

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2011년 10월 13일 (13.10.2011)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2011/126301 A2

- (51) 국제특허분류:
A61K 36/28 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/002413
- (22) 국제출원일: 2011년 4월 6일 (06.04.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2010-0031473 2010년 4월 6일 (06.04.2010) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여):
(주)아모레퍼시픽 (AMOREPACIFIC CORPORATION) [KR/KR]; 서울특별시 용산구 한강로 2가 181, 140-777 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 조시영 (CHO, Si Young) [KR/KR]; 서울특별시 성북구 석관동 두산아파트 117동 1802호, 136-761 Seoul (KR). 이지혜 (LEE, Ji Hae) [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 상갈동 488번지 102호, 446-905 Gyeonggi-do (KR). 배일홍 (BAE, Il Hong) [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 보라

동 314-1 아모레퍼시픽 비전하우스 108호, 446-904 Gyeonggi-do (KR). 송민정 (SONG, Min Jeong) [KR/KR]; 경기도 안양시 만안구 석수동 석수역 푸르지오 107동 1101호, 430-040 Gyeonggi-do (KR). 여현주 (YEO, Hyeon Ju) [KR/KR]; 서울특별시 중랑구 목2동 현대 I-PARK 102동 1902호, 131-768 Seoul (KR). 서대방 (SEO, Dae Bang) [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 상갈동 금화주공아파트 406동 703호, 446-958 Gyeonggi-do (KR). 김완기 (KIM, Wan Gi) [KR/KR]; 경기도 수원시 팔달구 우만동 600 월드메르디앙아파트 105동 706호, 442-190 Gyeonggi-do (KR). 이상준 (LEE, Sang Jun) [KR/KR]; 경기도 성남시 분당구 정자동 한솔마을 LG 아파트 205동 702호, 463-909 Gyeonggi-do (KR).

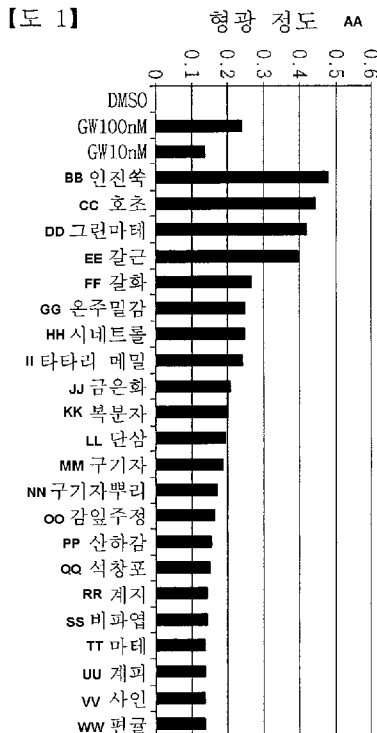
(74) 대리인: 김순영 (KIM, Sun-Young); 서울특별시 종로구 수송동 80-6 석탄회관빌딩 10층, 110-727 Seoul (KR).

(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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR ACCELERATING CHANGE IN MUSCLE TYPE

(54) 발명의 명칭 : 근육 타입 변화를 촉진하는 조성물



AA ... Degree of fluorescence
BB ... Artemisia capillaris Thunb.
CC ... Pepper
DD ... Green mate
EE ... Pueraria thunbergiana Benth.
FF ... Flowers of Pueraria lobata Ohwi
GG ... Citrus nobilis var. unshu
HH ... Sinetrol
II ... Fagopyrum tartaricum Gaertn.
JJ ... Lonicera japonica THUNB.
KK ... Rubus Coreanus
LL ... Salvia miltiorrhiza Bunge
MM ... Lycium chinense
NN ... Roots of Lycium chinense
OO ... Alcohol from persimmon leaves
PP ... Sanha persimmon
QQ ... Acorus gramineus Solander
RR ... young branches of Cinnamomum cassia Blume
SS ... Leaves of Eriobotrya japonica Lindley
TT ... Mate
UU ... Cinnamon
VV ... Amomum xanthioides Wallich.
WW ... Citrus tangerina Hort. et Tanaka

(57) Abstract: The present invention provides a composition for accelerating a change in muscle type, increasing the amount of muscle, strengthening muscle, enhancing athletic abilities, reducing lipids, suppressing the accumulation of lipids, lowering blood sugar, controlling body weight or lowering body weight, containing a PPAR- δ promoter, an AMPK promoter and a PGC1- α promoter as an active ingredient.

(57) 요약서: 본 발명은 PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및 PGC1- α 활성 촉진 물질을 유효 성분으로 포함하는 근육 타입 변화 촉진, 근육량 증가, 근육 강화, 운동 능력 향상, 지질 감소, 지질 축적 억제, 혈당 감소, 체중 조절 또는 체중 감소용 조성물을 제공한다.

WO 2011/126301 A2



HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

【명세서】

【발명의 명칭】

근육 타입 변화를 촉진하는 조성물

【기술분야】

<1> 본 발명은 근육 타입의 변화를 촉진할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

【배경기술】

<2> 유산소 운동에 의해 만들어진 근육은 1차 에너지를 탄수화물에서 지방으로 바꿈으로써 체내 지방을 감소시킨다. 뿐만 아니라, 탄수화물을 덜 쓰게 하므로 혈중 당 농도를 일정하게 하여 공복감을 덜 느끼게 하고, 탄수화물 대신 지방으로 ATP를 생성하므로 ATP 생성시 수반되는 활성 산소를 적게 하여 활성 산소에 의한 세포 손상을 방지한다. 그러나 모든 운동이 이러한 효과를 나타내는 것은 아니다. 달리기, 자전거 타기를 예로 들 수 있는 유산소 운동이 우리 몸의 속근 타입 근육을 지근 타입으로 바꾸기 때문에 위의 같은 효과를 나타내는 것이다.

<3> 우리 몸의 근육은 속근(Type II)과 지근(Type I)이 각각 50% 정도 존재한다. 속근은 미오글로빈(Myoglobin)이 없어서 하얗게 보이는 근육 타입으로써 탄수화물을 주 에너지원으로 사용한다. 주로 웨이트트레이닝 같은 무산소 운동에 의해 생성되는 근육 타입이고, 큰 부피를 가지며, 빠르게 움직일 때 사용된다. 이에 비해 지근은 미오글로빈이 존재하여 붉게 보이며, 탄수화물 대신 지방을 주 에너지원으로 사용한다. 주로 유산소 운동에 의해 생성되며, 작은 부피를 가지고, 천천히 장시간 움직일 때 사용된다. 지근에는 미토콘드리아의 수가 많고 활성이 높아 피로에 대한 저항력이 높으므로 장시간 동안 운동을 가능하게 한다.

<4> 일반적으로 단거리 선수들은 속근:지근의 비율이 약 70:30 이며 상체가 발달된 체형을 가지게 된다. 이에 반해 마라토너들은 일반적으로 속근:지근이 약 30:70의 비율로 존재하며, 전체적으로 마른 체형을 가지게 된다. 마라토너들은 같은 체중을 갖는 일반인(속근:지근= 약 50:50)에 비해 5배 가량 작은 사이즈를 가지게 되는데 이것은 근육이 같은 무게의 지방에 비해 5배 가량 작은 부피를 가지기 때문이다. 유산소 운동에 의해 마라토너와 같은 체형을 가지기 위해서는 최대 심박수 기준으로 65~75%의 강도의 운동을 하루 40분 이상 주 3회 이상, 6주 이상 수행해야 하는데, 이는 결코 쉽지 않다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

<5> 본 발명은 근육 타입 변화 촉진, 근육량 증가, 근육 강화, 운동 능력 향상,

지질 감소, 지질 축적 억제, 혈당 감소, 체중 조절 또는 체중 감소용 조성물을 제공하고자 한다.

【기술적 해결방법】

<6> 본 발명의 일측면에 따른 근육 타입 변화 촉진, 근육량 증가, 근육 강화, 운동 능력 향상, 지질 감소, 지질 축적 억제, 혈당 감소, 체중 조절 또는 체중 감소용 조성물은 PPAR- δ (Peroxisome proliferator-activated receptor- δ) 활성 촉진 물질, AMPK (AMP-activated protein kinase) 활성 촉진 물질 및 PGC1- α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α) 활성 촉진 물질을 유효 성분으로 포함한다.

【유리한 효과】

<7> 본 발명의 일측면에 따른 조성물은 PPAR- δ (Peroxisome proliferator-activated receptor- δ) 활성 촉진 물질, AMPK (AMP-activated protein kinase) 활성 촉진 물질 및 PGC1- α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α) 활성 촉진 물질을 유효 성분으로 포함하는 것으로, 근육 타입 변화 촉진, 근육량 증가, 근육 강화, 운동 능력 향상, 지질 감소, 지질 축적 억제, 혈당 감소, 체중 조절 또는 체중 감소의 효과를 나타낸다.

【도면의 간단한 설명】

<8> 도 1은 22종의 천연물 추출물들이 PPAR- δ 의 LBD에 붙는 정도를 형광값으로 나타낸 그래프이다.

<9> 도 2는 단삼, 당귀, 비파엽, 돌외잎, 온주, 어성초 추출물들을 근육 세포에 24시간 처리하였을 때 AMPK 단백질의 인산화 정도를 나타낸 것이다.

<10> 도 3은 황기 추출물을 비롯한 여러 천연물 추출물들이 PGC1- α 프로모터를 활성화시켜 루시퍼라아제를 발현시키는 정도를 나타낸 그래프이다

<11> 도 4는 200 μ g/ml의 인진쑥 추출물, EPA, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물을 비롯한 여러 물질들을 단독 또는 혼합하여 근육 세포에 처리한 후 유전자 CPT1 β , PDK4, PGC1- α 의 발현 정도를 음성 대조군과 비교하여 나타낸 그래프이다(돌외잎 : 돌외잎 추출물 + 인진쑥 추출물 + 황기 추출물, 돌외황 : 돌외잎 추출물 + EPA + 황기 추출물, 돌외피 : 돌외잎 추출물 + EPA + 피노틴(갯추출물), 온외황 : 온주 추출물 + 인진쑥 추출물 + 황기 추출물, 온외황 : 온주 추출물 + EPA + 황기 추출물, 온외피 : 온주 추출물 + EPA + 피노틴(갯추출물), 돌외피 : 돌외잎 추출물 + 인진쑥 추출물 + 피노틴(갯추출물), 온외피 : 온주 추출물 + 인진쑥 추출물 + 피노틴(갯추출물), 케이피 : 키토올리고당 + EPA + 피노틴(갯추출물), 레이피 : 레즈베

라트롤 + EPA + 피노틴(젓추출물), 키인황 : 키토올리고당 + 인진쑥 추출물 + 황기 추출물, 키이황 : 키토올리고당 + EPA + 황기 추출물).

