(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0097442
(43) 공개일자 2015년08월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/015 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01) *A61K 31/702* (2006.01)
A61K 36/344 (2006.01)
(52) CPC특허분류(Coo. Cl.)
A61K 31/015 (2013.01)
A23L 1/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0105809(분할)
(22) 출원일자 2015년07월27일
심사청구일자 2015년07월27일
(62) 원출원 특허 10-2014-0018396
원출원일자 2014년02월18일
심사청구일자 2014년02월18일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
한명주
서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)
김동현
서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)
정자용
서울특별시 동대문구 사가정로 65, 213동 902호 (래미안 크레시티)
(74) 대리인
고영갑, 권정기, 임상엽

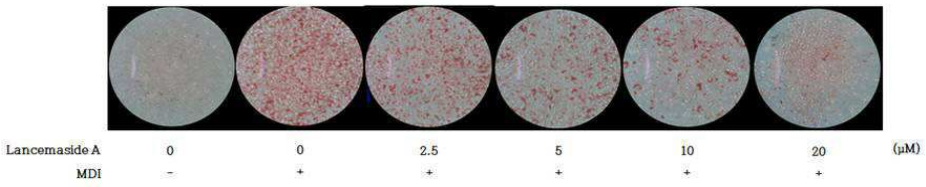
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **발효 더덕 추출물 또는 더덕으로부터 분리된 화합물을 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 발효 더덕 추출물, 란세마사이드 A(lancemaside A), 에키노사이스틱산(echinocystic acid) 및 이들의 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 유효 성분으로 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 발효 더덕 추출물, 란세마사이드 A(lancemaside A), 에키노사이스틱산(echinocystic acid) 등은 약학 조성물 또는 기능성 식품 조성물을 구성하는 식의약적 소재로 사용될 수 있다. 특히, 본 발명에 따른 란세마사이드 A(lancemaside A), 에키노사이스틱산(echinocystic acid)은 AMPK(AMP-activated protein kinase)를 활성화시키고 지방합성 관련 유전자의 발현을 하향 조절시키기 때문에 전구지방세포의 지방세포로의 분화시 분화를 억제하는 효과 및 중성지질의 축적을 억제하는 효과가 우수하다.

대 표 도 - 도19



(52) CPC특허분류(Coo. Cl.)
A23L 1/3002 (2013.01)
A61K 31/70 (2013.01)
A61K 31/702 (2013.01)
A61K 36/344 (2013.01)
A23V 2200/326 (2013.01)
A23V 2200/332 (2013.01)

특허청구의 범위

청구항 1

란세마사이드 A(lancemaside A), 에키노사이스틱산(echinocystic acid) 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염에서 선택되는 1종 이상을 유효 성분으로 포함하는 조성물로서,

비만, 지방간, 제2형 당뇨, 고지혈증, 심혈관 질환, 동맥경화증 또는 상기 질환들이 동시다발적으로 발생하는 지질 관련 대사증후군을 예방 또는 치료하기 위한 용도로 사용되는 것을 특징으로 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 란세마사이드 A(lancemaside A) 또는 에키노사이스틱산(echinocystic acid)은 더덕으로부터 분리된 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

란세마사이드 A(lancemaside A), 에키노사이스틱산(echinocystic acid) 또는 이들의 식품학적으로 허용가능한 염에서 선택되는 1종 이상을 유효 성분으로 포함하는 조성물로서,

비만, 지방간, 제2형 당뇨, 고지혈증, 심혈관 질환, 동맥경화증 또는 상기 질환들이 동시다발적으로 발생하는 지질 관련 대사증후군을 예방 또는 개선하기 위한 용도로 사용되는 것을 특징으로 식품 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 조성물은 식품학적으로 허용가능한 담체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 란세마사이드 A(lancemaside A) 또는 에키노사이스틱산(echinocystic acid)은 더덕으로부터 분리된 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 발효 더덕 추출물 또는 더덕으로부터 분리된 화합물의 신규 용도에 관한 것으로서, 더 상세하게는 발효 더덕 추출물 또는 더덕으로부터 분리된 화합물을 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인류가 풍요로운 사회로 점점 발전해 감에 따라 비만이 심각한 질병 중의 하나로 등장하게 되었고 이에 세계보건기구(WHO)는 비만을 치료해야 할 질병의 대상이라고 선언하였다. 비만은 열량의 섭취와 소비의 불균형으로 발생되는 대사성 질환이며, 형태학적으로 볼 때 체내 지방 세포의 크기 증가(hypertrophy) 또는 수의 증가

(hyperplasia)에 의해 초래된다. 비만은 서구사회에서 가장 흔한 영양장애일 뿐만 아니라, 최근 우리나라에서도 경제발전에 의한 식생활의 향상과 생활 방식의 서구화로 비만의 빈도가 급속히 증가하는 추세에 있어서 그 치료와 예방에 대한 중요성이 크게 부각되고 있다. 비만은 심리적으로 개인을 위축시킬 뿐만 아니라 사회적으로도 여러 가지 성인병의 발병 위험을 증가시키는 중요한 요인이다. 비만이 2형 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 심질환 등 여러 가지 성인병의 유병율 증가와 직접적인 관련이 있다고 알려져 있으며(Cell 87:377, 1999), 비만과 관련된 질환들을 함께 묶어서 대사증후군(metabolic syndrome) 또는 인슐린 저항성 증후군(insulin resistance syndrome)이라고 하며, 이들이 동맥경화증 및 심혈관질환의 원인으로 밝혀지고 있다. 이처럼 비만이 다양한 대사성 질환의 발병률을 증가시키고 실제 체중감소가 이러한 질환의 발병률을 현격히 감소시킨다는 사실로부터 지방을 많이 함유하는 지방세포가 이러한 현상을 매개할 것이라고 유추해 볼 수 있다.

[0003] 과거에는 지방 조직은 과다한 에너지를 트리글리세롤(triacylglycerol)의 형태로 저장하고 필요할 때 방출하는 에너지 저장 기관으로만 생각되었으나, 최근에는 지방 조직이 아디포넥틴(adiponectin), 렙틴(leptin) 및 레지스틴(resistin) 등 여러 가지 아디포카인(adipokine)들을 분비하여 에너지의 항상성(homeostasis)을 조절하는 중요한 내분비 기관으로 받아들여지고 있다(Trends Endocrinol Metab 13:18, 2002). 따라서 지방 세포의 증식과 지방세포에서 분비되는 물질들에 대한 이해와 그 생체 내 조절 메카니즘에 대한 규명이 비만 및 그로 인한 여러 가지 질병들을 이해하고 효과적인 치료제를 개발할 수 있는 밑거름이 될 것으로 여겨지고 있고 이에 따라 지방세포 분화 조절에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 비만 환자에서의 증가한 지방세포의 유래와 관련하여 체내의 전구지방세포(preadipocytes)로부터 분화된다는 것이 가장 주된 기전으로 받아들여지고 있다. 전구지방세포의 지방세포로의 분화 과정은 3T3-L1과 같은 세포를 이용하여 연구되어 왔으며, 여러 종류의 전사인자(transcription factor)들, 특히 지방화에 관여하는 것으로 알려진 전사인자, C/EBPs(CAAT enhancer binding proteins), PPARs(Peroxisome Proliferator Activated receptor)와 ADD/SREBPs(Adipocyte determination and differentiation dependent factor1/sterol response element binding proteins) 등이 시간의 차이에 따라 발현하며 그 과정을 조절한다는 것이 알려져 있다(Bart A Jessen et al., Gene, 299, pp95-100, 2002; Darlington et al., J . Biol. Chem., 273, pp30057-30060, 1998; Brun R.P et al., Curr. Opin.Cell. Biol., 8, pp826-832, 1996). MDI(isobutylmethylxanthin, dexamethasone and insulin)와 같은 호르몬의 자극이 주어질 때, C/EBP β와 δ가 가장 먼저, 일시적으로 발현되며, 지방세포로의 분화를 개시하게 한다(Reusch J. E et al., Mol. Cell. Biol., 20, pp1008-1020, 2000). 이는 계속해서 C/EBP α와 PPARγ의 발현증가를 유도하게 된다(James M. N. et al., J. Nutr., 130, pp3122S-3126S, 2000). PPARγ는 특히 지방세포 분화에 중요한 전사인자로 알려져 있으며, 레티논산 X 수용체(retinoic acid X receptor) 단백질(RXR)과 이합체(dimer)를 형성한 뒤, 다양한 지방세포 유전자의 프로모터(promoter)에 존재하는 PPRE(peroxisome proliferator response elements)에 결합한다 (Tontonoz P.E et al., Genes Dev., 8, pp1224-1234, 1994 ; Hwang, C. S et al., Cell Dev. Biol., 13, pp873-877). PPARγ와 C/EBP α의 상호 작용이 성숙한 지방세포로의 분화에 매우 결정적인데, 이러한 전사인자들 및 지방세포 조절 인자들에 의해 지방세포로의 분화가 촉진되고, aP2(adipocyte fatty acid-binding protein 2)와 같은 지방세포 특이적 단백질 및 Fas(fatty acid synthase)와 같은 지방 대사 효소의 발현량이 증가한다. 더불어 ADD1/SREBPs는 지방 대사에도 중요한 역할을 하지만, 또한 분화과정에도 관여하는 것으로 알려졌다. 미성숙 지방세포에서 ADD1/SREBP1c가 발현되는 것은 PPARγ의 활성화에 기여하는 것으로 여겨진다(Rosen E.D. et al., Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 16, pp145-171, 2000; Osborn T.F., J. Biol. Chem., 275, pp32379-32382, 2000). 분화과정을 마친 지방세포만이 지방산(fatty acid)을 합성하고 중성지질(triglycerides)을 저장하게 된다. 따라서, 현재 연구 동향은 비만 및 지질 관련 대사성 질환을 예방 또는 치료하기 위한 방법으로서, 지방세포 분화에 관한 대사과정을 저해할 수 있는 물질을 탐색하는데 초점이 맞추어져 있다. 즉, 비만의 발생 기전에 의거하여 지방세포 조절을 통해 비만을 치료하려는 시도가 이루어지고 있으며, 이것은 지방 합성을 억제하거나 지방 분해 및 산화를 촉진하여 지방 양을 감소시키려는 것과 지방세포 분화를 억제하여 지방세포 수를 감소시키려는 것으로, 이들 과정을 매개하거나 조절하는 것으로 알려진 전사인자들이나 단백질 그리고 지방세포 분비 물질들(adipokines)을 새로운 비만치료제 개발의 표적으로 떠오르게 하였다. 실제로 지방세포 분화 전사인자인 PPAR(Peroxisome proliferator-activated receptor) 패밀리, 지방세포 분비 물질인 렙틴(leptin) 및 아디포넥틴 (adiponectin) 등은 많은 새로운 약제 개발의 표적이 되고 있다.

