된 단백질은 일렉트로블로팅(electroblotting)을 통해 니트로 셀룰로오스막(GE Health care)으로 옮겼다. 5% 탈지분유가 포함된 PBST 버퍼에서 상기 막을 인큐베이션하였고, 희석된 1차 항체(1:1,000)를 처리하여 4°C에서 밤새 배양하였다. 상기 막을 상온에서 PBST로 세척한 후, HRP- tagged anti-rabbit 항체(1:20,000) 또는 anti-mouse 항체(1:10,000)와 함께 30분 동안 인큐베이션하였다. 이 를 PBST를 이용하여 3회(각각 15분 동안) 세척한 후, ECL kit(Santa cruz Inc)를 사용하여 단백질 밴드를 확인 하였다. 대조군으로 β -액틴을 사용하였다.
- [0107] 그 결과, UCP1과 PGC-1 α 유전자는 주주보사이드 A 농도 의존적으로 발현이 증가하였다. 또한, UCP1 단백질 발 현도 주주보사이드 A를 처리하였을 때 농도 의존적으로 대조군보다 증가하였다(도 2). 또한, 베이지 지방세포 표지 유전자들인 CD137, Ear2, CD40 및 Cited1 유전자들의 mRNA 발현은 주주보사이드 A를 20 μM 이상의 농도로

처리시 모두 유의하게 증가하였다(도 2).

[0108] 이러한 결과는 주주보사이드 A가 세포독성 없이 베이지 지방세포 관련 유전자들의 발현을 증가시켜 3T3-L1 세포의 갈색화를 유도한다는 것을 시사하였다.

[0110] 실시예 3. 주주보사이드 A에 의한 미토콘드리아 신생 여부 검정

[0111] 주주보사이드 A가 유도하는 미토콘드리아 신생에 의해 수반되는 산화적 인산화(oxidative phosphorylation) 반응의 변화를 관찰하였다.

[0112] 구체적으로, 실시예 1과 동일한 방법으로 배양한 3T3-L1 세포에 인슐린 10 μ g/ml, 텍시메타손 1 μ M, IBMX 0.5 mM을 처리한 후 농도별(5, 10, 20 및 50 μ M)로 주주보사이드 A를 처리하고, 미토콘드리아 전자전달계에서 각각의 복합체 아단위(subunit) 유전자들인 NDUFB8(Complex I), SDHB(Complex II), UQCRC2(Complex III), COXIV(Complex IV) 및 ATP5A(Complex V)의 mRNA 및 단백질 발현 수준을 실시예 2와 동일한 방법으로 조사하였다. 이때 사용된 프라이머 서열은 하기와 같다.

[0114] NDUFB8_F: 5'-TGT TGC CGG GGT CAT ATC CTA-3' (서열번호 13)

[0115] NDUFB8_R: 5'-AGC ATC GGG TAG TCG CCA TA-3' (서열번호 14)

[0116] SDHB_F: 5'-AAT TTG CCA TTT ACC GAT GGG A-3' (서열번호 15)

[0117] SDHB_R: 5'-AGC ATC CAA CAC CAT AGG TCC-3' (서열번호 16)

[0118] UQCRC2_F: 5'-AAA GTT GCC CCG AAG GTT AAA-3' (서열번호 17)

[0119] UQCRC2_R: 5'-GAG CAT AGT TTT CCA GAG AAG CA-3' (서열번호 18)

[0120] COXIV_F: 5'-ATT GGC AAG AGA GCC ATT TCT AC-3' (서열번호 19)

[0121] COXIV_R: 5'-CAC GCC GAT CAG CGT AAG T-3' (서열번호 20)

[0122] ATP5A_F: 5'-TCT CCA TGC CTC TAA CAC TCG-3' (서열번호 21)

[0123] ATP5A_R: 5'-CCA GGT CAA CAG ACG TGT CAG-3' (서열번호 22)

[0125] 그 결과, NDUFB8, SDHB, UQCRC2, COXIV 및 ATP5A의 mRNA와 단백질 발현은 주주보사이드 A 농도 의존적으로 증가하였다(도 3).

[0126] 이러한 결과는 주주보사이드 A가 3T3-L1 세포에서 미토콘드리아 신생을 촉진시킴을 시사하였다.

[0128] 실시예 4. 주주보사이드 A에 의한 미토콘드리아의 기능 향상 여부 검정

[0129] 주주보사이드 A가 처리된 3T3-L1 세포의 산소 소비량을 측정하여 미토콘드리아의 기능 향상 정도를 조사하였다.