<12> 도 5는 인진쑥 추출물, EPA, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물 단독 또는 이의 혼합물 투여군들의 운동 지속 시간을 나타낸 그래프이다.

<13> 도 6은 인진쑥 추출물, EPA, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물 단독 또는 이의 혼합물 투여군들의 체중 증가량을 나타낸 그래프이다.

<14> 도 7은 인진쑥 추출물, EPA, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물 단독 또는 이의 혼합물 투여군들의 부고환 무게를 나타낸 그래프이다.

<15> 도 8은 인진쑥 추출물, EPA, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물 단독 또는 이의 혼합물 투여군들의 종아리 뒷 근육 무게를 나타낸 그래프이다.

<16> 도 9는 인진쑥 추출물, EPA, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물 단독 또는 이의 혼합물 투여군들의 아디포넥틴 및 인슐린의 양을 음성 대조군과 비교하여 나타낸 그래프이다.

<17> 도 10은 인진쑥 추출물, EPA, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물 단독 또는 이의 혼합물 투여군들의 근육 타입을 나타낸 결과이다.

<18> 도 11은 인진쑥 추출물, EPA, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물 단독 또는 이의 혼합물 투여군들의 간 중성 지방 정도를 나타낸 결과이다.

<19> 도 12은 인진쑥 추출물, EPA, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물 단독 또는 이의 혼합물 투여군들의 갈색 지방 조직 지방구 크기를 나타낸 결과이다.

<20> 도 13은 인진쑥 추출물, EPA, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물 단독 또는 이의 혼합물 투여군들의 근육 세포에서의 CPT1 β , PDK4, PGC1- α 유전자들 발현 정도를 음성 대조군과 비교하여 나타낸 그래프이다.

【발명의 실시를 위한 형태】

<21> 본 명세서에서 "추출물"이라 함은, 천연물로부터 그 안의 성분을 뽑아냄으로써 얻어진 물질이라면, 뽑아내는 방법이나 성분의 종류와 무관하게 모두 포함한다. 예컨대, 물이나 유기 용매를 이용하여 천연물로부터 용매에 용해되는 성분을 추출해 낸 것, 천연물의 특정 성분, 예컨대 오일과 같은 특정 성분만을 추출하여 얻어진 것 등을 모두 포함하는 광의의 개념이다.

<22> 본 명세서에서 "대사"란 생물체가 몸 밖으로부터 섭취한 영양 물질을 몸 안에서 분해하고, 합성하여 생체 성분이나 생명 활동에 쓰는 물질이나 에너지를 생성하고 필요하지 않은 물질을 몸 밖으로 내보내는 작용을 말한다. 이러한 대사가 활발하게 일어나는 경우 신체 에너지 소비가 늘어난다.

<23>

<24> 이하에서, 본 발명을 상세하게 설명한다.

<25>

퍼옥시좀 증식인자-활성화 수용체 델타(Peroxisome proliferator-activated receptor- δ)(PPAR- δ)는 근육과 갈색 지방 조직 등에서 발현되는 인자로서, 이 전사인자가 과발현된 생쥐는 지방 세포에서 지방산의 산화를 촉진하여 비만(adiposity) 억제 효과를 보인다고 알려져 있다. 또한 PPAR- δ 활성화제는 CPT1 β (Carnitine palmitoyltransferase I β)와 PDK4(Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4) 등의 단백질들의 발현을 증가시킴으로써, 골격 근육 세포의 신진 대사 속도를 증가시키고, 인슐린에 대한 민감도를 향상시키며, 지방 세포를 줄이고 염증 반응을 억제하는 역할을 수행한다고 알려진 바 있다.

<26>

AMPK(AMP-activated protein kinase)는 세포 내 AMP를 감지할 때 활성화되는 단백질로서 ATP를 소모하는 신호전달경로를 억제하고 ATP를 합성하는 신호전달경로를 활성화하여 외부 스트레스로부터 세포를 보호하는 역할을 하는 대표적인 단백질이다. 근육에서는 지방 합성을 억제하고 지방산 산화를 촉진하며, 간에서는 당신생과정(gluconeogenesis)를 억제하여 당의 생성을 억제한다고 알려져 있다.

<27>

하지만 위의 PPAR- δ 및 AMPK를 활성화시키는 물질만으로는 근육을 속근 타입에서 지근 타입으로 변화시키거나 지근 타입을 증가시키는 효과가 크지 않다. 특히 근육이 완전히 발달된 성인에게서는 그 효과가 미미하다. 따라서 위의 PPAR- δ 및 AMPK를 활성화시키는 물질만으로는 근육량을 증가시키고, 근육을 강화하며, 체내 지방을 감소시키고, 혈당을 낮추는 등의 유산소 운동 효과를 보기 어렵다.

<28>

유산소 운동을 할 때, 근육에서는 에너지 생산을 담당하는 소기관인 미토콘드리아가 많이 증가한다. 미토콘드리아는 지방산 산화(fatty acid oxidation)를 관장하는 역할을 하고, 미토콘드리아의 지방산 산화가 촉진되면 ATP 에너지가 생성된다. 이러한 지방산 산화를 관장하는 미토콘드리아의 수와 능력은 PGC1- α 에 의해 조절된다.

<29>

<30>

본 발명의 일측면은 PPAR- δ (Peroxisome proliferator-activated receptor- δ) 활성 촉진 물질, AMPK(AMP-activated protein kinase) 활성 촉진 물질 및 PGC1- α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α) 활성 촉진 물질을 유효 성분으로 포함하는 근육 타입 변화 촉진, 근육량 증가, 근육 강화, 운동 능력 향상, 지질 감소, 지질 축적 억제, 혈당 감소, 체중 조절 또는 체중 감소용 조성물을 제공한다.

<31> 상기 PPAR- δ 활성 촉진 물질은 PPAR- δ 에 붙어 그의 활성을 증가시킴으로써 근육 세포 내 지방 및 당 대사를 촉진하는 효소의 발현을 증가시키는 효능이 인정된다. 상기 AMPK 활성 촉진 물질은 AMPK 단백질의 인산화를 촉진하여 에너지 대사 전반을 조절할 수 있다. 상기 PGC1- α 활성 촉진 물질은 PGC1- α 의 프로모터에 작용하여 PGC1- α 유전자 발현을 촉진함으로써 미토콘드리아 생합성을 증가시킬 수 있다.

<32>

<33> 본 발명의 일측면에 따른 조성물은 PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및 PGC1- α 활성 촉진 물질을 유효 성분으로 포함함으로써, 근육 타입의 변화를 촉진시킬 수 있다. 상기 근육 타입 변화는 속근 타입에서 지근 타입으로의 변화 또는 지근 타입의 증가를 포함한다. 앞서 살펴본 바와 같이, 근육 중 지근 타입의 근육이 많은 경우 지근이 속근에 비해 부피가 작으므로 동일한 체중을 갖더라도 외 부적으로 날씬해 보이는 효과가 있다. 또한 지근은 탄수화물 대신 지방을 주 에너지원으로 사용하므로 체내 지질을 감소시키고 지질 축적을 억제한다. 또한 지근은 속근과 비교할 때 천천히 장시간 움직일 때 사용되는 근육이므로 지근이 많아지면 지구력이 향상될 수 있다.

<34>

본 발명의 일측면에 따른 조성물은 PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및 PGC1- α 활성 촉진 물질을 유효 성분으로 포함함으로써, 체내 근육량을 증가시키고, 근육을 강화하여 운동 능력 및 신진 대사 능력을 개선시킬 수 있다. 또한 근육 세포에서 지방 및 당 대사에 관여하는 유전자들인 CPT1 β , PDK4, PGC1 α , GAPDH 등의 발현을 증가시킴으로써 체내 지질, 혈중 지질 및 혈당량을 낮추는 효과를 가진다.

<35>

따라서 본 발명의 일측면에 따른 PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및 PGC1- α 활성 촉진 물질을 유효 성분으로 포함하는 조성물을 동물 또는 사람에게 적용하면 유산소 운동을 한 것과 유사한 효과가 나타날 수 있으며, 나아가 체중 조절 및 체중 억제가 가능할 것이다.

<36>

<37> 본 발명의 일측면에 따른 조성물에서, 상기 PPAR- δ (Peroxisome proliferator-activated receptor- δ) 활성 촉진 물질은 인진쑥(*Artemisia princeps*) 추출물, EPA(Eicosapentaenoic acid), 호초(후추, *Piperis Nigri Fructus*) 추출물, 그린 마테(green mate, *Ilex paraguariensis*) 추출물 및 갈근(*Pueraria* 속 식물 뿌리) 추출물 중 하나 이상을 포함한다. 상기 EPA는 천연 PPAR-

8 리간드이다.

<38> 본 발명의 일측면에 따른 조성물에서, 상기 AMPK(AMP-activated protein kinase) 활성 촉진 물질은 돌외(*Gynostemma pentaphyllum*)의 추출물, 온주(*Citrus unshiu Marko*) 추출물 및 어성초(*Houttuynia cordata Thunberg*) 추출물 중 하나 이상을 포함한다.

<39> 본 발명의 일측면에 따른 조성물에서, 상기 PGC1- α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α) 활성 촉진 물질은 황기(*Astragali Radix*) 추출물, 갈화(*Pueraria* 속 식물 꽃) 추출물 및 빈굴(*Citrus leiocarpa*) 추출물 중 하나 이상을 포함한다.

<40>

<41> 본 발명의 일측면에서, 상기 추출물들은 각 해당하는 천연물을 통상적인 방법으로 추출하여 얻을 수 있다. 본 발명의 다른 일측면에서, 상기 추출물들은 각각의 천연물을 물 또는 주정을 포함하는 유기 용매에서 가열하고 추출한 후, 여과 및 감압 농축하는 공정을 통해 획득되는 것일 수 있다. 본 발명의 또 다른 일측면에서, 상기 유기 용매는, 특별히 제한되는 것은 아니며, C₁-C₅의 저급 알코올일 수 있다. 상기 C₁-C₅의 저급 알코올은, 예를 들어, 메탄올, 에탄올, 이소프로필알코올, n-프로필알코올, n-부탄올 및 이소부탄올로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합 용매일 수 있다.