[0004] 현재까지 알려진 비만치료제로는 제니칼(Xenical, 로슈제약회사, 스위스), 리덕틸(Reductil, 에보트사, 미국), 엑소리제(Exolise, 아토파마, 프랑스) 등으로 크게 식욕억제제, 에너지소비 촉진제, 지방흡수억제제로 분류되며, 대부분의 비만치료제는 시상하부와 관련된 신경전달물질을 조절함으로써 식욕을 억제하는 식욕억제제이다. 그러나 종래의 치료제들은 심장질환, 호흡기질환, 신경계질환 등의 부작용과 함께 그 효능의 지속성도 낮아, 더욱 개선된 비만치료제의 개발이 필요하고 또한, 현재 개발되고 있는 제품도 부작용없이 만족할 만한 치료

효과를 가지는 치료제는 거의 없어 새로운 비만치료제의 개발이 요구되고 있다.

[0005] 한편, 더덕(*Codonopsis lanceolata*)은 쌍떡잎식물 합판화군 초롱꽃과의 여러해살이 덩굴식물로서, 그 뿌리를 말린 것을 일명 사삼(沙蔘)이라고 부른다. 한방에서 사삼은 치열(治熱), 거담(祛痰) 및 폐열(肺熱) 제거 등에 사용된다. 더덕으로부터 분리된 화합물의 생리활성과 관련하여, 대한민국공개특허공보 제10-2007-0017540호에는 란세마사이드 A를 함유하는 혈중 테스토스테론 저하 억제제가 개시되어 있고, 대한민국등록특허공보 제10-1267693호에는 란세마사이드 A(lancemaside A) 또는 에키노사이스틱산(echinocystic acid)을 유효성분으로 함유하는 면역결핍바이러스의 치료 또는 예방용 조성물이 개시되어 있고, 대한민국공개특허공보 제10-2012-0031202호에는 에키노사이스틱산(echinocystic acid)을 유효성분으로 함유하는 대장염 예방 또는 치료용 조성물이 개시되어 있고, 대한민국공개특허공보 제10-2011-0080697호에는 올레아놀릭산을 함유하는 지방전구세포 분화 및 지방축적 억제용 조성물이 개시되어 있고, 다른 문헌 등에서 란세마사이드 A(lancemaside A)의 대장염 개선 효과(조은하, 경희대학교 석사 학위논문, 2010), 란세마사이드 A(lancemaside A)와 에키노사이스틱산(echinocystic acid)의 기억력 보호 효과(정일훈, 경희대학교 석사 학위논문, 2013) 등이 보고되고 있다. 또한, 다른 문헌 등에서 더덕 추출물의 항비만 효과 등이 개시되어 있으나, 더덕 추출물 자체를 항비만용 의약품으로 이용하기에는 한계가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 종래의 기술적 배경하에서 도출된 것으로, 본 발명의 일 목적은 발효 더덕 추출물의 신규 용도를 제공하는 것이고, 구체적으로는 발효 더덕 추출물의 비만 또는 비만 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료에 관한 용도를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 더덕으로부터 분리된 화합물의 신규 용도를 제공하는 것이고, 구체적으로는 더덕으로부터 분리된 화합물의 비만 또는 비만 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료에 관한 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 발명자들은 합성 화학물질에 비해 안전성이 확보된 수많은 약용 작물의 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 대상으로 비만에 대한 예방 또는 치료 활성을 갖는 추출물을 개발하기 위하여 연구를 수행하였다. 그 결과, 발효 더덕의 추출물 또는 더덕으로부터 분리된 란세마사이드 A(lancemaside A)가 비만 유도 모델동물에 대해 우수한 비만 예방 또는 치료 효과를 가진다는 점을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 본 발명의 일 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 발효 더덕 추출물을 유효성분으로 포함하고, 상기 발효 더덕 추출물은 더덕을 바실러스속 미생물로 발효시킨 산물의 추출물 또는 더덕 추출물을 바실러스속 미생물로 발효시킨 산물이고, 상기 바실러스속 미생물은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 코아귤란스(*Bacillus coagulans*) 또는 이들의 혼합균에서 선택되는 것을 특징으로 하는 비만 또는 비만 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 상기 비만 또는 비만 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 바람직하게는 약학 조성물 또는 식품 조성물이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 란세마사이드 A(lancemaside A), 에키노사이스틱산(echinocystic acid) 및 이들의 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 유효 성분으로 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환의 예방 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 상기 비만 또는 비만 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 바람직하게는 약학 조성물 또는 식품 조성물이다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따른 발효 더덕 추출물, 란세마사이드 A(lancemaside A), 에키노사이스틱산(echinocystic acid) 등은 약학 조성물 또는 기능성 식품 조성물을 구성하는 식의약적 소재로 사용될 수 있다. 특히, 본 발명에 따른 란세마사이드 A(lancemaside A), 에키노사이스틱산(echinocystic acid)은 AMPK(AMP-activated protein kinase)를 활성화시키고 지방합성 관련 유전자의 발현을 하향 조절시키기 때문에 전구지방세포의 지방세포로의 분화시 분화를 억제하는 효과 및 중성지질의 축적을 억제하는 효과가 우수하다. 따라서, 본 발명에 따른 발효 더덕 추출물, 란세마사이드 A(lancemaside A), 에키노사이스틱산(echinocystic acid) 등은 비만, 지방간, 제2형 당

뇨, 고지혈증, 심혈관 질환, 동맥경화증 및 지질 관련 대사증후군과 같은 질환을 예방, 개선 또는 치료하는데에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 란세마사이드 A(lancemaside A)의 화학 구조식을 나타낸 것이다.

도 2는 에키노사이스틱산(echinocystic acid)의 화학 구조식을 나타낸 것이다.

도 3은 더덕으로부터 란세마사이드 A(lancemaside A)를 분리하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 4는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 체중 변화에 대해 더덕 추출물이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다.

도 5는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 체중 변화에 대해 란세마사이드 A가 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다.

도 6, 도 7, 도 8, 도 9, 도 10 및 도 11은 각각 순서대로 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 간, 피하 지방조직, 부고환 지방조직, 신장주변 지방조직, 장간막 지방조직 및 갈색 지방조직의 무게에 대해 란세마사이드 A가 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다.

도 12는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 경구 글루코오스 부하시험에 대해 란세마사이드 A가 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이고, 도 13은 도 12의 경구 글루코오스 부하시험 결과를 AUC(area under the glucose-time curve)로 나타낸 그래프이다.

도 14는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물에 대해 란세마사이드 A가 미치는 영향을 알아보기 위해 간 조직 내 p-AMPK 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯(Western blot) 분석 방법으로 측정한 결과 및 이를 정상 식이군의 단백질 발현량에 대한 배수로 나타낸 그래프이다.

도 15는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물에 대해 란세마사이드 A가 미치는 영향을 알아보기 위해 간 조직 내 PPARγ, C/EBPα, FAS 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯(Western blot) 분석 방법으로 측정한 결과 및 이를 정상 식이군의 단백질 발현량에 대한 배수로 나타낸 그래프이다.

도 16은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물에 란세마사이드 A를 투여하였을 때 간 조직 내 SREBP-1c, FABP4, ACC, SCD1 및 LPL의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 도 17은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물에 란세마사이드 A를 투여하였을 때 간 조직 내 MCAD, HSL 및 ATGL의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 18은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물에 란세마사이드 A를 투여하였을 때 부고환 지방조직 내 PPARγ, C/EBPα, SREBP-1c, FAS, FABP4, ACC, SCD1 및 LPL의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 19는 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A가 분화 형태에 미치는 영향을 관찰한 오일레드 O 염색 사진이다.

도 20은 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A가 분화된 지방세포 내의 중성지질 함량에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 21은 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 PPARγ 단백질 수준 변화에 미치는 영향을 웨스턴 블롯(Western blot) 분석 방법으로 측정한 결과 및 이를 정량적으로 나타낸 그래프이다.

도 22는 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 C/EBPα 단백질 수준 변화에 미치는 영향을 웨스턴 블롯(Western blot) 분석 방법으로 측정한 결과 및 이를 정량적으로 나타낸 그래프이다.

도 23은 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 FAS 단백질 수준 변화에 미치는 영향을 웨스턴 블롯(Western blot) 분석 방법으로 측정한 결과 및 이를 정량적으로 나타낸 그래프이다.

도 24는 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 p-AMPk 단백질 수준 변화에 미치는 영향을 웨스턴 블롯(Western blot) 분석 방법으로 측정한 결과 및 이를 정량적으로 나타낸 그래프이다.

도 25는 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 p-AMC 단백질 수준 변화에 미치는 영향을 웨스턴 블롯(Western blot) 분석 방법으로 측정한 결과 및 이를 정량적으로 나타낸 그래프이다.

도 26은 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 PPARγ의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 도 27은 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 C/EBPα의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 도 28은 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 SREBP-1c의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 도 29는 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 FAS의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 도 30은 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 FABP4의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 도 31은 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 ACC의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 도 32는 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 SCD1의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 도 33은 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 LPL의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 도 34는 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 Leptin의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 도 35는 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 CPT1의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.

[0015] 본 발명에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용가능한" 및 "식품학적으로 허용가능한"이란 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 활성 물질의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 것을 의미한다.

[0016] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환(예를 들어, 대장염)의 증상을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0017] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환(예를 들어, 대장염)의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.

[0018] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0019] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 이때, 개체는 본 발명의 조성물을 투여하여 특정 질환의 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.