[0130] 구체적으로, 실시예 1과 동일한 방법으로 배양한 3T3-L1 세포에 인슐린 10 μ g/ml, 텍시메타손 1 μ M, IBMX 0.5 mM을 처리한 후 농도별(5, 10, 20 및 50 μ M)로 주주보사이드 A를 처리하고, 1.5 μ M 올리고마이신(oligomycin), 0.75 μ M FCCP(Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine), 1 μ M 로테논(rotenone) 및 안티마이신 A(antimycin A)을 순차적으로 처리한 후 세포의 산소 소비량을 XF 분석기(Seahorse)를 사용하여 측정하였다. 올리고마이신은 미토콘드리아의 ATP 합성효소를 제어함으로써 ATP 생성에 필요한 산소 소비량을 측정하기 위해 투여하고, FCCP는 미토콘드리아 호흡의 언커플러(uncoupler)로 미토콘드리아 호흡의 최대 능력을 측정하기 위하여 투여하며, 로테논 및 안티마이신 A는 미토콘드리아 complex I과 complex III를 저해함으로써 전자 전달 수송 체계를 억제하여 기초호흡을 측정하기 위해 투여되었다.

[0131] 그 결과, 주주보사이드 A를 처리함에 따라 대조군보다 기초호흡량, 최대호흡량, ATP 생산 등 모두 항목이 증가하였다(도 4).

[0132] 이러한 결과는 주주보사이드 A가 지방세포 내 미토콘드리아의 기능을 향상시킴을 시사하였다.

[0134] **실시예 5. 주주보사이드 A에 의한 인슐린 민감성 개선 및 Akt 경로 활성화 검증**

[0135] 미토콘드리아 기능 이상은 제2형 당뇨병, 비만 및 인슐린 저항성과 관련되어 있으므로, 미토콘드리아 기능 향상을 통해 인슐린 민감성을 개선시킬 수 있는지 확인하였다.

[0136] 구체적으로, 실시예 1과 동일한 방법으로 배양한 3T3-L1 세포에 인슐린 10 μ g/ml, 텍시메타손 1 μ M, IBMX 0.5 mM을 처리한 후 주주보사이드 A 50 μ M를 처리하고, 인슐린 민감성을 나타내는 포도당 흡수율을 조사하였다. 포도당 흡수율은 세포에 1 μ M 인슐린과 1mM 2-데옥시글루코스를 처리한 후 2-데옥시글루코스 흡수 측정 키트(2-deoxyglucose uptake measurement kit, Cosmo bio)를 사용하여 측정하였다.

[0137] 그 결과, 대조군(Mock 처리군)보다 주주보사이드 A가 처리된 3T3-L1 세포에서 포도당 유입 활성이 증가하였다(도 5).

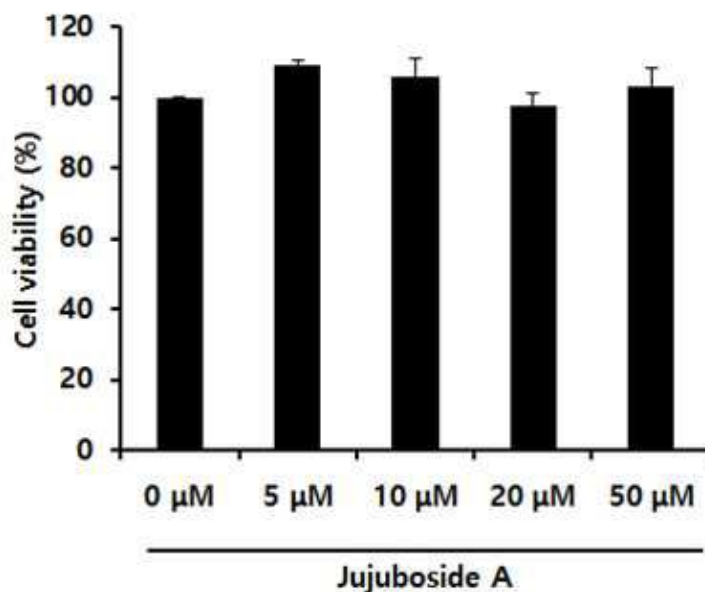
[0139] 또한, 실시예 1과 동일한 방법으로 배양한 3T3-L1 세포에 농도별(5, 10, 20 및 50 μ M)로 주주보사이드 A를 처리하고, 실시예 2와 동일한 방법으로 인슐린 신호전달 경로인 Akt 단백질 발현을 조사하였다.