<42>

<43> 본 발명의 일측면에 따른 PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및 PGC1- α 활성 촉진 물질을 유효 성분으로 포함하는 조성물에서, 상기 PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및 PGC1- α 활성 촉진 물질은 조성물 전체 중량을 기초로 1 내지 80 중량%로 포함될 수 있다. 본 발명의 다른 일측면에서, 상기 PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및 PGC1- α 활성 촉진 물질은 조성물 전체 중량을 기초로 5 내지 60 중량%로 포함될 수 있다. 본 발명의 또 다른 일측면에서, 상기 PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및 PGC1- α 활성 촉진 물질은 조성물 전체 중량을 기초로 10 내지 30 중량%로 포함될 수 있다. PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및 PGC1- α 활성 촉진 물질을 전체 조성물 중량 대비 1 내지 80 중량%의 범위로 사용할 경우 본 발명의 의도한 효과를 나타내기에 적절할 뿐만 아니라, 조성물의 안정성 및 안전성을 모두 만족할 수 있으며, 비용 대비 효과의 측면에서도 상기 범위로 사용하는 것이 적절할 수 있다.

<44> 본 발명의 일측면에 따른 PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및

PGC1- α 활성 촉진 물질을 유효 성분으로 포함하는 조성물에서, 상기 PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및 PGC1- α 활성 촉진 물질은 각각 조성물 전체 중량을 기초로 1 내지 30 중량%로 포함될 수 있다. 본 발명의 다른 일측면에서, 상기 PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및 PGC1- α 활성 촉진 물질은 각각 조성물 전체 중량을 기초로 5 내지 20 중량%로 포함될 수 있다. 본 발명의 또 다른 일측면에서, 상기 PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및 PGC1- α 활성 촉진 물질은 각각 조성물 전체 중량을 기초로 5 내지 10 중량%로 포함될 수 있다. PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및 PGC1- α 활성 촉진 물질을 각각 전체 조성물 중량 대비 1 내지 30 중량%의 범위로 사용할 경우 본 발명의 의도한 효과를 나타내기에 적절할 뿐만 아니라, 조성물의 안정성 및 안전성을 모두 만족할 수 있으며, 비용 대비 효과의 측면에서도 상기 범위로 사용하는 것이 적절할 수 있다.

<45> 본 발명의 일측면에 따른 PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및 PGC1- α 활성 촉진 물질을 유효 성분으로 포함하는 조성물에서, 상기 PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및 PGC1- α 활성 촉진 물질은 1-10 : 1-10 : 1-10의 비로 혼합될 수 있다. 본 발명의 다른 일측면에서, 상기 PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및 PGC1- α 활성 촉진 물질은 1-5 : 1-5 : 1-5의 비로 혼합될 수 있다. 본 발명의 또 다른 일측면에서, 상기 PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및 PGC1- α 활성 촉진 물질은 1-2 : 1-2 : 1-2의 비로 혼합될 수 있다. PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및 PGC1- α 활성 촉진 물질을 상기 비율로 혼합할 경우 본 발명의 의도한 효과를 나타내기에 적절할 뿐만 아니라, 조성물의 안정성 및 안전성을 모두 만족할 수 있으며, 비용 대비 효과의 측면에서도 적절할 수 있다.

<46>

<47> 본 발명의 일측면에 따른 조성물은 동물은 물론이고 인간에게도 적용 가능하다.

<48>

<49> 본 발명의 일측면은 PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및 PGC1- α 활성 촉진 물질을 유효 성분으로 포함하는 조성물을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

<50>

상기 약학 조성물은 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 약제학적 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물

질을 추가로 함유할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 다양한 경구 투여제 또는 비경구 투여제 형태로 제형화할 수 있다.

<51> 상기 경구 투여제는 예를 들면, 정제, 환제, 경질 및 연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 분제, 산제, 세립제, 과립제, 펠렛제 등이 있으며, 이들 제형은 유효 성분 이외에 계면 활성제, 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로오스 및 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및 폴리에틸렌 글리콜)를 함유할 수 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로오스, 나트륨 카복시메틸셀룰로오스 및 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제, 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제 등의 약제학적 첨가제를 함유할 수 있다. 상기 정제는 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

<52> 또한, 상기 비경구 투여제는 예를 들어, 주사제, 점적제, 연고, 로션, 겔, 크림, 스프레이, 현탁제, 유제, 좌제(坐劑), 패취 등의 제형일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

<53> 본 발명의 일실시예에 따른 상기 약학 조성물은 경구, 비경구, 직장, 국소, 경피, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 피하 등으로 투여될 수 있다.

<54> 또한, 상기 유효 성분의 약제학적으로 허용 가능한 용량, 즉 투여량은 치료 받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여 경로 또는 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있다. 일반적인 투여량은 0.01 mg/kg/일 내지 2000 mg/kg/일이 될 수 있고, 1 mg/kg/일 내지 100 mg/kg/일이 될 수 있으나, 상기 투여량은 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.

<55>

<56> 본 발명의 다른 일측면은 PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및 PGC1- α 활성 촉진 물질을 유효 성분으로 포함하는 조성물을 포함하는 식품 조성물을 제공한다. 상기 식품 조성물은 건강 식품 조성물일 수 있다.

<57> 상기 식품 또는 건강 식품 조성물의 제형은 특별히 한정되지 않으나, 예를 들어, 정제, 과립제, 드링크제, 캐러멜, 다이어트바, 차 티백 등으로 제형화될 수 있다. 각 제형의 식품 조성물은 유효 성분 이외에 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여

배합할 수 있으며, 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승 효과가 일어날 수 있다.

<58> 상기 유효 성분의 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 이의 1일 투여 용량은 투여하고자 하는 대상의 연령, 건강 상태, 합병증 등의 다양한 요인에 따라 달라질 수 있다.

<59>

<60> 본 발명의 다른 일측면은 PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및 PGC1- α 활성 촉진 물질을 유효 성분으로 포함하는 조성물을 포함하는 미용 조성물을 제공한다.

<61> 상기 미용 조성물은 예를 들어 화장품 조성물일 수 있으며, 화장품의 외형은 화장품학 또는 피부과학적으로 허용 가능한 매질 또는 기제를 함유한다. 이는 국소 적용에 적합한 모든 제형으로, 예를 들면, 용액, 젤, 고체, 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 유상에 수상을 분산시켜 얻은 에멀전, 멀티에멀전, 현탁액, 마이크로 에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는, 이온형(리포솜) 및 비이온형의 소낭 분산제, 포말(foam) 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로 제공될 수 있다. 이들 조성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.

<62> 미용 조성물은 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제, 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면 활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 에센셜 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품학 또는 피부 과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 상기 보조제는 화장품학 또는 피부 과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입된다.

<63> 상기 미용 조성물은 제형이 특별히 한정되지 않으며, 목적하는 바에 따라 제형을 적절히 선택할 수 있다. 예를 들어, 화장수, 로션, 에센스, 크림, 연고, 젤, 팩, 패치, 분무제, 파우더 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 콘실 스틱, 핸드 또는 풋 로션, 핸드 또는 풋 크림, 핸드 또는 풋 오일, 핸드 또는 풋 에센스, 핸드 또는 풋 세정제, 비누, 클렌징 크림, 클렌징 로션, 클렌징 폼 및 클렌징 워터로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 제형으로 제조될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

<64>

<65> 이하, 제조예, 실시예 및 실험예를 들어 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구

체적으로 설명한다. 그러나 이들 제조예, 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 하기 제조예, 실시예 및 실험예에 의해 제한되는 것은 아니다.

<66>

<67>

[제조예 1] 인진쑥 추출물의 제조

<68>

인진쑥은 한국 충청북도 제천시 청천동에서 재배한 것을 구입하였으며, 인진쑥 300 g에 70% 에탄올 3L를 가한 후 70 내지 80℃에서 3 시간 동안 교반하였다. 이를 2회 반복한 후, 여과지로 여과한 여과액을 회전 진공 농축기를 사용하여 감압 농축하였다. 이후 동결 건조하여 건조 분말 29 g을 수득하였다.

<69>

<70>

[제조예 2] 돌외잎 추출물의 제조

<71>

돌외잎 1kg을 분쇄한 후, 그 10배 가량의 물 또는 주정을 넣고 12~24 시간 동안 90~100℃에서 2~3회 반복 추출한 후 여과하였다. 이후 감압 농축하여 돌외잎 추출물을 제조하였다.

<72>

<73>

[제조예 3] 황기 추출물의 제조

<74>

황기는 일반적으로 시장에서 구할 수 있는 국산 제품을 구입하였다. 황기:3차 증류수를 1:10의 비율로 섞고, 3시간 동안 약탕기에서 추출하였다. 이를 2회 반복한 후, 여과지로 여과하여 추출물을 제조하였다. 여과액을 회전 진공 농축기로 감압 농축한 후, 동결 건조하고 건조 분말을 수득하여 황기 추출물을 제조하였다.

<75>

<76>

[실시예]

<77>

상기에서 제조한 인진쑥 추출물, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물을 1:1:1의 비율로 혼합하여 실시예 1을 제조하고, EPA, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물을 1:1:1의 비율로 혼합하여 실시예 2를 제조하였다.

<78>

<79>

[실험예 1] PPAR- δ 활성화 물질 스크리닝

<80>

PPAR- δ (Peroxisome proliferator-activated receptor- δ)는 이 단백질의 LBD(ligand binding domain)에 리간드가 붙으면 활성화되어 다른 유전자들의 발현을 조절하게 된다. 따라서, 이 전사 인자를 활성화시키는 물질은 LBD에 붙는 특성을 가지고 있어야 한다. 이를 토대로 90여종의 식용 가능한 천연물을 대상으로 PPAR- δ 활성화 물질을 스크리닝하였다.

<81> 상기 천연물들을 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹여 200, 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 하였으며, 분석 키트(LanthaScreen TR-FRET Peroxisome Proliferator Receptor delta Coactivator Assay kit; Invitrogen,CA)를 사용하여 상기 물질들의 PPAR- δ -LBD에 붙는 정도를 형광값으로 정량하였다. DMSO를 음성 대조군으로 사용하였다. 실험한 천연물 중 PPAR- δ -LBD에 붙는 정도가 우수한 22종의 천연물에 대한 결과를 도 1에 나타내었다.