[0020] 본 발명에서 사용되는 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜 또는 위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 이는 개체의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0022] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0023] 본 발명의 일 측면은 발효 더덕 추출물의 신규 용도에 관한 것으로서, 본 발명은 발효 더덕 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명의 상기 발효 더덕 추출물은 다양한 방법으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 더덕을 바실러스속 특정 미생물로 발효시킨 산물로부터 추출물을 얻은 방법 또는 더덕 추출물을 바실러스속 특정 미생물로 발효시키는 방법 등이 있다. 이때, 상기 바실러스속 특정 미생물은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 코아귤란스(*Bacillus coagulans*) 또는 이들의 혼합균에서 선택된다. 또한, 본 발명의 발효 더덕 추출물을 얻기 위해 원료로 더덕의 다양한 기관 또는 부분, 예를 들어 잎, 꽃, 뿌리, 줄기, 뿌리줄기, 열매, 종자 등을 사용할 수 있으며, 이 중 더덕 뿌리를 사용하는 것이 바람직하다. 한편, 더덕으로부터 발효 더덕 추출물을 얻기 위해서는 추출 과정이 필요한데, 이때 추출 방법으로는 당업계에 공지된 통상의 추출 방법, 예를 들어 용매 추출법을 사용할 수 있다. 용매 추출법을 이용하여 발효 더덕 추출물을 제조할 때 사용될 수 있는 추출 용매는 물, 탄소 수가 1 내지 4인 저급 알코올(예를 들면, 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올) 또는 이들의 혼합물인 함수 저급 알코올, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 글리세린, 아세톤, 디에틸에테르, 에틸 아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄, 클로로포름, 헥산 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 이중 물, 알코올 또는

이들의 혼합물에서 선택되는 것이 바람직하다. 추출 용매로 물을 사용하는 경우 물은 열수인 것이 바람직하다. 또한, 추출 용매로 알코올을 사용하는 경우 알코올은 탄소 수가 1 내지 4인 저급 알코올인 것이 바람직하고, 저급 알코올은 메탄올 또는 에탄올에서 선택되는 것이 더 바람직하다. 또한, 추출 용매로 함수 알코올을 사용하는 경우 알코올 함량은 50~90%인 것이 바람직하다. 한편, 발효 더덕 추출물은 상기 추출 용매뿐만 아니라, 다른 추출 용매를 이용하여도 실질적으로 동일한 효과를 나타내는 추출물이 얻어질 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 것이다. 예컨대, 이산화탄소에 의한 감압, 고온에 의한 초임계 추출법에 의한 추출, 초음파를 이용한 추출법에 의한 추출, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 이용한 분리, 다양한 크로마토그래피 (크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)를 이용한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 및 추출 방법을 통해 얻어진 활성 분획도 본 발명의 추출물에 포함된다. 상기 이산화탄소에 의한 감압, 고온에 의한 초임계 추출법에 의한 추출법은 초임계 유체 추출법(supercritical fluid extraction)을 의미하는 것으로, 일반적으로 초임계 유체는 기체가 고온 고압 조건에서 임계점에 도달하였을 때 갖는 액체 및 기체의 성질을 지니고 있으며, 화학적으로 비극성 용매와 유사한 극성을 지니고 있으며 이러한 특성으로 인해 초임계 유체는 지용성 물질의 추출에 사용되고 있다(J. Chromatogr. A. 1998;479:200-205). 이산화탄소는 초임계 유체기기의 작동으로 압력 및 온도가 임계점까지 이르는 과정을 거치면서 액체 및 기체 성질을 동시에 지닌 초임계 유체가 되고 그 결과 지용성 용질에 대한 용해도가 증가한다. 초임계 이산화탄소가 일정량의 시료를 함유한 추출 용기를 통과하게 되면 시료에 함유된 지용성 물질은 초임계 이산화탄소에 추출되어 나온다. 지용성 물질을 추출한 후 추출 용기에 남아있는 시료에 다시 소량의 공용매가 함유된 초임계 이산화탄소를 흘려 통과시키면 순수한 초임계 이산화탄소만으로는 추출되지 않았던 성분들이 추출되어 나오게 할 수 있다. 본 발명의 초임계추출법에 사용되는 초임계 유체는 초임계 이산화탄소 또는 이산화탄소에 추가적으로 공용매를 혼합한 혼합유체를 사용함으로써 효과적으로 유효 성분을 추출할 수 있다. 이러한 공용매는 클로로포름, 에탄올, 메탄올, 물, 에틸아세테이트, 헥산 및 디에틸에테르로 이루어진 군에서 선택되는 1종 또는 2종 이상의 혼합물을 사용할 수 있다. 추출된 시료는 대부분 이산화탄소를 함유하고 있는데 이산화탄소는 실온에서 공기 중으로 휘발되므로 상기 방법으로 얻은 추출물을 화장료 조성물로서 사용할 수 있으며, 공용매는 감압증발기로 제거할 수 있다. 또한, 상기 초음파 추출법은 초음파 진동에 의해 발생되는 에너지를 이용하는 추출방법으로, 초음파가 수용성 용매 속에서 시료에 포함된 불용성인 용매를 파괴시킬 수 있으며, 이때 발생되는 높은 국부온도로 인하여 주위에 위치하는 반응물 입자들의 운동에너지를 크게 하기 때문에 반응에 필요한 충분한 에너지를 얻게 되고, 초음파 에너지의 충격효과로 높은 압력을 유도하여 시료에 함유된 물질과 용매의 혼합 효과를 높여주어 추출효율을 증가시키게 된다. 초음파 추출법에 사용할 수 있는 추출용매는 클로로포름, 에탄올, 메탄올, 물, 에틸아세테이트, 헥산 및 디에틸 에테르로 이루어진 군에서 선택되는 1종 또는 2종 이상의 혼합물을 사용할 수 있다. 추출된 시료는 진공 여과하여 여과액을 회수한 후 감압증발기로 제거하고, 동결 건조하는 통상의 추출물 제조방법을 통해 추출물을 얻을 수 있다.

[0025] 본 발명에 따른 발효 더덕 추출물은 다양한 활성 물질을 포함하는데, 예를 들어 란세마사이드 A(lancemaside A) 또는 에키노사이스틱산(echinocystic acid)을 포함한다. 다만, 상기 발효 더덕 추출물의 활성 성분은 추출방법에 따라 구체적인 성분의 종류나 함량에 약간의 차이가 발생할 수 있다.

[0026] 본 발명에 따른 발효 더덕 추출물은 비만 또는 비만 관련 질환을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 유효성분으로 사용할 수 있다. 상기 비만 관련 질환은 비만에 의해 유발되거나 비만과 상관 관계가 높은 질환이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 지방간, 제2형 당뇨, 고지혈증, 심혈관 질환, 동맥경화증 및 지질 관련 대사증후군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 또한, 상기 지질 관련 대사증후군은 당뇨, 비만 등 여러 가지 대사성 질환이 한 사람에게 동시에 나타나는 질환을 의미한다.

[0027] 본 발명의 발효 더덕 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 사용 목적 내지 양상에 따라 약학 조성물, 식품 첨가제, 식품 조성물(특히 기능성 식품 조성물), 또는 사료 첨가제 등으로 구체화될 수 있고, 조성물 내에서 발효 더덕 추출물의 함량도 조성물의 구체적인 형태, 사용 목적 내지 양상에 따라 다양한 범위에서 조정될 수 있다.

[0029] 본 발명의 다른 측면은 란세마사이드 A(lancemaside A) 등의 신규 용도에 관한 것으로서, 본 발명은 란세마사이드 A(lancemaside A), 에키노사이스틱산(echinocystic acid) 및 이들의 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 유효 성분으로 포함하는 비만 또는 비만 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0030] 상기 란세마사이드 A는 에키노사이스틱산을 아글리콘(aglycone)으로 포함하는 배당체로서, 도 1의 화학 구조식

을 가진다. 한편, 에키노사이스틱산은 도 2의 화학 구조식을 가지며, 란세마사이드 A의 생리학적 활성을 지배하는 것으로 알려져 있다. 이 때문에 란세마사이드 A와 에키노사이스틱산은 항암, 항바이러스, 항염 등과 같이 동일한 기능성을 갖는 것으로 보고되고 있다(대한민국 등록특허공보 제10-1267693호, 대한민국 공개특허공보 제10-2012-0031202호 참조). 따라서, 당해 발명의 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 란세마사이드 A의 항비만 활성으로부터 에키노사이스틱산의 항비만 활성을 예측하는 것은 자명하다 할 것이다. 상기 란세마사이드 A와 에키노사이스틱산은 더덕 등과 같은 식물에서 분리될 수 있으며, 화학적으로도 합성할 수 있고, 상업적으로 판매하기도 한다. 예를 들어, 더덕을 특정 미생물로 발효시킨 후 알코올 등으로 추출하면 란세마사이드 A와 에키노사이스틱산이 모두 함유된 추출물을 얻을 수 있고, 이로부터 란세마사이드 A와 에키노사이스틱산을 분리할 수 있다. 더덕으로부터 란세마사이드 A를 분리하는 일 예는 도 3에 도시되어 있다.

[0031] 본 발명에서 약학 또는 식품학적으로 허용가능한 염으로는 유리산 (free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수혼화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알콜 (예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다. 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 메탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산 (maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산 (propionic acid), 젖산 (lactic acid), 글리콜산 (glycollic acid), 글루콘산 (gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산 (glutaric acid), 글루쿠론산 (glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르빈산, 카본산, 바닐릭산, 히드로 아이오딕산 등을 사용할 수 있다. 또한, 염기를 사용하여 약학 또는 식품학적으로 허용 가능한 금속염을 제조할 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토 금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염 (예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0032] 본 발명의 란세마사이드 A(lancemaside A), 에키노사이스틱산(echinocystic acid) 또는 이들의 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염은 AMPK(AMP-activated protein kinase)의 인산화 또는 ACC(acetyl-CoA carboxylase)의 인산화를 통해 지방세포로의 분화 또는 지질 대사를 조절할 수 있다. AMPK(AMP-activated protein kinase)는 최근 항비만 물질 개발을 위한 신규 타겟으로 주목받고 있다. AMPK는 세포내 AMP(Adenosine Mono-Phosphate)를 감지하여 활성화되는 단백질로서 ATP를 소모하는 신호전달경로를 억제하는 반면 ATP를 합성하는 신호전달경로는 활성화하여 외부 스트레스로부터 세포를 보호하는 역할을 한다. AMPK의 활성을 증가시키는 물질은 ATP(Adenosine Tri-Phosphate) 합성촉진, 글루코스 흡수의 증가, 지방의 β-산화(oxidation) 촉진, 콜레스테롤 합성 저해, 염증 반응 완화 등의 효과가 있는 것으로 보고되고 있어 비만을 포함한 당뇨, 인슐린 저항성, 고지혈증, 염증 등 대사성 질환 치료제 개발을 위한 약물 표적으로 활용되고 있다. AMPK는 세포 내 ATP 농도 감지 역할을 하는 인산화 효소로서 세포내의 에너지 균형을 유지하는데 매우 중요한 효소로서, 대부분 세포내 생합성(ATP 소비 과정)에 의해 증가되거나, 운동 등으로 인한 급격한 ATP 소비에 의하여 증가된 AMP:ATP 비율에 의해 활성화 되어 ATP 생성 과정을 유도되는 것으로 알려져 있다. 활성화된 AMPK는 몇몇 하위 단계에 있는 기질을 인산화하여 지방 합성이나 콜레스테롤 합성과 같은 ATP-소비 경로를 차단하고 지방산 산화나 당분해와 같은 ATP-생성 경로를 활성화시키는 것으로 알려져 있다(D.G. Hardie et al., FEBS Lett., 546, pp113-120, 2003; D. Carling, Trends Biochem. Sci., 29, pp18-24, 2004) 지질대사와 관련되어 AMPK의 중요한 조절기작은 단백질 인산화를 통해 아세틸-CoA 카르복실라제(Acetyl-CoA carboxylase, ACC)란 효소의 활성을 억제하는 것이다. ACC는 간과 근육 등 여러 조직에서 지질대사를 조절하는 중요한 효소로 아세틸-CoA를 말로닐-CoA로 탄산화시키는 작용을 하며(B.E. Kemp, Biochem. Soc. Trans., 31, pp162-168, 2003), 말로닐-CoA는 미토콘드리아의 외막에 존재하는 CPT1(carnitine palmitoyl transferase 1)의 저해제로 작용하고, 이 CPT1의 활성은 미토콘드리아에서 일어나는 지방의 β-산화에 중요한 작용을 하고 있다(Lehninger, Principles of Biochemistry, Worth Publishers, NY, 3rd Ed., pp599-605, 2000; Cohen P., Miyazaki, M., Socci, N. D., Hagge-Greenberg, A., Liedtke, W., Soukas, A. A., Sharma, R., Hudgins, L. C., Ntambi, J. M. & Friedman, J. M., Science 297, 240-243, 2002). AMPK의 활성화에 의해 ACC의 인산화가 증진되어 효소 활성이 억제되면 말로닐-CoA의 생성량이 감소하게 되어 AMPK의 활성화가 유도되며(Vavvas D et al., J. Biol. Chem., 272, pp13255-13261, 1997) 지방산을 태우는 산화작용에 의해 ATP 생성량이 증가된다. 즉 AMPK 활성화에 따른 ACC의 인산화는 지방산 산화 증가 기전에 의한 체지방 감소에 중요하다. 따라서 지방산 합성초기에 ACC 효소 활성을 AMPK에 의해서 조절하면, 필