[0140] 그 결과, 주주보사이드 A를 처리하였을 때 농도 의존적으로 Akt 단백질이 인산화가 되어 해당 경로가 활성화되는 것을 확인하였다(도 5).

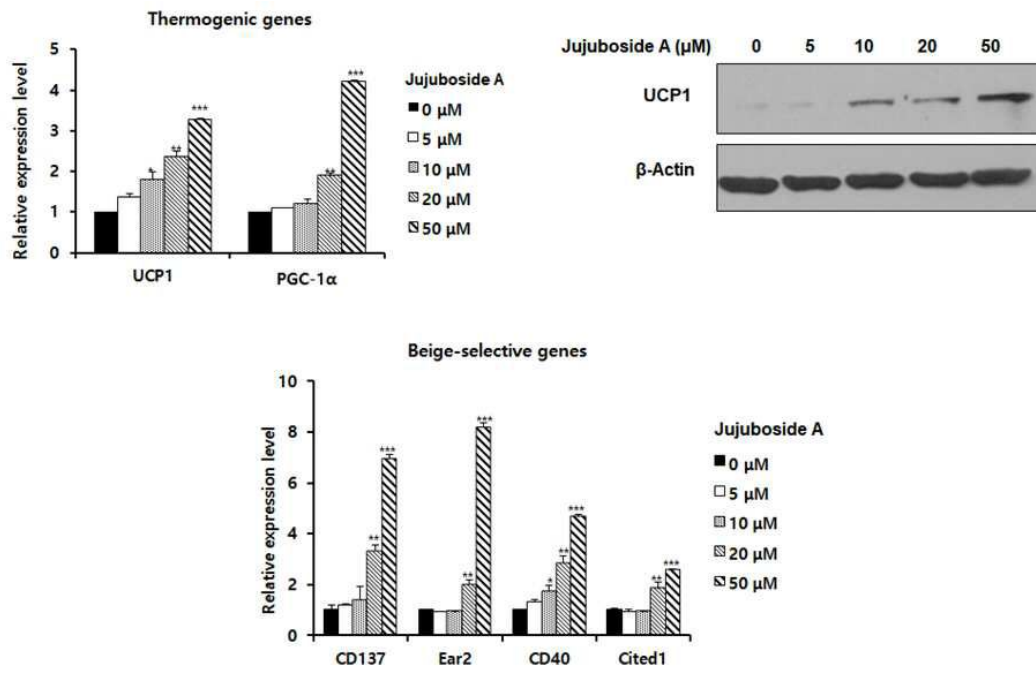
[0142] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