<82> 도 1에서 볼 수 있듯이, 그 중에서도 인진쑥, 호조, 그린 마테(green mate), 갈근이 우수한 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있다. 그 중에서도 인진쑥의 PPAR- δ -LBD 리간드 EC_{50} 값은 9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 임을 확인하였다.

<83>

<84> [실험예 2] AMPK 활성화 물질 스크리닝

<85> 90여종의 식용 가능한 천연물을 대상으로 AMPK(AMP-activated protein kinase) 활성 효과 유무를 평가하고자 하기와 같은 실험을 실시하였다.

<86> C2C12 미성숙 근육세포는 ATCC(American Tissue Culture Collection, USA)로부터 구입하여 준비하였다. 이를 10% 우태혈청(fetal bovine serum; FBS)이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's Medium, Gibco 1210-0038) 배지에서 이틀에 한번씩 배지를 교환하면서 70% 컨플루언트(confluent)할 때까지 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 근육 세포로의 분화는 2% HS(horse serum)을 포함한 배지에서 배양하여 유도하였다. 2% HS(horse serum)를 포함한 배지에서 4일 동안 배양한 근육 세포에 DMSO에 녹인 천연물을 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 24시간 동안 처리하였다.

<87> 양성 대조군으로 AMPK 활성화제로 알려진 AICAR(Cell Signaling Technology, Inc. UK) 1ml를 처리하였다. 음성 대조군으로는 DMSO를 배지 부피의 1/1000로 처리하였다. 24시간 후, 상기 세포를 PBS로 세척하고, 8M 우레아, 2% CHAPS(3-[(3-chloramidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane-sulfonate), 50mM DTT(dithiothreitol), 2M 티오우레아, 2mM PMSF(phenyl methane sulfonyl fluoride) 및 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 류쥬틴(leupeptine)을 포함하는 단백질 추출 완충 용액 200 μl 로 처리한 후, 10분 동안 상온에서 방치하였다. 그 후, 4°C에서 10분 동안 15,000g의 중력 가속도로 원심 분리를 수행하여, 상층액을 수거한 후, 바이오-래드 단백질 염료 시약(BIO-Rad Protein Dye Reagent™)을 이용하여 단백질을 정량하였다. 100g의 단백질을 8% SDS-PAGE를 이용하여 크기 별로 분리하고, 50V로 12시간 동안 PDF(BioRad)막에 블로팅하였다. 이러한 블로팅을 5% 탈지 우유 용액으로 1시간 동안 블로킹시킨 후, 일차 항체로서 안티-AMPK- α (Cell signaling), 안티-포스포

(phospho) AMPK- α (Cell signaling) 및 안티- β -actin을 사용하였고, 이차 항체로서 호스 래디쉬 퍼옥시다아제(horse radish peroxidase)가 결합된 항체(애머삼바이오사이언스)를 반응시킨 다음, ECL(enhanced chemiluminescence) 키트(애머삼바이오사이언스)를 이용하여 발색시켰다. 반응시킨 블롯을 X선 후지 필름에 감광시킨 후 현상하여 단백질 발현 정도를 확인하였다. 필름 상의 밴드를 파워룩(PowerLook) 2100 XL (Umax)으로 스캐닝한 후, 이미지마스터(ImageMaster) 2D 엘라이트(Elite) (Amersham Bioscience) 이미지 분석 프로그램을 이용하여 분석하였다.

<88> 상기 실험한 천연물 중 AMPK 활성화 효과가 우수한 6종의 식물에 대한 결과들도 2에 나타내었다. 도 2로부터, 그 중에서도 들외잎, 온주, 어성초를 처리한 세포가 다른 세포들에 비해 AMPK의 인산화를 증가시키는 효과가 뛰어나다는 것을 알 수 있다.

<89>

<90> [실험예 3] PGC1- α 활성화 물질 스크리닝

<91> APRDC PGC1- α 프로모터 세포주를 이용하여 90종의 천연물에 대한 PGC1- α 프로모터 활성화 효과를 평가하였다. 상기 APRDC PGC1- α 프로모터 세포주는 PGC1- α 의 프로모터와 루시페라제 유전자를 유전 공학적으로 융합시킨 벡터가 안정적으로 발현되는 인간 간 세포주(수탁번호 KCTC 11218BP)이다.

<92> 먼저 APRDC PGC1- α 프로모터 세포주에 24시간 동안 DMSO에 녹인 90종의 천연물을 200 μ g/ml으로 처리한 다음, PBS(Phosphate buffered saline) 용액으로 2회 세척하고 루시페라제 분석 키트(Steady Glo Luciferase assay system, Promega, Cat. No. E2520)를 이용하여 리포터 유전자인 루시페라제 활성을 측정하였다. 루시페라제 활성 측정은 반응이 끝난 샘플을 96-웰 플레이트로 옮긴 후 형광 측정기(Luminometer)를 이용하여 형광 발색 값을 측정하는 방법으로 이루어졌다. 음성 대조군으로는 DMSO를 사용하였다.

<93> 상기 실험한 천연물 중 APRDC PGC1- α 프로모터 활성화 효과가 우수한 몇몇 천연물에 대한 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에 나타난 바와 같이, 황기, 갈화, 빈굴을 처리한 경우가 DMSO를 처리한 음성 대조군 뿐만 아니라 다른 물질들을 처리한 경우보다 형광 발색 값의 발색 정도에 있어 강한 반응을 나타내었다. 이는 황기, 갈화, 빈굴의 PGC1- α 프로모터 활성화 촉진 효과가 우수함을 의미한다.

<94>

<95> [실험예 4] 근육 세포에서의 유전자 발현 평가(세포 수준)

<96> 상기에서 살펴 본 각각 PPAR- δ , AMPK 및 PGC1- α 의 3가지 기전을 활성화시

키는 대표적인 물질, 즉 인진쑥 추출물, 돌외잎 추출물, 황기 추출물을 단독으로 처리했을 때 및 각각을 1:1:1로 섞은 혼합물을 처리했을 때 근육 세포에서 지방과 당 대사에 관여하는 유전자들의 발현 조절 효과를 측정하였다.

<97> C2C12 미성숙 근육세포는 ATCC(American Tissue Culture Collection, USA)로부터 구입하여 준비하였다. 이를 10% 우태혈청(fetal bovine serum; FBS)이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's Medium, Gibco 1210-0038) 배지에서 이틀에 한번씩 배지를 교환하면서 70% 컨플루언트(confluent)할 때까지 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 근육 세포로의 분화는 2% HS(horse serum)을 포함한 배지에서 배양하여 유도하였다. 2% HS(horse serum)를 포함한 배지에서 4일 동안 배양한 근육 세포에 인진쑥 추출물, 돌외잎 추출물, 황기 추출물 각 200 µg/ml씩을 혼합하여 또는 각각 단독으로 처리하였다. 음성 대조군으로는 DMSO를 배지 부피의 1/1000을 처리하였다. 각 시료를 처리한 세포들을 37℃에서 24 시간 배양하고, 차가운 식염수로 2회 세척한 후, 트리졸 시약(TRIZOL agent, Invitrogen)으로 RNA를 추출하였다. 상기에서 추출하여 정량한 1 µg/µl의 RNA와 역전사 시스템(Promega)을 이용하여 cDNA를 합성하였다.

<98> 합성된 cDNA와 CPT1β, PDK4, PGC1α, GAPDH의 각 유전자에 대해 미리 디자인된 프라이머(Primer)와 프루브(probe)(Applied biosystems; CPT1β, Mm00487200_m1; PDK4, Mm00447181_m1; PGC1-α Mm00447181_m1; GAPDH, Mm99999915_q1)를 이용하여 각 유전자들의 발현 양상을 측정하였다. PCR 반응과 분석은 로터-진 3000 시스템(Rotor-Gene 3000 system; Corbett Research, Sydney, Australia)을 이용하였다. 상기 실험 결과를 도 4에 나타내었다.

<99> 도 4에서 3가지 물질을 혼합 처리한 경우, 음성 대조군이나 각 물질을 단독 처리한 경우에 비해 CPT1β, PDK4, PGC1-α의 발현을 2배 이상 증가시키는 것을 확인할 수 있다. 따라서 PPAR-δ, AMPK 및 PGC1-α의 3가지 기전을 각각 활성화시키는 물질을 혼합한 투여는 근육에서 지방 및 당 대사를 촉진할 수 있음을 알 수 있다.

<100>

<101> [실험예 5] 운동 지속 시간 평가

<102> (1) 실험 마우스 준비

<103> 5주령된 C57BL/6 수컷을 구입하여 각 군당 10마리씩의 정상 식이군, 고지방 식이군 및 유산소 운동군을 구성하였다. 정상 식이군은 D12450B (10% fat, Research diet, Inc., NJ, USA) 사료를 먹였고, 고지방 식이군은 D12492 (60% fat)

를 8주 동안 먹였다. 유산소 운동군은 고지방식이를 하면서 일주일에 5회, 40분씩 트레드밀(15m/min)을 이용하여 달리게 하였다. 실험군은 고지방식이와 함께 시험 물질로 각 200 mg/kg씩의 돌외잎 추출물, 인진쑥 추출물, 황기 추출물 또는 EPA를 단독으로, 인진쑥 추출물, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물의 혼합물 또는 EPA, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물의 혼합물을 하루에 1회씩 경구 투여하였다. 매주 1회 체중과 사료량을 측정하였다.

<104> (2) 운동 지속 시간 측정

<105> 시험 물질 투여 8주 후, 실험 마우스를 15m/min 속도의 트레드밀에서 달리게 하여 운동 지속 시간을 측정하였다. 측정 결과는 도 5와 같다. 도 5를 보면, 돌외잎 추출물, 인진쑥 추출물 및 황기 추출물의 혼합물 또는 돌외잎 추출물, EPA 및 황기 추출물의 혼합물을 투여한 군들은 투여하지 않는 음성 대조군이나 단독으로 처리한 군에 비해 운동 시간이 약 70% 증가하였다.

<106> 따라서 각각 PPAR- δ , AMPK 및 PGC1- α 의 3가지 기전을 활성화시키는 물질을 혼합한 투여는 장시간 운동을 가능하게 함을 알 수 있다.