요 이상의 체내 지방 축적을 억제할 수 있게 되어, 결과적으로 체중 증가를 억제할 수 있다. 나아가 AMPK의 활성화에 의해 HMG-CoA 리덕타제 (고지혈증 치료제인 스타틴의 타겟분자)의 활성이 또한 억제되는데, 이것은 AMPK 활성화에 의해서 콜레스테롤의 합성도 간 조직에서 조절될 수 있음을 의미하는 것으로 혈중 중성지방과 콜레스테롤의 농도를 저하시키는 효과를 또한 얻을 수 있다. 따라서 AMPK가 활성화되면, 지방의 합성이 감소하는 동시에 β-산화가 증가하고 체내지방의 산화가 증가하여 체지방 감소로 인한 체중감소는 물론 혈중 중성지방과 콜레스테롤의 농도를 감소시킬 수 있다.

[0033] 또한, 본 발명의 란세마사이드 A(lancemaside A), 에키노사이스틱산(echinocystic acid) 또는 이들의 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염은 전구지방세포의 지방세포로의 분화시 PPARγ(peroxisome proliferator-activated receptor-γ), C/EBPα(CCAAT/enhancer-binding protein-α), FAS(fatty acid synthase)y acid synthase), SREBP-1c(sterol regulatory element binding protein-1c), FABP4(fatty acid binding protein 4), ACC(acetyl-CoA carboxylase), SCD1(stearoyl-CoA desaturase-1), LPL(lipoprotein lipase) 및 렙틴(Leptin)의 발현을 하향 조절하여 분화를 억제하거나 중성지질의 축적을 억제할 수 있다. 또한, 본 발명의 란세마사이드 A(lancemaside A), 에키노사이스틱산(echinocystic acid) 또는 이들의 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염은 전구지방세포의 지방세포로의 분화시 HSL(hormone sensitive lipase) 또는 CPT1(Carnitine palmitoyltransferase I)의 발현을 상향 조절하여 지방의 축적을 억제할 수 있다. 따라서, 본 발명의 란세마사이드 A(lancemaside A), 에키노사이스틱산(echinocystic acid) 또는 이들의 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염은 비만을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 유효성분으로 사용될 수 있고, 더 나아가 지방간, 제2형 당뇨, 고지혈증, 심혈관 질환, 동맥경화증 및 지질 관련 대사증후군으로 이루어진 군에서 선택되는 비만 관련 질환을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 유효성분으로 사용될 수 있다. 상기 지질 관련 대사증후군은 당뇨, 비만 등 여러 가지 대사성 질환이 한 사람에게 동시에 나타나는 질환을 의미한다.

[0034] 본 발명의 란세마사이드 A(lancemaside A), 에키노사이스틱산(echinocystic acid) 또는 이들의 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물은 사용 목적 내지 양상에 따라 약학 조성물, 식품 첨가제, 식품 조성물(특히 기능성 식품 조성물), 또는 사료 첨가제 등으로 구체화될 수 있고, 조성물 내에서 상기 유효성분의 함량도 조성물의 구체적인 형태, 사용 목적 내지 양상에 따라 다양한 범위에서 조정될 수 있다.

[0035] 본 발명에 따른 발효 더덕 추출물, 란세마사이드 A(lancemaside A), 에키노사이스틱산(echinocystic acid), 란세마사이드 A 또는 에키노사이스틱산의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물에서 상기 유효성분의 함량은 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 조성물 총 중량을 기준으로 0.01~99 중량%, 바람직하게는 0.5~50 중량%, 더 바람직하게는 1~30 중량%일 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 발효 더덕 추출물, 란세마사이드 A(lancemaside A), 에키노사이스틱산(echinocystic acid), 란세마사이드 A 또는 에키노사이스틱산의 약학적으로 허용 가능한 염 외에 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제와 같은 첨가제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 본 발명의 비만 또는 비만 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 발효 더덕 추출물, 란세마사이드 A(lancemaside A), 에키노사이스틱산(echinocystic acid), 란세마사이드 A 또는 에키노사이스틱산의 약학적으로 허용 가능한 염 외에 비만 또는 비만 관련 질환의 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 통상의 방법에 의해 경구 투여를 위한 제형 또는 비경구 투여를 위한 제형으로 제제화될 수 있고, 제제화할 경우 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개

시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 인간을 포함한 포유류에 경구 투여되거나 비경구 투여될 수 있으며, 비경구 투여 방식으로는 피부 외용, 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식 등이 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 약학적으로 유효한 양이라면 크게 제한되지 않으며, 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 약학 조성물의 통상적인 1일 투여량은 크게 제한되지 않으나 바람직하게는 유효성분인 발효 더덕 추출물, 란세마사이드 A(lancemaside A), 에키노사이스틱산(echinocystic acid), 란세마사이드 A 또는 에키노사이스틱산의 약학적으로 허용 가능한 염를 기준으로 할 때 0.1 내지 3000 ㎎/㎏이고, 더 바람직하게는 1 내지 2000 ㎎/㎏이며, 하루 1회 또는 수회로 나누어 투여될 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명의 발효 더덕 추출물, 란세마사이드 A(lancemaside A), 에키노사이스틱산(echinocystic acid), 란세마사이드 A 또는 에키노사이스틱산의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐, 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 구체적인 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다. 본 발명의 식품 조성물에서 발효 더덕 추출물, 란세마사이드 A(lancemaside A), 에키노사이스틱산(echinocystic acid), 란세마사이드 A 또는 에키노사이스틱산의 식품학적으로 허용 가능한 염과 같은 유효성분의 함량은 조성물 총 중량을 기준으로 0.01~50 중량%, 바람직하게는 0.1~25 중량%, 더 바람직하게는 0.5~10 중량%이나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 식품 조성물은 발효 더덕 추출물, 란세마사이드 A(lancemaside A), 에키노사이스틱산(echinocystic acid), 란세마사이드 A 또는 에키노사이스틱산의 식품학적으로 허용 가능한 염 외에 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 식품 조성물은 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 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분들은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 향미제로는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 향미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0038] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것 일뿐, 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.

[0040] **1. 더덕 추출물, 발효 더덕 추출물 및 이로부터 분리된 화합물의 제조**

[0042] 제조예 1 : 더덕 추출물의 제조

[0043] 건조 더덕 뿌리 분쇄물 3.5㎏에 80% 에탄올 수용액 35ℓ를 첨가하고 90℃에서 약 3시간 동안 환류냉각법으로 추출한 후, 여과지로 여과하여 추출액과 잔사를 분리하였다. 이후, 남은 잔사에 80% 에탄올 수용액 35ℓ를 첨가하고 동일한 방법으로 3회 반복 추출하여 추출액을 얻고, 이를 먼저 얻은 추출액과 합친 후, 감압 농축하여 약 263.54g의 더덕 추출물을 수득하였다.

[0045] 제조예 2 : 발효 더덕 추출물의 제조

[0046] 액상 TSB 배지(Tryptic Soy Broth) 5ℓ에 미생물자원센터(대한민국 대전광역시 유성구 과학로 125 한국생명공학연구원)에서 분양받은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) KCTC 1022와 바실러스 코아귤란스(*Bacillus coagulans*) KCTC 3625를 접종하고 약 24시간 동안 배양하였다. 이후, 배양액을 원심분리하여 배지를 제거하고 균체를 수득하였다. 이후, 건조 더덕 뿌리 분쇄물 500g을 물 5ℓ에 현탁하고, 여기에 균체를 접종한 후 약 72시간 동안 배양하여 더덕 발효 산물을 제조하였다. 이후, 더덕 발효 산물에 에탄올 5ℓ를 첨가하고, 90℃에서 약 2시간 동안 환류냉각법으로 추출한 후, 여과지로 여과하여 발효 더덕 추출액과 잔사를 분리하였다. 이후, 남은

잔사에 50% 에탄올 수용액 2ℓ를 첨가하고 90℃에서 약 1시간 동안 환류냉각법으로 추출하여 추출액을 얻고, 이를 먼저 얻은 추출액과 합친 후, 감압 농축하여 약 73.2g의 발효 더덕 추출물을 수득하였다.

[0048] 제조예 3 : 더덕으로부터 란세마사이드 A(lancemaside A)의 제조

[0049] 제조예 1에서 수득한 더덕 추출물을 증류수 0.4ℓ에 현탁하고, 여기에 n-부탄올 2ℓ를 첨가하고 진탕 방치하여 물 가용성 분획층과 n-부탄올 가용성 분획층으로 분리하였다. 이후, n-부탄올 가용성 분획층을 취하고 감압 농축하여 n-부탄올 가용성 분획물 약 104.02g을 수득하였다. 이후, 더덕 추출물의 n-부탄올 가용성 분획물에 대해 2개의 용출 용매(클로로포름:메탄올:물=120:35:10; 클로로포름:메탄올:물=90:35:10)로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Merck, 12㎝×60㎝, 63~200㎛)를 실시하여 4개의 소분획을 얻었다. 4개의 소분획 중 4번째 소분획(Fr. Ⅳ) 61.71g에 대해 20% 메탄올 수용액을 용출 용매로 하여 역상 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Merck, 7㎝×40㎝, 40~60㎛)를 실시하여 6개의 소분획을 얻었다. 6개의 소분획 중 5번째 소분획(Fr. Ⅳ-5)을 메탄올로 재결정하여 갈색 침상 결정 형태의 화합물 1(Compound 1) 720㎎을 얻었다. 화합물 1의 구조를 ^{1}H-NMR(Bruker, AVANCE digital 400) 및 ^{13}C-NMR(Bruker, AVANCE digital 400)로 분석한 결과, 도 1의 화학 구조식을 갖는 란세마사이드 A(lancemaside A)인 것으로 확인되었다.