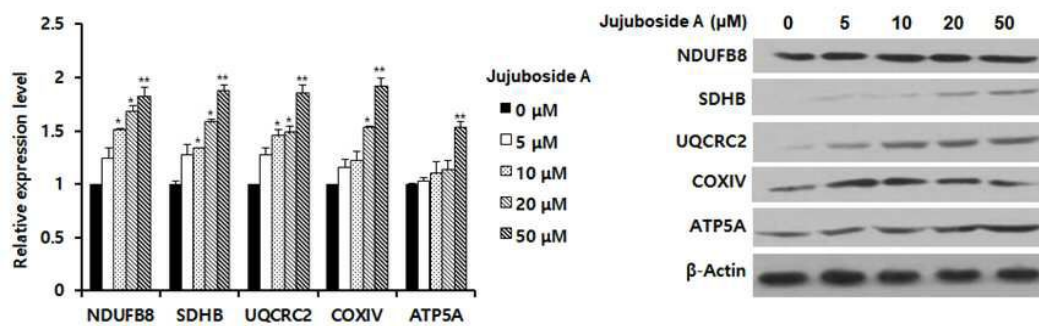
도면1



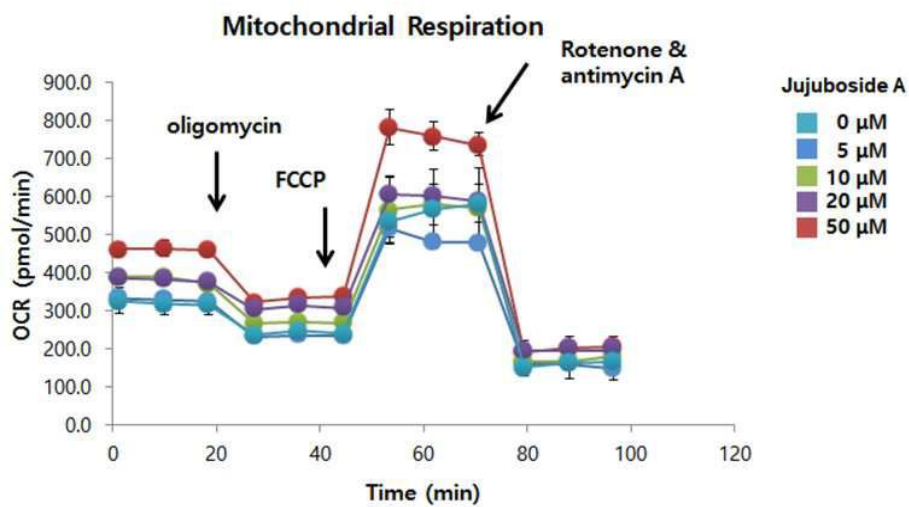
도면2



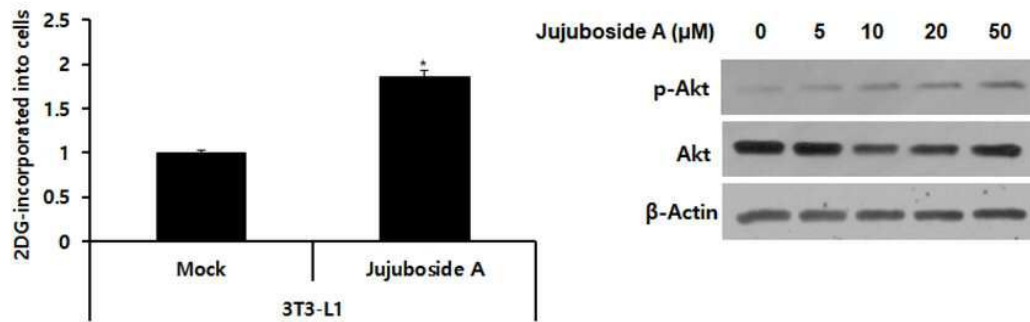
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Composition for preventing or treating metabolic diseases,
including jujuboside A or a pharmaceutically acceptable salt
thereof as an active ingredient

<130> KPA200189-KR

<160> 22

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> UCP1_F

<400> 1

aggcttcag taccattagg t

21

<210>

> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> UCP1_R

<400> 2

ctgagtgagg caaagctgat tt

22

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PGC-1a_F

<400> 3

tatggagtga catagagtgt gct 23

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PGC-1a_F

<400> 4

ccacttcaat ccacccagaa ag 22

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD137_F

<400> 5

cgtgcagaac tcctgtgata ac 22

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PGC-1a_R

<400> 6

gtccacctat gctggagaag g 21

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ear2_F

<400> 7

gaggacgatt cggcgtcac 19

<210> 8

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ear2_R
 <400> 8
 gtaatgcttt ccactggact tgt 23
 <210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD40_F
 <400> 9
 tgtcatctgt gaaaagggtgg tc 22
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD40_R
 <400> 10
 actggagcag cgggtgttatg 20

 <210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cited1_F
 <400> 11
 aaccttgag tgaaggatcg c 21
 <210> 12
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cited1_R
 <400> 12
 gtaggagagc ctattggaga tgt 23

<210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NDUF8_F
 <400> 13
 tgttgccggg gtcatacct a 21

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NDUF8_R
 <400> 14
 agcatcgggt agtcgccata 20

<210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SDHB_F
 <400> 15
 aatttgccat ttaccgatgg ga 22

<210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SDHB_R
 <400> 16
 agcatccaac accataggtc c 21

<210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> UQCRC2_F

<400> 17
aaagttgcc cgaaggttaa a 21

<210> 18
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> UQCRC2_R
<400> 18
gagcatagtt ttccagagaa gca 23

<210> 19
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> COXIV_F
<400> 19
attggcaaga gagccatttc tac 23

<210> 20
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> COXIV_R
<400> 20
cacgccgatc agcgtaagt 19

<210> 21
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ATP5A_F
<400> 21
tctccatgcc tctaactc g 21

<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> ATP5A_R

<400> 22

ccaggtcaac agacgtgtca g

21