<107>

<108> [실험예 6] 체중 및 각 조직 무게 측정 평가

<109> 5주령된 C57BL/6 수컷을 구입하여 각 군당 10마리씩의 실험 마우스를 준비하였다. 시험 물질로 각 200 mg/kg씩의 돌외잎 추출물, 인진쑥 추출물, 황기 추출물 또는 EPA를 단독으로, 인진쑥 추출물, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물의 혼합물 또는 EPA, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물의 혼합물을 하루에 1회씩 경구 투여하였다. 한편, 실험 마우스는 부검하기 12시간 전부터 절식시켰다.

<110> 시험 물질을 8주간 투여하면서 측정한 체중은 도 6과 같다. 도 6를 보면, 돌외잎 추출물, 인진쑥 추출물 및 황기 추출물의 혼합물 또는 돌외잎 추출물, EPA 및 황기 추출물의 혼합물을 투여한 군들은 투여하지 않는 음성 대조군이나 단독으로 처리한 군에 비해 체중이 각각 26%, 28% 감소하였다.

<111> 부고환 지방의 무게는 도 7과 같으며, 돌외잎 추출물, 인진쑥 추출물 및 황기 추출물의 혼합물 또는 돌외잎 추출물, EPA 및 황기 추출물의 혼합물을 투여한 군들은 투여하지 않는 음성 대조군이나 단독으로 처리한 군에 비해 각각 34%, 36% 감소하였다.

<112> 마우스의 종아리 뒷 근육(plantaris muscle)을 분리하여 그 무게를 측정한 결과는 도 8과 같으며, 돌외잎 추출물, 인진쑥 추출물 및 황기 추출물의 혼합물 또는 돌외잎 추출물, EPA 및 황기 추출물의 혼합물을 투여한 군들은 투여하지 않는

음성 대조군이나 단독으로 처리한 군에 비해 약 55% 증가하였다.

<113> 따라서 각각 PPAR- δ , AMPK 및 PGC1- α 의 3가지 기전을 활성화시키는 물질을 혼합한 투여는 체중 및 부고환 지방의 무게는 감소시키면서, 근육량은 증가시킴을 알 수 있다.

<114>

<115> [실험예 7] 혈액 분석

<116> 5주령된 C57BL/6 수컷을 구입하여 각 군당 10마리씩의 실험 마우스를 준비하였다. 시험 물질로 각 200 mg/kg씩의 돌외잎 추출물, 인진쑥 추출물, 황기 추출물 또는 EPA를 단독으로, 인진쑥 추출물, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물의 혼합물 또는 EPA, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물의 혼합물을 하루에 1회씩 8주간 경구 투여한 후 혈당, 혈청 내 중성 지방 및 콜레스테롤 농도를 평가하기 위해 혈액 분석을 행하였다.

<117> 혈당은 아큐-체크 액티브 키트(Accu-Check Active kit)(Roche-diagnostics, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다.

<118> 혈액을 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청만 분리하였다. 분리된 혈청 내 중성 지방과 콜레스테롤 농도를 비타랩 셀렉트라 이 분석기(VITALAB Selectra E analyzer)(Vital Scientific, Dieren, The Netherlands)를 이용하여 분석하였다. 분석 결과는 아래 표 1과 같다.

<119> 【표 1】

군	혈당 (mg/dl)	중성지방(mg/dl)	콜레스테롤(mg/dl)
대조군	183.5 $\pm$ 9.1	100.4 $\pm$ 8.7	160.2 $\pm$ 5.33
돌외잎 추출물	180.2 $\pm$ 8.47	102.98 $\pm$ 9.7	167.4 $\pm$ 9.7
인진쑥 추출물	176.3 $\pm$ 10.1	99.34 $\pm$ 5.4	170.3 $\pm$ 11.2
황기 추출물	179.9 $\pm$ 8.92	89.74 $\pm$ 5.4	159.3 $\pm$ 4.5
EPA	181.2 $\pm$ 10.9	101.23 $\pm$ 11.3	164.9 $\pm$ 12.1
돌외잎+인진쑥+황기	169.3 $\pm$ 8.6	62.5 $\pm$ 8.5	175.34 $\pm$ 10.23
돌외잎+EPA+황기	169.6 $\pm$ 6.5	80.8 $\pm$ 8.3	156.2 $\pm$ 5.4

<120>

<121> 표 1에서 볼 수 있듯이, 혈당 및 중성 지방 농도의 경우 돌외잎 추출물, 인진쑥 추출물 및 황기 추출물의 혼합물 또는 돌외잎 추출물, EPA 및 황기 추출물의 혼합물을 투여한 군들이 투여하지 않는 음성 대조군이나 단독으로 처리한 군에 비해 유의적으로 감소하였다.

<122> 따라서 각각 PPAR- δ , AMPK 및 PGC1- α 의 3가지 기전을 활성화시키는 물질을 혼합한 투여는 혈당과 혈액 내 중성 지방을 낮추는 효과가 있음을 알 수 있다.

<123>

- <124> [실험예 8] 아디포넥틴 및 인슐린 농도 분석
- <125> 5주령된 C57BL/6 수컷을 구입하여 각 군당 10마리씩의 실험 마우스를 준비하였다. 시험 물질로 각 200 mg/kg씩의 돌외잎 추출물, 인진쑥 추출물, 황기 추출물 또는 EPA를 단독으로, 인진쑥 추출물, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물의 혼합물 또는 EPA, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물의 혼합물을 하루에 1회씩 8주간 경구 투여한 후 아디포넥틴과 인슐린 농도를 측정하였다.
- <126> 혈액을 항응고 튜브에 채취하여 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈장을 분리하였다. 혈장을 20,000배 희석하고, 마우스 아디포넥틴 퀀티킨 키트(mouse adiponectin quantikine kit: R&D system)를 이용하여 발현된 아디포넥틴의 양을 측정하였다. 인슐린의 농도는 혈장을 20,000배 희석하고, 마우스 인슐린 퀀티킨 키트(mouse insulin quantikine kit: R&D system)를 이용하여 측정하였다. 측정 결과는 도 9에 나타내었다.
- <127> 아디포넥틴의 농도의 경우 돌외잎 추출물, 인진쑥 추출물 및 황기 추출물의 혼합물 또는 돌외잎 추출물, EPA 및 황기 추출물의 혼합물을 투여한 군들이 투여하지 않는 음성 대조군이나 단독으로 처리한 군에 비해 약 50% 증가하였으며, 인슐린 농도의 경우 돌외잎 추출물, 인진쑥 추출물 및 황기 추출물의 혼합물 또는 돌외잎 추출물, EPA 및 황기 추출물의 혼합물을 투여한 군들이 투여하지 않는 음성 대조군이나 단독으로 처리한 군에 비해 각각 60%, 55% 감소하였다.
- <128> 따라서 각각 PPAR- δ , AMPK 및 PGC1- α 의 3가지 기전을 활성화시키는 물질을 혼합한 투여는 혈당 조절 및 지방산 대사에 관여하는 단백질 호르몬인 아디포넥틴 농도를 증가시키고, 인슐린 농도를 감소시킴을 알 수 있다. 여기에서 인슐린이 감소된다는 것은 혈당이 낮게 유지됨을 의미한다.
- <129>
- <130> [실험예 9] 근육 타입 변화 분석
- <131> 시험 물질 투여 후 마우스의 근육 타입 변화를 평가하기 위해 5주령된 C57BL/6 수컷을 구입하여 각 군당 10마리씩의 실험 마우스를 준비하였다. 시험 물질로 각 200 mg/kg씩의 돌외잎 추출물, 인진쑥 추출물, 황기 추출물 또는 EPA를 단독으로, 인진쑥 추출물, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물의 혼합물 또는 EPA, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물의 혼합물을 하루에 1회씩 8주간 경구 투여한 후 부검하기 12시간부터 절식시켰다.
- <132> 각 실험군의 종아리 뒷 근육(plantaris muscle)을 취하여 액체 질소에서 동결하였다. 동결된 조직을 cryotome을 이용하여 10 μ m 두께로 박절한 후 아세톤에서

10분 고정하고 PBS로 3회 세척하였다. 10% 우태아혈청을 포함하는 PBS로 2시간 블로킹한 후, 항-지근 타입 마이오신(Myosin)(abcam, Cambridge, UK) 항체를 1차 항체로, 그리고 FITC(fluorescein isothiocyanate)가 결합된 항-생쥐 IgG 항체(Molecular Probes)를 2차 항체로 처리하였다. 이를 안티페이드(Anti-fade) 용액으로 마운팅(mounting)한 후 공초점(confocal) 현미경을 통해 분석하였다.

<133> 분석 결과는 도 10 및 아래 표 2에 나타내었다.

<134> 【표 2】

군	지근 (%)	속근 (%)
대조군	25.4±1.6	74.5±2.6
돌외잎 추출물	30.6±2.1	69.4±3.1
인진쑥 추출물	24.3±2.7	75.7±3.76
황기 추출물	24.5±1.9	75.5±3.1
EPA	29.4±4.2	70.6±3.6
돌외잎+인진쑥+황기	49.5±3.4	44.3±4.3
돌외잎+EPA+황기	50.4±4.3	55.6±4.3

<135>

<136> 돌외잎 추출물, 인진쑥 추출물 및 황기 추출물의 혼합물 또는 돌외잎 추출물, EPA 및 황기 추출물의 혼합물을 투여한 군들의 근육 조직에서, 투여하지 않는 음성 대조군이나 단독으로 처리한 군의 근육 조직에 비해 지근 타입 마이오신이 약 2배 증가하였다. 이는 돌외잎 추출물, 인진쑥 추출물 및 황기 추출물의 혼합물 또는 돌외잎 추출물, EPA 및 황기 추출물의 혼합물의 투여가 마우스의 근육 타입을 지근으로 변화시킴을 의미한다. 또한 이러한 근육 타입의 변화는 각각 PPAR- δ , AMPK 및 PGC1- α 의 3가지 기전을 활성화시키는 물질을 혼합한 투여가 유산소 운동과 유사한 근육 타입 변화 결과를 가져올 수 있음을 의미한다.

<137>

<138> [실험예 10] 간 조직의 중성 지방 분석

<139> 5주령된 C57BL/6 수컷을 구입하여 각 군당 10마리씩의 실험 마우스를 준비하였다. 시험 물질로 각 200 mg/kg씩의 돌외잎 추출물, 인진쑥 추출물, 황기 추출물 또는 EPA를 단독으로, 인진쑥 추출물, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물의 혼합물 또는 EPA, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물의 혼합물을 하루에 1회씩 8주간 경구 투여한 후 간 조직의 중성 지방을 평가하였다. 한편 실험 마우스는 부검하기 12시간 전부터 절식시켰다.