[0050] <란세마사이드 A>

[0051] ^{1}H-NMR (600 ㎒, $C_{57}H_{90}O_{26}$) δ : 5.37 *s*, 5.37 *s*, 5.36 *s*, 5.36 *s*, 5.35 *s*, 5.03*d* (7.45), 4.8 *s*, 4.58*d* (4.57), 4.52 *s*, 4.52 *s*, 4.50 *s*, 4.50 *s*, 4.51 *s*, 4.41 *s*, 4.39 *s*, 4.37 *s*, 4.31 *s*, 4.27*dd* (2.65, 5.30), 4.21 *s*, 4.19 *s*, 4.16 *s*, 4.11 *m*, 4.02 *m*, 4.01 *m*, 4.01 *m*, 3.99 *m*, 3.92*d* (3.84), 3.64 *s*, 3.54 *m*, 3.41 *s*, 3.05*dd* (2.41, 2.03), 2.65 *s*, 2.30 *s*, 2.27 *s*, 2.24 *s*, 1.99 *s*, 1.93 *s*, 1.91 *s*, 1.89 *s*, 1.80 *s*, 1.79 *s*, 1.71 *s*, 1.68 *s*, 1.56 *s*, 1.42 *s*, 1.39 *s*, 1.39 *s*, 1.37 *s*, 1.36 *s*, 1.29 *s*, 1.28 *s*, 1.12 *s*, 1.03 *s*, 0.97 *s*, 0.96 *s*, 0.88 *s*, 0.80 *s*, 0.77 *s*.

[0052] ^{13}C-NMR (150 ㎒, $C_{57}H_{90}O_{26}$) δ : 175.9, 175.8, 143, 122.4, 105.5, 105, 104.8, 99.9, 92.5, 89.7, 86.2, 82.2, 76.4, 76.3, 74.4, 73.8, 73.6, 73.2, 71.9, 71, 70.7, 70.5, 70, 69.7, 69.5, 68.3, 67.5, 62.3, 55.8, 48.9, 47.1, 46.8, 46.2, 41.3, 40.7, 38.6, 38.4, 37.4, 36.4, 35.6, 35.5, 35.3, 34.9, 32.9, 32, 30.5, 29.9, 27.1, 26, 25.7, 23.8, 23.1, 18, 16.9, 16.6, 15.7, 14.8

[0054] **2. 더덕 추출물의 항비만 효능에 대한 in-vivo 실험**

[0055] (1) 실험 방법

[0056] 4주령 수컷 C57BL/6J mice 총 24 마리를 온도 20±2℃, 습도 50±5% 및 명암 주기(light-dark cycle) 12시간 단위의 사육실 환경하에서 chow diet(CD; Purina, Korea)로 1주간 적응시켰다. 이후, 실험동물을 2개의 그룹으로 나누어 정상 식이군(CON, n=6)에는 총 칼로리의 4.5%가 지방인 일반 식이를 7주간 공급하였고, 고지방 식이군(n=18)에는 총 칼로리의 60%가 지방인 고지방 식이(D12492, Research Diets, New Brunswick, NJ)를 7주간 공급하여 비만을 유도하였다. 이후, 비만이 유도된 고지방 식이군을 6마리씩 3개의 그룹(HF, HF+LCL, HF+HCL)으로 나눈 후, HF군에는 고지방 식이를 공급함과 동시에 증류수를 7주간 경구투여하였고, HF+LCL군 및 HF+HCL군에는 고지방 식이를 공급함과 동시에 제조예 1에서 수득한 더덕 추출물을 증류수에 녹여 다른 양으로 7주간 경구투여하였다. 또한, 정상 식이군에는 일반 식이를 공급함과 동시에 증류수를 7주간 경구투여하였다.

[0058] (2) 측정 항목 및 측정 결과

[0059] 전 실험기간 동안 매일 일정한 시각에 실험동물의 체중 및 식이 섭취량을 측정하였고, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다. 또한, 도 4는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 체중 변화에 대해 더덕 추출물이 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다.

표 1

[0060]

실험군	CON	HF	HF+LCL	HF+HCL
초기 체중(g)	24.5±0.8	26.9±0.4	27.1±0.4	27.0±0.4
최종 체중(g)	27.3±1.0	37.8±1.3	33.6±0.7	33.3±1.3
체중 증가량(g)	4.1±0.9	11.5±1.1	7.3±0.7	7.1±1.7
체중 증가율(%)	16.6±3.5	42.7±3.6	27.0±2.3	26.5±6.3
식이 섭취량(g)	4.1±0.1	2.9±0.01	3.1±0.1	2.9±0.02

[0061] * CON : 일반 식이 급여군

[0062] * HF : 고지방 식이 급여군

[0063] * HF+LCL : 고지방 식이 급여 및 1g/kg체중 용량의 더덕 추출물 투여군

[0064] * HF+HCL : 고지방 식이 급여 및 2.5g/kg체중 용량의 더덕 추출물 투여군

[0065] 상기 표 1에서 보이는 바와 같이 비만 유도 후 7주가 지났을 때 고지방 식이군의 체중이 정상 식이군보다 유의적으로 증가하였다. 한편, 고지방 식이 급여와 함께 더덕 추출물을 경구투여한 군은 고지방 식이만을 급여한 군에 비해 식이 섭취량은 큰 차이가 없었으나, 체중 증가량 및 체중 증가율이 낮게 나타났으며, 이로부터 더덕 추출물이 항비만 효능을 가짐을 알 수 있다.

[0067] **3. 발효 더덕 추출물의 항비만 효능에 대한 in-vivo 실험**

[0068] (1) 실험 방법

[0069] 4주령 수컷 C57BL/6J mice 총 24 마리를 온도 20±2℃, 습도 50±5% 및 명암 주기(light-dark cycle) 12시간 단위의 사육실 환경하에서 chow diet(CD; Purina, Korea)로 1주간 적응시켰다. 이후, 실험동물을 2개의 그룹으로 나누어 정상 식이군(CON, n=6)에는 총 칼로리의 4.5%가 지방인 일반 식이를 7주간 공급하였고, 고지방 식이군(n=18)에는 총 칼로리의 60%가 지방인 고지방 식이(D12492, Research Diets, New Brunswick, NJ)를 7주간 공급하여 비만을 유도하였다. 이후, 비만이 유도된 고지방 식이군을 6마리씩 3개의 그룹(HF, HF+LFCL, HF+HFCL)으로 나눈 후, HF군에는 고지방 식이를 공급함과 동시에 증류수를 7주간 경구투여하였고, HF+LFCL군 및 HF+HFCL군에는 고지방 식이를 공급함과 동시에 제조예 2에서 수득한 발효 더덕 추출물을 증류수에 녹여 다른 양으로 7주간 경구투여하였다. 또한, 정상 식이군에는 일반 식이를 공급함과 동시에 증류수를 7주간 경구투여하였다.

[0071] (2) 측정 항목 및 측정 결과

[0072] 전 실험기간 동안 매일 일정한 시각에 실험동물의 체중 및 식이 섭취량을 측정하였다. 식이 효율(feed efficiency ratio, FER)은 같은 기간 동안의 체중 증가량을 동일 기간의 식이 섭취량으로 나누어 계산하였다. 하기 표 2에 실험군에 따른 체중 변화, 식이 섭취량 및 식이 효율 측정 결과를 나타내었다.

표 2

[0073]

실험군	CON	HF	HF+LFCL	HF+HFCL
초기 체중(g)	25.2±0.5	28.8±0.7	29.1±0.7	29.7±1.1
최종 체중(g)	28.2±0.5	39.5±1.6	34.1±0.9	33.5±1.4
체중 증가량(g)	3.0±0.2	9.7±0.8	5.0±0.8	3.8±1.0
체중 증가율(%)	11.9±0.8	33.7±2.0	17.2±2.7	12.8±3.2
식이 섭취량(g)	3.5±0.1	2.8±0.1	2.7±0.1	2.9±0.02
식이 효율	0.02±0.001	0.06±0.004	0.03±0.006	0.02±0.008

[0074] * CON : 일반 식이 급여군

[0075] * HF : 고지방 식이 급여군

[0076] * HF+LFCL : 고지방 식이 급여 및 1g/kg체중 용량의 발효 더덕 추출물 투여군

[0077] * HF+HFCL : 고지방 식이 급여 및 2.5g/kg체중 용량의 발효 더덕 추출물 투여군

[0078] 상기 표 2에서 보이는 바와 같이 비만 유도 후 7주가 지났을 때 고지방 식이군의 체중이 정상 식이군보다 유의적으로 증가하였다. 한편, 고지방 식이 급여와 함께 발효 더덕 추출물을 경구투여한 군은 고지방 식이만을 급여한 군에 비해 식이 섭취량은 큰 차이가 없었으나, 체중 증가량 및 체중 증가율이 낮게 나타났으며, 이로부터 발효 더덕 추출물이 우수한 항비만 효능을 가짐을 알 수 있다. 또한, 제조예 2에서 수득한 발효 더덕 추출물의 항비만 효능은 제조예 1에서 수득한 더덕 추출물의 항비만 효능에 비해 동량의 투여량을 기준으로 약 35~50% 더 높은 것으로 나타났다.

[0080] **4. 란세마사이드 A(lancemaside A)의 항비만 효능에 대한 in-vivo 실험**

[0081] (1) 실험 방법

[0082] 4주령 수컷 C57BL/6J mice 총 36 마리를 온도 20±2℃, 습도 50±5% 및 명암 주기(light-dark cycle) 12시간 단위의 사육실 환경하에서 chow diet(CD; Purina, Korea)로 1주간 적응시켰다. 이후, 실험동물을 2개의 그룹으로 나누어 정상 식이군(CON, n=9)에는 총 칼로리의 4.5%가 지방인 일반 식이를 8주간 공급하였고, 고지방 식이군(n=27)에는 총 칼로리의 45%가 지방인 고지방 식이(D12451, Research Diets, New Brunswick, NJ)를 8주간 공급하여 비만을 유도하였다. 이후, 비만이 유도된 고지방 식이군을 9마리씩 3개의 그룹(HF, HF+LLA, HF+HLA)으로 나눈 후, HF군에는 고지방 식이를 공급함과 동시에 증류수를 9주간 경구투여하였고, HF+LLA군 및 HF+HLA군에는 고지방 식이를 공급함과 동시에 제조예 3에서 수득한 란세마사이드 A를 증류수에 녹여 다른 양으로 9주간 경구투여하였다. 또한, 정상 식이군에는 일반 식이를 공급함과 동시에 증류수를 9주간 경구투여하였다.

[0084] (2) 체중, 식이 섭취량 및 식이 효율 측정 방법 및 측정 결과

[0085] 전 실험기간 동안 매일 일정한 시각에 실험동물의 체중 및 식이 섭취량을 측정하였다. 식이 효율(feed efficiency ratio, FER)은 같은 기간 동안의 체중 증가량을 동일 기간의 식이 섭취량으로 나누어 계산하였다. 하기 표 3에 실험군에 따른 체중 변화, 식이 섭취량 및 식이 효율 측정 결과를 나타내었다. 또한, 도 5는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 체중 변화에 대해 란세마사이드 A가 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다.

표 3

[0086]

실험군	CON	HF	HF+LLA	HF+HLA
초기 체중(g)	25.4±0.6	29.9±0.8	29.4±0.8	29.8±1.0
최종 체중(g)	28.5±0.6	39.3±1.5	34.5±1.0	33.4±1.5
체중 증가량(g)	3.1±0.2	9.4±0.8	5.1±0.8	3.6±1.0
체중 증가율(%)	12.2±0.9	31.1±2.1	17.6±2.9	12.0±3.3
식이 섭취량(g)	3.6±0.1	2.8±0.1	2.6±0.1	2.9±0.02
식이 효율	0.02±0.001	0.06±0.005	0.03±0.007	0.02±0.009

[0087] * CON : 일반 식이 급여군

[0088] * HF : 고지방 식이 급여군

[0089] * HF+LLA : 고지방 식이 급여 및 10㎎/kg체중 용량의 란세마사이드 A 투여군

[0090] * HF+HLA : 고지방 식이 급여 및 20㎎/kg체중 용량의 란세마사이드 A 투여군

[0091] 상기 표 3에서 보이는 바와 같이 비만 유도 후 고지방 식이 급여와 함께 란세마사이드 A를 경구투여한 군의 경우 비만 유도 후 고지방 식이만을 급여한 군과 비교하였을 때 식이 섭취량은 큰 차이가 없었으나 체중 증가량, 체중 증가율 및 식이 효율은 매우 낮은 것으로 나타났다. 이로부터 란세마사이드 A가 매우 우수한 항비만 효능을 가짐을 알 수 있다.

[0093] (3) 간 및 지방조직의 무게 변화 측정

[0094] 비만을 유도하고 9주간 란세마사이드 A를 투여한 실험 동물을 심장천자(cardiac puncture)에 의해 희생시킨 후, 피하 지방조직(subcutaneous fat, SF), 부고환 지방조직(epididymal fat, EF), 신장주변 지방조직(perirenal fat, PF), 장간막 지방조직(mesenteric fat, MF), 갈색 지방조직(brown adipose tissue, BAT) 및 간을 적출하여 무게를 측정하였다.

[0095] 도 6, 도 7, 도 8, 도 9, 도 10 및 도 11은 각각 순서대로 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 간, 피하 지방조직, 부고환 지방조직, 신장주변 지방조직, 장간막 지방조직 및 갈색 지방조직의 무게에 대해 란세마사이드 A가 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이다. 도 6 내지 도 11에서 "CON"은 일반 식이를 급여한 정상 식이군을 나타내고, "HF"는 고지방 식이 급여군을 나타내고, "HF+LLA"는 고지방 식이 급여 및 10㎎/㎏체중 용량의 란세마사이드 A 투여군을 나타내고, "HF+HLA"는 고지방 식이 급여 및 20㎎/㎏체중 용량의 란세마사이드 A 투여군을 나타낸다. 도 6 내지 도 11에서 보이는 바와 같이 란세마사이드 A 투여군에서 모든 지방조직의 무게가 고지방 식이만을 급여한 군에 비해 유의적으로 감소하였다.

[0097] (4) 경구 글루코오스 부하시험(oral glucose tolerance test, OGTT)

[0098] 비만을 유도하고 9주간 란세마사이드 A를 투여한 실험 동물에 대해 경구 글루코오스 부하시험을 실시하였다. 실험 종료 후 실험 동물을 6시간 동안 금식시키고, 글루코오스를 2g/㎏체중 용량으로 경구투여한 후 0분, 15분, 30분, 60분, 90분 및 120분 경과시에 꼬리로부터 채혈하고 글루코오스 농도를 측정하였다. 경구 글루코오스 부하시험을 하는 동안 실험 동물에게 안정된 환경을 제공하였고, 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 또한, 하기 공식을 이용하여 AUC(area under the glucose-time curve)를 구하였다.

[0099] $AUC = 0.5\times(0.5\times C0+C15+C30+C60+C90+0.5\times C120)$

[0100] 상기 식에서 C0, C15, C30, C60, C90 및 C120은 각각 순서대로 0분, 15분, 30분, 60분, 90분 및 120분 경과시에 측정한 글루코오스 농도이다.

[0101] 도 12는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물의 경구 글루코오스 부하시험에 대해 란세마사이드 A가 미치는 영향을 실험군별로 나타낸 그래프이고, 도 13은 도 12의 경구 글루코오스 부하시험 결과를 AUC(area under the glucose-time curve)로 나타낸 그래프이다. 도 12 내지 도 13에서 "CON"은 일반 식이를 급여한 정상 식이군을 나타내고, "HF"는 고지방 식이 급여군을 나타내고, "HF+LLA"는 고지방 식이 급여 및 10㎎/㎏체중 용량의 란세마사이드 A 투여군을 나타낸다. 도 12 내지 도 13에서 보이는 바와 같이 고지방 식이 급여와 함께 란세마사이드 A를 투여한 군의 혈중 글루코오스 농도 및 AUC는 고지방 식이만을 급여한 군에 비해 유의적으로 낮게 나타났고, 일반 식이를 급여한 정상 식이군의 값과 근사하였다.

[0103] (5) 지질 대사 관련 신호 변화 측정 방법 및 측정 결과

[0104] 고지방 식이 급여 및 악틴의 투여가 AMPK(AMP-activated protein kinase)의 활성화 및 관련 신호 변화에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 실험동물 간 조직의 p-AMPK(인산화된 AMP-activated protein kinase) 및 p-ACC(인산화된 Acetyl-CoA carboxylase) 수준을 웨스턴 블롯(Western blot) 분석 방법으로 측정하였다. 또한, 고지방 식이 급여 및 악틴의 투여가 PPARγ(peroxisome proliferator-activated receptor-γ), C/EBPα(CCAAT/enhancer-binding protein-α) 및 FAS(fatty acid synthase)의 활성화 및 관련 신호 변화에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 실험동물 간 조직의 PPARγ(peroxisome proliferator-activated receptor), C/EBP α(CCAAT-enhancer-binding protein α) 및 FAS(fatty acid synthase) 수준을 웨스턴 블롯(Western blot) 분석 방법으로 측정하였다.

[0105] 구체적으로, 실험 종료 후 실험 동물의 간 조직을 protease inhibitor tablet(Roche, USA), phosphatase inhibitor(Roche) 및 phenylmethanesulfonylfluoride(PMSF)가 첨가된 RIPA buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 % NP-40, 0.25 % Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)를 이용하여 균질화한 후, 14,000 rpm의 조건에서 15분 동안 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액에 대해 10 % SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 실시하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질 샘플을 PVDF membrane(Millipore, USA)에 트랜스퍼(transfer) 하였다. 이 후, 샘플이 트랜스퍼된 PVDF membrane을 TBS-T buffer 상에서 5% skim milk(Difco, france)로 1시간 30분간 blocking 한 후, PPARγ(peroxisome

proliferator- activated receptor-γ), C/EBPα(CCAAT/enhancer-binding protein-α), FAS(fatty acid synthase), p-AMPK(phospho-AMP-activated protein kinase), AMPK(AMP-activated protein kinase), p-ACC(phospho-acetyl-CoA carboxylase), ACC(acetyl-CoA carboxylase)에 대한 1차 항체(primary antibody; 이상 Cell signaling) 또는 β-actin에 대한 1차 항체(primary antibody; Santa Cruz biotechnology, USA)를 첨가하고 쉐이킹(shaking) 상태를 유지한 채 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후, TBS-T buffer로 충분히 세척한 후 2차 항체(secondary antibody)를 1:5000의 비율로 희석하여 1시간 30분간 반응시켰다. PPARγ, C/EBPα, FAS, p-AMPK, AMPK, p-ACC, ACC를 검출하기 위한 2차 항체로 goat anti-rabbit IgG (H+L)-HRP conjugate(BIORAD)를 사용하였다. 또한, β-actin을 검출하기 위한 2차 항체로 goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP conjugate(BIORAD)를 사용하였다. 이후, TBS-T buffer로 충분히 세척하고, ECL 용액(Clarity western ECL substrate, BIORAD)과 반응시킨 뒤, 화학발광법(chemiluminescence; CLINX science instruments, USA)으로 단백질을 검출하였다. 각 밴드의 밀도를 정량하였고, 각 단백질의 발현 수준은 β-actin으로 표준화하였으며, 정상 식이군의 단백질 발현량을 기준으로 다른 실험군의 단백질 발현량을 상대적으로 계산하였다.

[0106] 도 14는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물에 대해 란세마사이드 A가 미치는 영향을 알아보기 위해 간 조직 내 p-AMPK 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯(Western blot) 분석 방법으로 측정한 결과 및 이를 정상 식이군의 단백질 발현량에 대한 배수로 나타낸 그래프이다. 도 14에서 "CON"은 일반 식이를 급여한 정상 식이군을 나타내고, "HF"는 고지방 식이 급여군을 나타내고, "HF+LLA"는 고지방 식이 급여 및 10㎎/㎏체중 용량의 란세마사이드 A 투여군을 나타내고, "HF+HLA"는 고지방 식이 급여 및 20㎎/㎏체중 용량의 란세마사이드 A 투여군을 나타낸다. 도 14에서 보이는 바와 같이 란세마사이드 A는 고지방 식이에 의해 낮아진 AMPK의 인산화를 증가시키는 것으로 나타났다.