<140> 실험 마우스의 간 조직을 적출하여 액체 질소에서 동결하였다. 동결된 조직을 cryotome을 이용하여 10 μ m 두께로 박절한 후 0.5% Oil red O (O-0625, Sigma-Aldrich, USA) 프로필렌 글라이콜(propylene glycol)(031301, Samchun pure

chemical Co. Ltd., Korea)에 60 °C에서 8분간 반응시킨 후, 85% 프로필렌 글라이콜(propylene glycol)에 2분간 반응시켰다. 그 뒤 1분간 흐르는 물에 수세하고, 마이어스 헤마토실린(Mayer' s hematoxylin)(10029273, DAKO, USA)을 이용하여 대조 염색한 후 광학 현미경 하에서 관찰하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.

<141> 도 11에서 돌외잎 추출물, 인진쑥 추출물 및 황기 추출물의 혼합물 또는 돌외잎 추출물, EPA 및 황기 추출물의 혼합물을 투여한 군들이 투여하지 않는 음성 대조군이나 단독으로 처리한 군에 비해 열게 나타나는 것으로 보아 조직에서의 중성 지방이 현격히 감소한 것을 확인할 수 있다.

<142> 따라서 각각 PPAR- δ , AMPK 및 PGC1- α 의 3가지 기전을 활성화시키는 물질을 혼합한 투여는 간 조직의 중성 지방을 감소시킴을 알 수 있다.

<143>

<144> [실험예 11] 갈색 지방 조직의 지방구 분석

<145> 5주령된 C57BL/6 수컷을 구입하여 각 군당 10마리씩의 실험 마우스를 준비하였다. 시험 물질로 각 200 mg/kg씩의 돌외잎 추출물, 인진쑥 추출물, 황기 추출물 또는 EPA를 단독으로, 인진쑥 추출물, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물의 혼합물 또는 EPA, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물의 혼합물을 하루에 1회씩 8주간 경구 투여한 후 갈색 지방 조직의 지방구를 평가하였다. 한편 실험 마우스는 부검하기 12시간 전부터 절식시켰다.

<146> 각 실험군의 갈색 지방을 취하여 10% 중성 포르말린에 고정하였다. 파라핀 포매 과정을 거친 조직은 파라핀 포매 후 마이크로톰(microtome)을 이용하여 3 μ m 두께로 박절한 후, Hematoxylin(10029273, DAKO, USA) & Eosin(075K4346, Sigma-Aldrich, USA)(H&M)을 이용하여 염색하고, 광학 현미경 하에서 관찰하였다. 그 결과는 도 12에 나타내었다.

<147> 도 12를 보면, 돌외잎 추출물, 인진쑥 추출물 및 황기 추출물의 혼합물 또는 돌외잎 추출물, EPA 및 황기 추출물의 혼합물을 투여한 군들이 투여하지 않는 음성 대조군이나 단독으로 처리한 군에 비해 갈색 지방 조직의 지방구 크기가 현격히 감소한 것을 확인할 수 있다.

<148> 따라서 각각 PPAR- δ , AMPK 및 PGC1- α 의 3가지 기전을 활성화시키는 물질을 혼합한 투여는 갈색 지방 조직의 지방구를 감소시킴을 알 수 있다.

<149>

<150> [실험예 12] 근육 세포에서의 유전자 발현 평가(동물 수준)

<151> 5주령된 C57BL/6 수컷을 구입하여 각 군당 10마리씩의 실험 마우스를 준비하

였다. 시험 물질로 각 200 mg/kg씩의 돌외잎 추출물, 인진쑥 추출물, 황기 추출물 또는 EPA를 단독으로, 인진쑥 추출물, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물의 혼합물 또는 EPA, 돌외잎 추출물 및 황기 추출물의 혼합물을 하루에 1회씩 8주간 경구 투여한 후 근육 세포에서의 유전자 발현 정도를 평가하였다. 한편 실험 마우스는 부검하기 12시간 전부터 절식시켰다.

<152> 각 실험군의 근육을 분쇄한 후, 트리졸 시약(TRIZOL agent, Invitrogen)을 이용하여 RNA를 추출하였다. 상기에서 추출하여 정량한 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 RNA와 역전사 시스템(Promega)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA와 CPT1 β , PDK4, PGC1 α , GAPDH 등의 각 유전자에 대해 미리 디자인된 프라이머(Primer)와 프루브(probe)(Applied biosystems; CPT1, Mm00487200_m1; PDK4, Mm00447181_m1; PGC1 α , Mm00447181_m1, GAPDH, Mm99999915_q1)를 이용하여 각 유전자들의 발현 양상을 측정하였다. PCR 반응과 분석은 로터-진 3000 시스템(Rotor-Gene 3000 system; Corbett Research, Sydney, Australia)을 이용하였다. 상기 실험 결과는 도 13에 나타내었다.

<153> 도 13에서 알 수 있듯이, 돌외잎 추출물, 인진쑥 추출물 및 황기 추출물의 혼합물 또는 돌외잎 추출물, EPA 및 황기 추출물의 혼합물을 투여한 군들은 투여하지 않는 음성 대조군이나 단독으로 처리한 군에 비해 각 유전자들의 발현이 2배 정도 증가하였다. 따라서 각각 PPAR- δ , AMPK 및 PGC1- α 의 3가지 기전을 활성화시키는 물질을 혼합한 투여는 근육에서 지방 및 당 대사를 촉진할 수 있음을 알 수 있다.

<154>

<155> 이하 본 발명에 의한 PPAR- δ 활성 촉진 물질, AMPK 활성 촉진 물질 및 PGC1- α 활성 촉진 물질을 유효 성분으로 포함하는 조성물을 포함하는 약학 조성물, 식품 조성물 및 미용 조성물의 제형예를 보다 상세하게 설명하나, 약학 조성물, 식품 조성물 및 미용 조성물은 여러 가지 제형으로 응용 가능하고, 이는 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

<156>

<157> [제형예 1] 정제의 제조

<158> 실시예.....50 mg

<159> 옥수수전분.....100 mg

<160> 유당.....100 mg

<161> 스테아린산 마그네슘.....2 mg

<162> 비타민 C.....50 mg

<163> 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제 제조 방법에 따라 타정하여 정제를 제조한다.

<164>

<165> [제형예 2] 캡셀제의 제조

<166> 실시에50 mg

<167> 옥수수전분.....100 mg

<168> 유당.....100 mg

<169> 스테아린산 마그네슘.....2 mg

<170> 비타민 C.....50 mg

<171> 세린.....50 mg

<172> 통상의 캡셀제 제조 방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡셀에 충전하여 캡셀제를 제조한다.

<173>

<174> [제형예 3] 액제의 제조

<175> 실시에100 mg

<176> 이성화당.....10 g

<177> 만니톨.....5 g

<178> 비타민 C.....50 mg

<179> 세린.....50 mg

<180> 유지.....적량

<181> 정제수.....잔량

<182> 통상의 액제 제조 방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 후 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절하고 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

<183>

<184> [제형예 4] 건강 식품의 제조

<185> 실시에.....1000 mg

<186> 비타민 혼합물

<187> 비타민 A 아세테이트.....70 μ g

<188> 비타민 E1.0 mg

<189> 비타민 B1.....0.13 mg

<190>	비타민 B2	0.15 mg
<191>	비타민 B6.....	0.5 mg
<192>	비타민 B12.....	0.2 μ g
<193>	비타민 C.....	10 mg
<194>	비오틴.....	10 μ g
<195>	니코틴산아미드.....	1.7 mg
<196>	엽산.....	50 μ g
<197>	판토텐산 칼슘.....	0.5 mg
<198>	무기질 혼합물	
<199>	황산제1철.....	1.75 mg
<200>	산화아연.....	0.82 mg
<201>	탄산마그네슘.....	25.3 mg
<202>	제1인산칼륨.....	15 mg
<203>	제2인산칼슘.....	55 mg
<204>	구연산칼륨.....	90 mg
<205>	탄산칼슘.....	100 mg
<206>	염화마그네슘.....	24.8 mg

<207> 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강 식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강 식품 제조 방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강 식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

<208>

<209> [제형예 5] 음료의 제조

<210>	실시예.....	1000 mg
<211>	구연산.....	1000 mg
<212>	올리고당.....	100 g
<213>	매실농축액.....	2 g
<214>	타우린.....	1 g
<215>	정제수를 가하여 전체.....	1000 ml

<216> 통상의 음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한다. 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득한 후 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관하여 본 발명의 음료 조성물 제조에 사용한다.

<217>

<218> [제형예 6] 크림

<219> 하기 표 3과 같이 크림을 통상의 방법에 따라 제조할 수 있다.

<220> 【표 3】

배합성분	중량%
실시에	2.0
폴리솔베이트 60	1.5
솔비탄세스퀴올레이트	0.5
PEG60 경화피마자유	2.0
유동파라핀	10
스쿠알란	5.0
카프릴릭/카프릭트리글리세라이	5.0
글리세린	5.0
부틸렌글리콜	3.0
프로필렌글리콜	3.0
트리에탄올아민	0.2
방부제	적량
색소	적량
향료	적량
정제수	to 100

<221>

【청구의 범위】**【청구항 1】**

PPAR- δ (Peroxisome proliferator-activated receptor- δ) 활성 촉진 물질, AMPK(AMP-activated protein kinase) 활성 촉진 물질 및 PGC1- α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α) 활성 촉진 물질을 유효 성분으로 포함하는 근육 타입 변화 촉진용 조성물.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서,

상기 근육 타입 변화는 속근 타입에서 지근 타입으로의 변화 또는 지근 타입의 증가를 포함하는 근육 타입 변화 촉진용 조성물.

【청구항 3】

PPAR- δ (Peroxisome proliferator-activated receptor- δ) 활성 촉진 물질, AMPK(AMP-activated protein kinase) 활성 촉진 물질 및 PGC1- α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α) 활성 촉진 물질을 유효 성분으로 포함하는 근육량 증가, 근육 강화 또는 운동 능력 향상용 조성물.

【청구항 4】

PPAR- δ (Peroxisome proliferator-activated receptor- δ) 활성 촉진 물질, AMPK(AMP-activated protein kinase) 활성 촉진 물질 및 PGC1- α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α) 활성 촉진 물질을 유효 성분으로 포함하는 지질 감소, 지질 축적 억제 또는 혈당 감소용 조성물.