[0107] 도 15는 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물에 대해 란세마사이드 A가 미치는 영향을 알아보기 위해 간 조직 내 PPARγ, C/EBPα, FAS 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯(Western blot) 분석 방법으로 측정한 결과 및 이를 정상 식이군의 단백질 발현량에 대한 배수로 나타낸 그래프이다. 도 15에서 "CON"은 일반 식이를 급여한 정상 식이군을 나타내고, "HF"는 고지방 식이 급여군을 나타내고, "HF+LLA"는 고지방 식이 급여 및 10㎎/㎏체중 용량의 란세마사이드 A 투여군을 나타내고, "HF+HLA"는 고지방 식이 급여 및 20㎎/㎏체중 용량의 란세마사이드 A 투여군을 나타낸다. 도 15에서 보이는 바와 같이 고지방 식이 급여와 함께 란세마사이드 A를 투여한 군에서 고지방 식이만을 급여한 군에 비해 PPARγ, C/EBPα 및 FAS 단백질 발현 수준이 낮게 나타났다.

[0109] (6) 지질 대사 관련 유전자 발현 수준 분석

[0110] 고지방 식이 급여 및 란세마사이드 A의 투여가 지질 대사 관련 유전자의 발현 수준에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 실험동물의 간 조직 및 부고환 지방조직에서 총 RNA를 추출한 후 PPARγ, C/EBPα, FAS(fatty acid synthase), SREBP-1c(sterol regulatory element binding protein-1c), FABP4(fatty acid binding protein 4), ACC(acetyl-CoA carboxylase), SCD1(stearoyl-CoA desaturase-1), LPL(lipoprotein lipase), MCAD(medium chain acyl-CoA dehydrogenase), HSL(hormone sensitive lipase), ATGL(adipose triglyceride lipase) 및 렙틴(Leptin)의 mRNA 수준을 Real-time PCR로 확인하였다. 구체적으로, 실험 종료 후 실험 동물의 간 조직 또는 부고환 지방조직을 Trizol 용액에 넣고 균질화한 후 통상의 RNA 추출 방법을 이용하여 RNA만을 분리하였다. 추출된 RNA 1㎍과 PrimeScript™ RT reagent kit(Takara, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이후, SYBR® Premix EX Taq assay™와 하기 표 4에 나타난 primer를 이용하여 Real-time PCR을 수행하였으며, 레퍼런스 유전자로는 GAPDH를 사용하였다.

표 4

[0111]

타겟 mRNA	프라이머 방향성	프라이머 시퀀스(5'→3')
GAPDH	Forward	CAACAGCAACTCCCACTCTTC
	Reverse	GGTCCAGGGTTTCTTACTCCTT
PPARγ	Forward	CCAGAGCATGGTGCCTTCGCT
	Reverse	CAGCAACCATTGGGTCAGCTC
C/EBPα	Forward	GAACAGCAACGAGTACCGGGT
	Reverse	GCCATGGCCTTGACCAAGGAG
SREBP-1c	Forward	CGCTACCGGTCTTCTATCATTG
	Reverse	TTGCTTTTGTGTGCACTTCG
FAS	Forward	GCTTTGCTGCCGTGTCCTTCT

	Reverse	TCTAGCCCTCCCGTACACTCA
FABP4	Forward	TCACCTGGAAGACAGCTCCT
	Reverse	AATCCCCATTTACGCTGATG
ACC	Forward	GGACAGACTGATCGCAGAGAAAG
	Reverse	TGGAGAGCCCCACACACA
SCD1	Forward	CCTACGACAAGAACATTCAATC
	Reverse	TTCTCTTAATCCTGGCTCAGAC
LPL	Forward	AGTAGACTGGTTGTATCGGG
	Reverse	AGCGTCATCAGGAGAAAGG
MCAD	Forward	GATCGCAATGGGTGCTTTTGATAGAA
	Reverse	AGCTGATTGGCAATGTCTCCAGCAAA
HSL	Forward	GGTGACACTCGCAGAAGACAATA
	Reverse	GCCGCCGTGCTGTCTCT
ATGL	Forward	GACCTGATGACCACCCTTTC
	Reverse	TGCTACCCGTCTGCTCTTT
Leptin	Forward	CTATGCCACCTTGGTCACCT
	Reverse	ACCAAACCAAGCATTTTTGC

[0112] 도 16은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물에 란세마사이드 A를 투여하였을 때 간 조직 내 SREBP-1c, FABP4, ACC, SCD1 및 LPL의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 도 17은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물에 란세마사이드 A를 투여하였을 때 간 조직 내 MCAD, HSL 및 ATGL의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 도 18은 고지방 식이로 비만이 유도된 모델동물에 란세마사이드 A를 투여하였을 때 부고환 지방조직 내 PPARɣ, C/EBPα, SREBP-1c, FAS, FABP4, ACC, SCD1 및 LPL의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 도 16 내지 도 18에서 "CON"은 일반 식이를 급여한 정상 식이군을 나타내고, "HF"는 고지방 식이 급여군을 나타내고, "HF+LLA"는 고지방 식이 급여 및 10㎎/㎏체중 용량의 란세마사이드 A 투여군을 나타내고, "HF+HLA"는 고지방 식이 급여 및 20㎎/㎏체중 용량의 란세마사이드 A 투여군을 나타낸다. 도 16 내지 도 18에서 보이는 바와 같이 란세마사이드 A는 지방합성에 관여하는 유전자인 PPARɣ, C/EBPα, SREBP-1c, FAS, FABP4, ACC, SCD1 및 LPL의 mRNA 수준을 하향 조절하고, 지방산 산화에 관여하는 유전자인 HSL의 mRNA 수준을 상향 조절하는 것으로 나타났다.

[0114] **5. 란세마사이드 A(lancemaside A)의 항비만 효능에 대한 in-vitro 실험**

[0115] (1) 실험 방법

[0116] 3T3-L1 전구지방세포는 한국세포주은행에서 분양받아 실험에 사용하였다. 3T3-L1 전구지방세포는 지방세포의 대사과정을 연구하는 데에 널리 이용되는 세포주로서, 상기 세포의 분화가 활발할수록 지방세포 내의 지방 축적이 활발하여 비만을 유도하게 된다. 따라서, 항비만 효과를 가질 것으로 예상되는 물질을 상기 세포에 처리하였을 때, 세포의 분화가 적을수록 항비만 효과가 큰 물질인 것으로 볼 수 있다.

[0117] 마우스 전구지방세포인 3T3-L1을 12 well plate에 2×10^4/㎖의 농도로 분주한 후 37℃, 5% CO_2의 조건에서 배양하였다. 이때, 배지로 100% confluency 시점이 될 때까지 3T3-L1 complete media[DMEM/high glucose (Thermo scientific, USA), newborn calf serum (Thermo scientific), 1% penicillin-streptomycin solution (Thermo scientific)]를 사용하였다. 100% confluency 시점이 되자 2일 동안 더 유지시켰다. 이후, MDI media(DMEM/high glucose, 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin solution, 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1uM dexamethazone, 5 ㎍/㎖ insulin)로 2일간 배양하여 전구지방세포의 지방세포로의 분화를 2일 동안 유도하였고, 분화를 유도한 날부터 2일 후 differentiation media(DMEM/high glucose, 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin solution, 5 ㎍/㎖ insulin)로 2일 동안 배양하였다. 그 후, 2일 마다 4일 동안 growth media(DMEM/high glucose, 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin solution)로 교체하여 지방세포로의 분화를 완료하였다. 한편, 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화를 유도한 날부터 란세마사이드 A를 각각 1.25, 2.5, 5, 10, 20 uM 농도로 2일 마다 8일 동안 처리하고, 분화가 완성되는 시점인 8일째에 지방세포로의 분화 정도를 관찰하였다. 이때, 란세마사이드 A는 다이메틸설폭사이드(Dimethylsulfoxide)에 녹여 스톡(stock)을 만든 후 이를 각 농도로 희석한 것을 사용하였다.

[0119] (2) 오일 레드 O (Oil red O) 염색 및 분석

[0120] 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도 후 지방의 축적 정도를 확인하기 위해 전구지방세포 및 이를 8일 동안 분화시켜 얻은 지방세포에 대해 오일레드 O 염색을 실시하였다. 전구지방세포의 지방세포로의 분화 정도를 오일레드 O 염색을 통해 1차적으로 현미경을 통해 확인하였고, 스펙트로포토미터(Spectrophotometer)로 520 nm에서 흡광도를 측정하여 지방 축적량을 정량적으로 확인하였다.

[0121] 도 19는 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A가 분화 형태에 미치는 영향을 관찰한 오일레드 O 염색 사진이다. 도 19에서 보이는 바와 같이 란세마사이드 A는 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 농도 의존적으로 지방구 형성을 억제하였다.

[0123] (3) 총 중성지질 양의 분석

[0124] 전구지방세포 및 이를 8일 동안 분화시켜 얻은 지방세포에 함유된 총 중성지질의 양을 측정하였다. 지방세포로의 분화를 유도한 지 8 일째 되는 날 전구지방세포 배양액을 PBS로 3번 세척하여 배양액을 제거하고, PBS-10mM EDTA(pH 7.4) 용액 0.5 ㎖를 첨가하여 분화된 지방세포를 균질화 하였다. 지방세포 균질액을 희석한 후 BCA법(Thermo scientific)으로 단백질을 정량하였다. 미리 헥산으로 처리한 시험관에 단백질이 300 ㎕ 당 150 ㎍이 되도록 준비하고, 이소프로판올-헥산-물(80:20:2 v/v/v) 혼합 용매 2 ㎖를 첨가하고 강하게 교반한 후 호일로 덮고 30분 동안 상온에서 정치하였다. 이후, 헥산-다이에틸 에테르(1:1 v/v) 혼합 용매 500 ㎕를 첨가하고 다시 30초 이상 강하게 교반한 후 호일로 덮고 10분 동안 상온에서 정치하였다. 이후, 증류수 1 ㎖를 첨가하고 강하게 교반한 후 호일로 덮고 20분 동안 상온에서 정치하였다. 이후, 상층액 약 900 ㎕를 취하고, 이를 미리 헥산으로 씻어 말려둔 시험관에 옮겨 담았다. 이후, 질소가스 존재 하에서 유기 용매를 휘발시키고, 시험관에 이소프로판올 20 ㎕를 첨가하고 교반하여 시험관 벽면에 묻은 중성지질을 충분히 용해시켰다. 이후, 중성지질 측정용 키트((Bio Clinical System, Korea)를 사용하여 중성지질(Trigylceride) 함량을 측정하였다.

[0125] 도 20은 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A가 분화된 지방세포 내의 중성지질 함량에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 도 20에서 보이는 바와 같이 란세마사이드 A는 농도 의존적으로 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 중성지질의 생성을 억제하였다.