【청구항 5】

PPAR- δ (Peroxisome proliferator-activated receptor- δ) 활성 촉진 물질, AMPK(AMP-activated protein kinase) 활성 촉진 물질 및 PGC1- α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α) 활성 촉진 물질을 유효 성분으로 포함하는 체중 조절 또는 체중 감소용 조성물.

【청구항 6】

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 PPAR- δ (Peroxisome proliferator-activated receptor- δ) 활성 촉진 물질은 인진쑥 추출물, EPA(Eicosapentaenoic acid), 호조 추출물, 그린 마테 추출물 및 갈근 추출물 중 하나 이상인 조성물.

【청구항 7】

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 AMPK(AMP-activated protein kinase) 활성 촉진 물질은 돌외잎 추출물, 온주 추출물 및 어성초 추출물 중 하나 이상인 조성물.

【청구항 8】

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 PGC1- α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α) 활성 촉진 물질은 황기 추출물, 갈화 추출물 및 빈굴 추출물 중 하나 이상인 조성물.

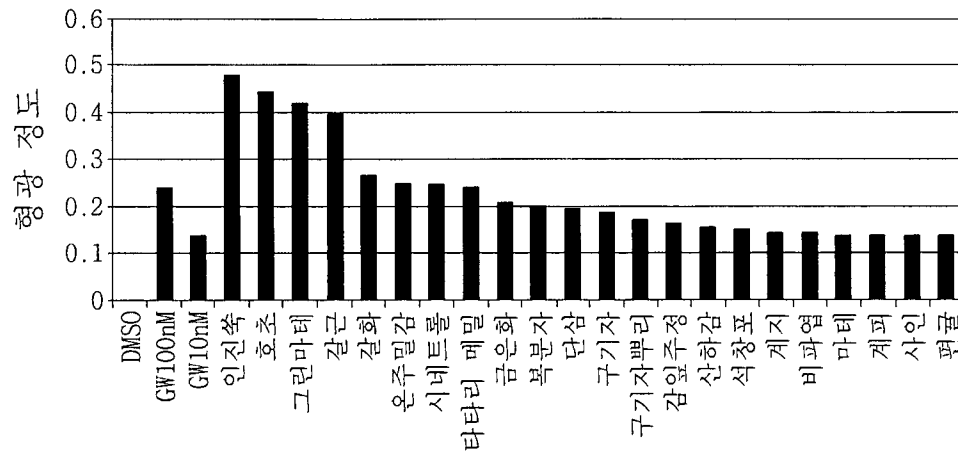
【청구항 9】

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

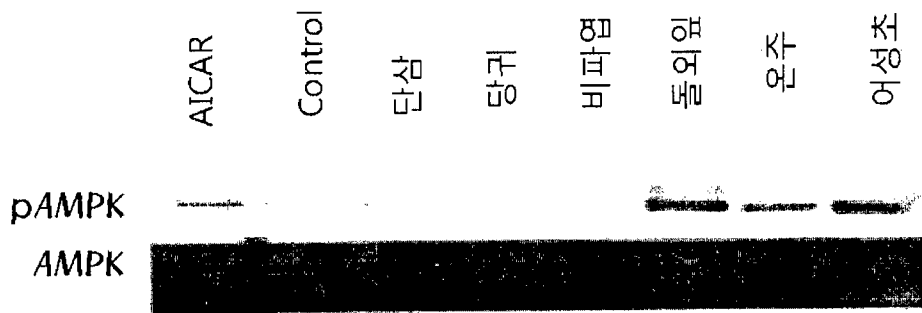
PPAR- δ (Peroxisome proliferator-activated receptor- δ) 활성 촉진 물질, AMPK(AMP-activated protein kinase) 활성 촉진 물질 및 PGC1- α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α) 활성 촉진 물질의 혼합비는 1-10 : 1-10 : 1-10인 조성물.

【도면】

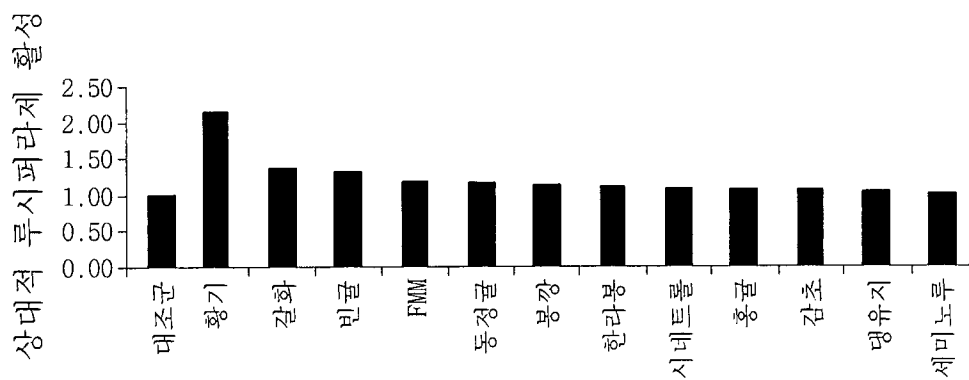
【도 1】



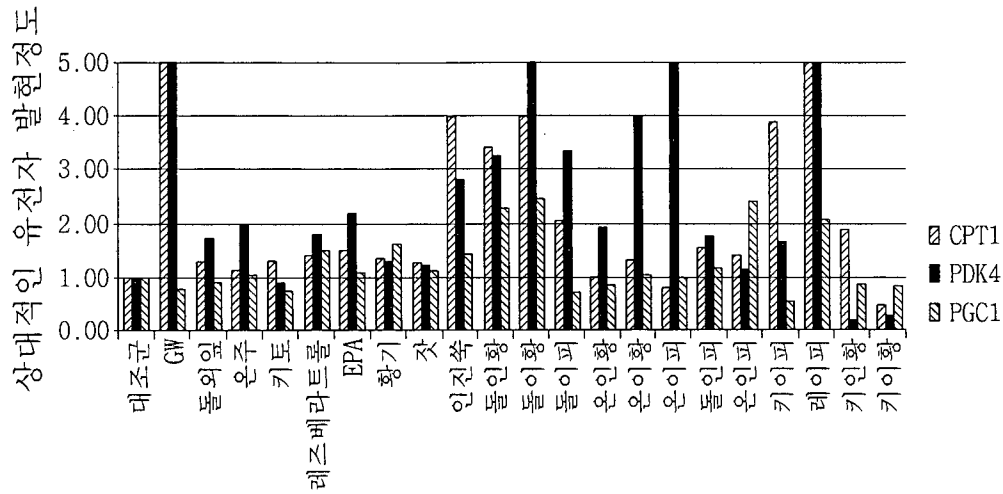
【도 2】



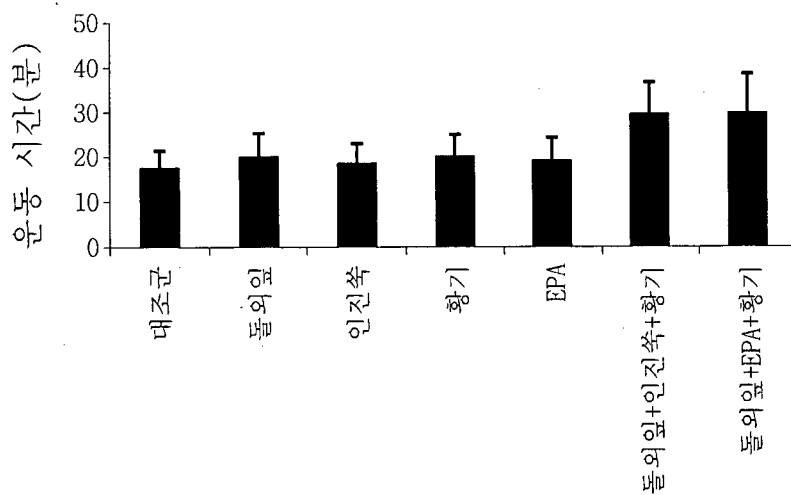
【도 3】



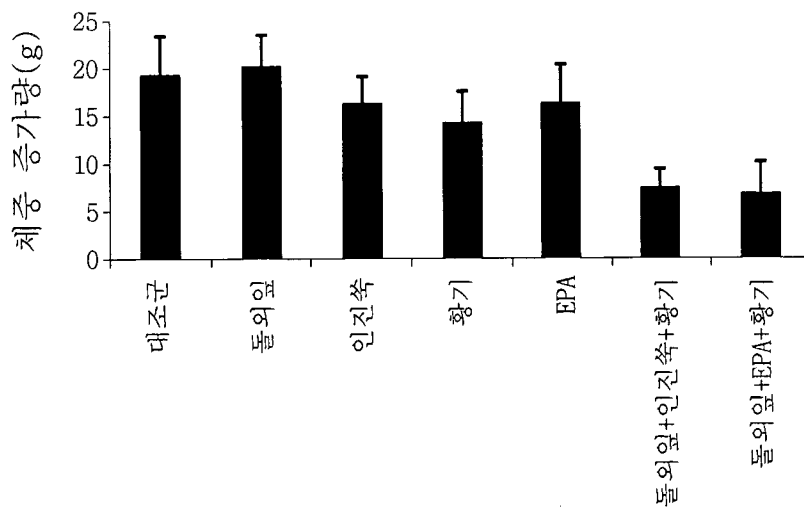
【도 4】



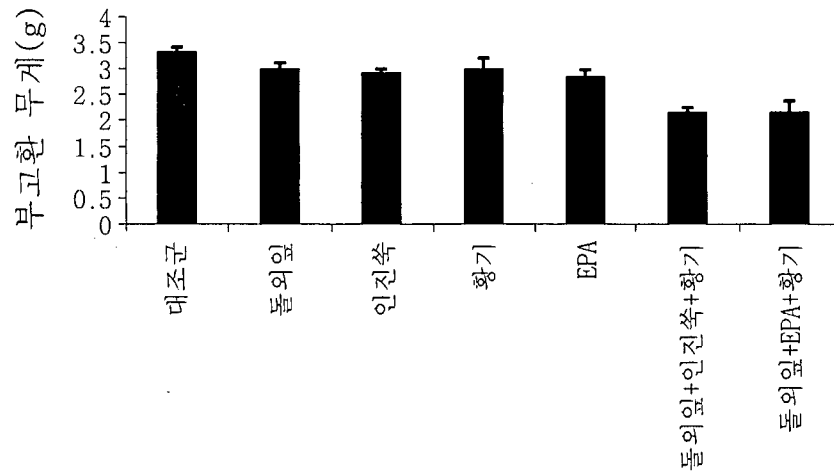
【도 5】



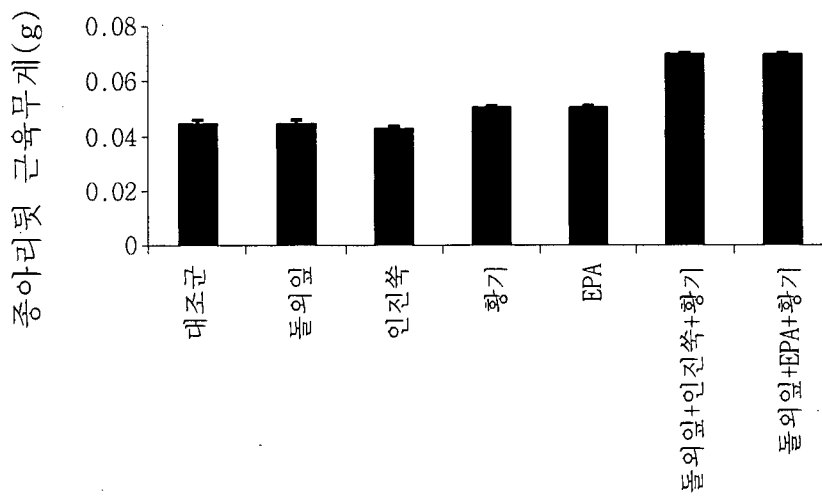
【도 6】



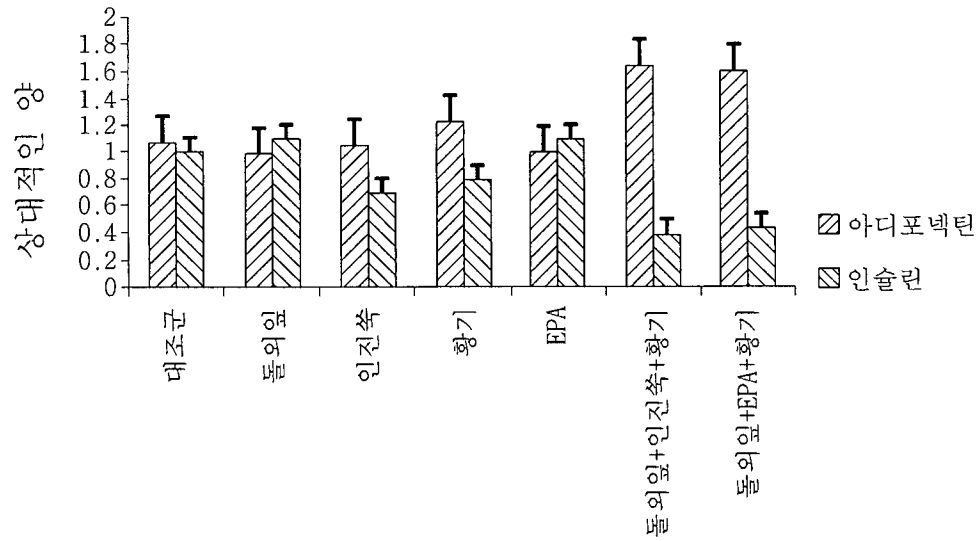
【도 7】



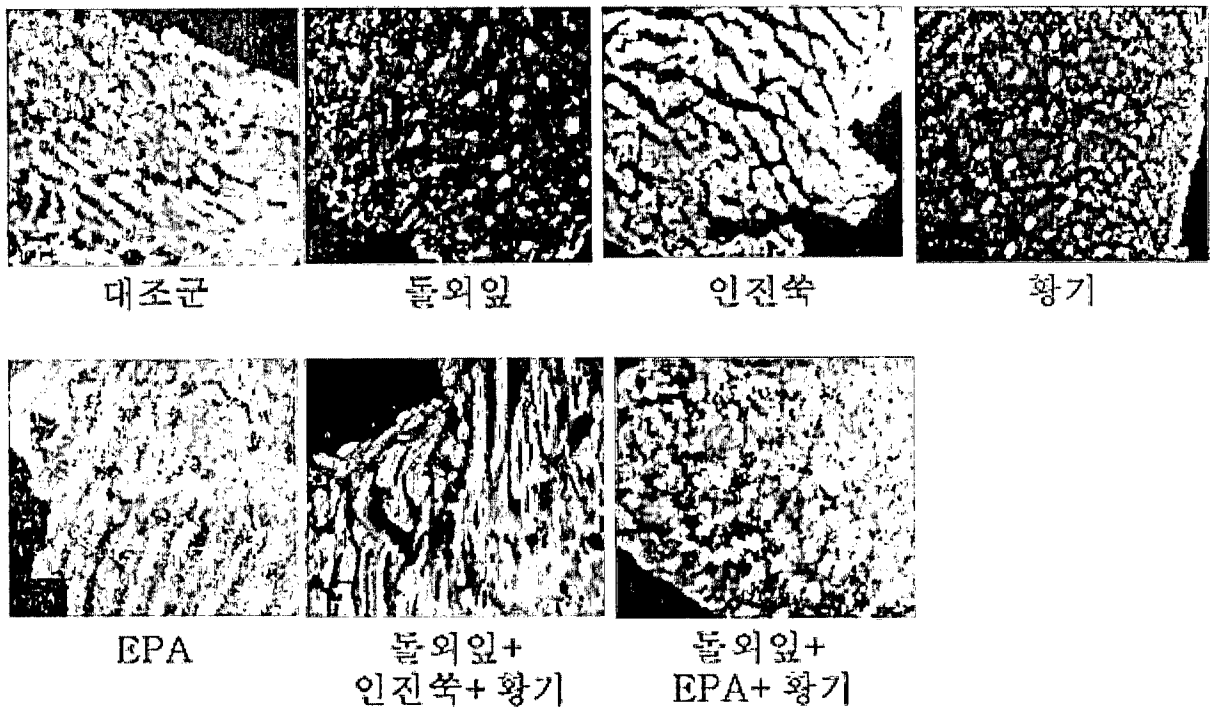
【도 8】



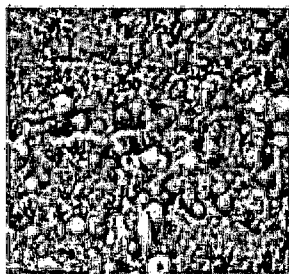
【도 9】



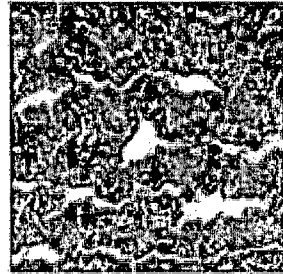
【도 10】



【도 11】



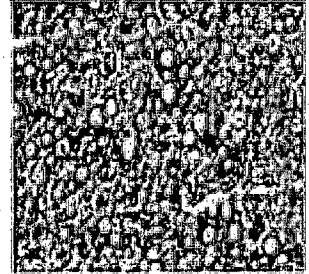
대조군



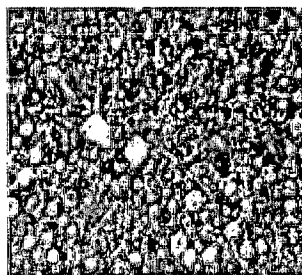
돌외잎



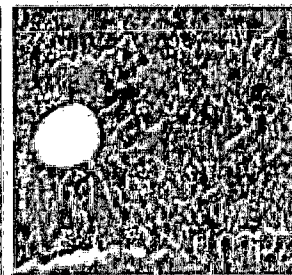
인진쑈



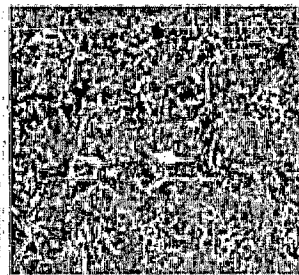
황기



EPA

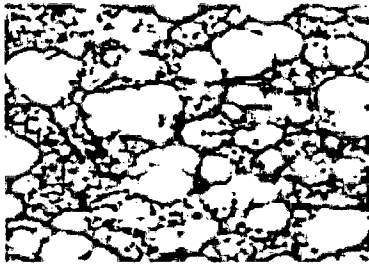


돌외잎+
인진쑈+ 황기

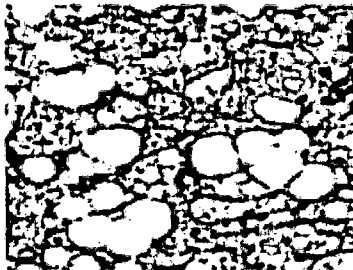


돌외잎+
EPA+ 황기

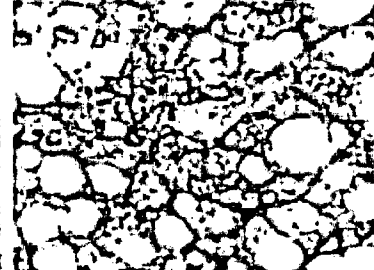
【도 12】



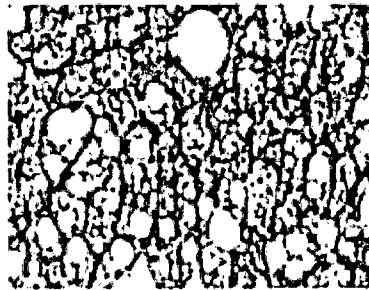
대조군



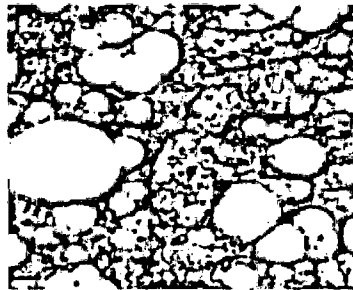
돌외잎 10%



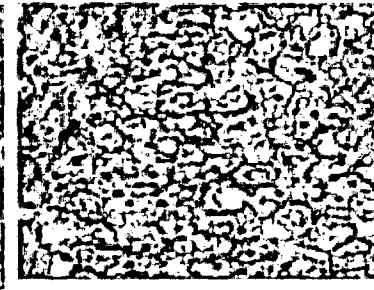
인진쑥 10%



황기 10%



EPA 10%



10% DMSO +
10% DMSO + 10% DMSO



10% DMSO +
EPA + 10% DMSO

【도 13】