[0127] (4) 지질 대사 관련 단백질 수준 변화 분석

[0128] 란세마사이드 A의 처리가 전구지방세포의 분화시 지질 대사 관련 단백질 수준 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 분화된 지방세포 내 p-AMPK(phospho-AMP-activated protein kinase), AMPK(AMP-activated protein kinase), p-ACC(phospho-acetyl-CoA carboxylase), PPARγ(peroxisome proliferator-activated receptor), C/EBP α(CCAAT-enhancer-binding protein α) 및 FAS(fatty acid synthase) 단백질 수준을 웨스턴 블롯(Western blot) 분석 방법으로 측정하였다.

[0129] 전구지방세포를 8일 동안 분화시켜 얻은 지방세포를 protease inhibitor tablet(Roche, USA), phosphatase inhibitor(Roche) 및 phenylmethanesulfonylfluoride(PMSF)가 첨가된 RIPA buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 % NP-40, 0.25 % Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)를 이용하여 균질화한 후, 14,000 rpm의 조건에서 15분 동안 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액에 대해 10 % SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 실시하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질 샘플을 PVDF membrane(Millipore, USA)에 트랜스퍼(transfer) 하였다. 이 후, 샘플이 트랜스퍼된 PVDF membrane을 TBS-T buffer 상에서 5% skim milk(Difco, france)로 2시간 동안 blocking 한 후, p-AMPK(phospho-AMP-activated protein kinase), AMPK(AMP-activated protein kinase), p-ACC(phospho-acetyl-CoA carboxylase), PPARγ (peroxisome proliferator- activated receptor-γ), C/EBPα(CCAAT/enhancer-binding protein-α), FAS(fatty acid synthase)에 대한 1차 항체(primary antibody; 이상 Cell signaling) 또는 β-actin에 대한 1차 항체(primary antibody; Santa Cruz biotechnology, USA)를 1:500의 비율로 희석하여 첨가하고 쉐이킹(shaking) 상태를 유지한 채 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후, TBS-T buffer로 충분히 세척한 후 2차 항체(secondary antibody)를 소정의 비율로 희석하여 2시간 동안 반응시켰다. p-AMPK, AMPK, p-ACC, PPARγ, C/EBP α, FAS를 검출하기 위한 2차 항체로 goat anti-rabbit IgG (H+L)-HRP conjugate(BIORAD)를 1:5000의 비율로

희석하여 사용하였다. 또한, β-actin을 검출하기 위한 2차 항체로 goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP conjugate(BIORAD)를 1:1000의 비율로 희석하여 사용하였다. 이후, TBS-T buffer로 충분히 세척하고, ECL 용액(Clarity western ECL substrate, BIORAD)과 반응시킨 뒤, 화학발광법(chemiluminescence; CLINX science instruments, USA)으로 단백질을 검출하였다. 감광된 각 밴드의 밀도를 gel analysis V2.02(CLINX science instruments, USA)로 정량하였고, 전구지방세포를 란세마사이드 A의 처리없이 분화시켜 얻은 지방세포의 밴드 밀도를 기준으로 다른 실험군의 밴드 밀도 값을 상대적으로 나타냈다.

[0130] 도 21은 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 PPARγ 단백질 수준 변화에 미치는 영향을 웨스턴 블롯(Western blot) 분석 방법으로 측정한 결과 및 이를 정량적으로 나타낸 그래프이다. 도 22는 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 C/EBPα 단백질 수준 변화에 미치는 영향을 웨스턴 블롯(Western blot) 분석 방법으로 측정한 결과 및 이를 정량적으로 나타낸 그래프이다. 도 23은 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 FAS 단백질 수준 변화에 미치는 영향을 웨스턴 블롯(Western blot) 분석 방법으로 측정한 결과 및 이를 정량적으로 나타낸 그래프이다. 도 24는 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 p-AMPk 단백질 수준 변화에 미치는 영향을 웨스턴 블롯(Western blot) 분석 방법으로 측정한 결과 및 이를 정량적으로 나타낸 그래프이다. 도 25는 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 p-AMC 단백질 수준 변화에 미치는 영향을 웨스턴 블롯(Western blot) 분석 방법으로 측정한 결과 및 이를 정량적으로 나타낸 그래프이다. 도 21 내지 도 23에서 보이는 바와 같이 전구지방세포를 지방세포로 분화시킬 때 란세마사이드 A는 지방합성을 조절하는 주요 인자인 PPARγ, C/EBPα, FAS 단백질의 수준을 농도 의존적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 또한, 도 24 및 도 25에서 보이는 바와 같이 란세마사이드 A는 AMPK의 인산화 및 이의 다운스트림 타겟인 ACC의 인산화를 증가시켰다.

[0132] (5) 지질 대사 관련 유전자 발현 수준 분석

[0133] 전구지방세포의 지방세포로의 분화 단계에서 C/EBPα와 PPARγ는 지방세포로의 분화가 진행될수록 발현량이 증가하고 대부분의 아디포카인(adipokine) 들의 발현량도 증가하게 된다. 전구지방세포를 8일 동안 분화시킨 후에 지질 대사 관련 유전자인 PPARγ, C/EBPα, FAS(fatty acid synthase), SREBP-1c(sterol regulatory element binding protein-1c), FABP4(fatty acid binding protein 4), ACC(acetyl-CoA carboxylase), SCD1(stearoyl-CoA desaturase-1), LPL(lipoprotein lipase), CPT1(Carnitine palmitoyltransferase I) 및 렙틴(Leptin)의 mRNA 수준을 Real-time PCR로 확인하였다. 구체적으로, 분화가 완료된 3T3-L1 전구지방세포를 PBS로 두 번 세척한 후 cell pellet을 모아 Trizol을 이용하여 RNA만을 분리하였다. 추출된 RNA 1㎍과 PrimeScript™ RT reagent kit(Takara, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이후, SYBR® Premix EX Taq assay™와 하기 표 5에 나타난 primer를 이용하여 Real-time PCR을 수행하였으며, 레퍼런스 유전자로는 GAPDH를 사용하였다.

표 5

[0134]

타겟 mRNA	프라이머 방향성	프라이머 시퀀스(5'→3')
GAPDH	Forward	CAACAGCAACTCCCACTCTTC
	Reverse	GGTCCAGGGTTTCTTACTCCTT
PPARγ	Forward	CCAGAGCATGGTGCCTTCGCT
	Reverse	CAGCAACCATTGGGTCAGCTC
C/EBPα	Forward	GAACAGCAACGAGTACCGGGT
	Reverse	GCCATGGCCTTGACCAAGGAG
SREBP-1c	Forward	CGCTACCGGTCTTCTATCATTG
	Reverse	TTGCTTTTGTGTGCACTTCG
FAS	Forward	GCTTTGCTGCCGTGTCCTTCT
	Reverse	TCTAGCCCTCCCGTACACTCA
FABP4	Forward	TCACCTGGAAGACAGCTCCT
	Reverse	AATCCCCATTTACGCTGATG
ACC	Forward	GGACAGACTGATCGCAGAGAAAG
	Reverse	TGGAGAGCCCCACACACA
SCD1	Forward	CCTACGACAAGAACATTCAATC
	Reverse	TTCTCTTAATCCTGGCTCAGAC

LPL	Forward	AGTAGACTGGTTGTATCGGG
	Reverse	AGCGTCATCAGGAGAAAGG
CPT1	Forward	CTATGCCACCTTGGTCACCT
	Reverse	ACCAAACCAAGCATTTTTGC
Leptin	Forward	CTATGCCACCTTGGTCACCT
	Reverse	ACCAAACCAAGCATTTTTGC

[0135] 도 26은 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 PPARγ의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 도 27은 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 C/EBPα의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 도 28은 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 SREBP-1c의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 도 29는 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 FAS의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 도 30은 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 FABP4의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 도 31은 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 ACC의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 도 32는 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 SCD1의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 도 33은 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 LPL의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 도 34는 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 Leptin의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이고, 도 35는 3T3-L1 전구지방세포의 지방세포로의 분화 유도시 란세마사이드 A 처리가 CPT1의 mRNA 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. 도 26 내지 도 35에서 보이는 바와 같이 전구지방세포를 지방세포로 분화시킬 때 악틴은 지방합성 관련 유전자인 PPARγ, C/EBPα, FAS(fatty acid synthase), SREBP-1c(sterol regulatory element binding protein-1c), FABP4(fatty acid binding protein 4), ACC(acetyl-CoA carboxylase), SCD1(stearoyl-CoA desaturase-1), LPL(lipoprotein lipase) 및 렙틴(Leptin)의 mRNA 수준을 하향 조절하는 것으로 나타났으며, 반면 지방분해 관련 유전자인 CPT1(Carnitine palmitoyltransferase I)의 mRNA 수준을 상향 조절하는 것으로 나타났다.

[0137] **6. 발효 더덕 추출물 등을 포함하는 약학 조성물의 제조**

[0138] 하기의 약학 조성물 제조에서 발효 더덕 추출물은 란세마사이드 A(lancemaside A) 또는 이의 아글리콘인 에키노사이스틱산(echinocystic acid)으로 대체가 가능하다.

[0140] <6-1> 산제의 제조

[0141] 제조예 2의 발효 더덕 추물물 20 mg

[0142] 유당 100 mg

[0143] 탈크 10 mg

[0144] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0146] <6-2> 정제의 제조

[0147] 제조예 2의 발효 더덕 추물물 10 mg

[0148] 옥수수전분 100 mg

[0149] 유 당 100 mg

[0150] 스테아린산 마그네 2 mg

[0151] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0153] <6-3> 캡슐제의 제조

[0154] 제조예 2의 발효 더덕 추물물 10 mg

[0155] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0156] 유 당 15 mg

[0157] 스테아린산 마그네슘 0.2 mg

[0158] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0160] <6-4> 환의 제조

[0161] 제조예 2의 발효 더덕 추물물 10 mg

[0162] 유당 150 mg

[0163] 글리세린 100 mg

[0164] 자일리톨 50 mg

[0165] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0167] <6-5> 과립의 제조

[0168] 제조예 2의 발효 더덕 추물물 15 mg

[0169] 대두추출물 50 mg

[0170] 포도당 200 mg

[0171] 전분 600 mg

[0172] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60 ℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충진하였다.

[0174] <6-6> 주사제의 제조

[0175] 제조예 2의 발효 더덕 추물물 10 mg

[0176] 소디움 메타비설파이트 3.0 mg

[0177] 메틸파라벤 0.8 mg

[0178] 프로필파라벤 0.1 mg

[0179] 주사용 멸균증류수 적량

[0180] 상기의 성분을 혼합한 후, 이중 2㎖를 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조하였다.

[0182] **7. 발효 더덕 추출물 등을 포함하는 식품 조성물의 제조**

[0183] 하기의 식품 조성물 제조에서 발효 더덕 추출물은 란세마사이드 A(lancemaside A) 또는 이의 아글리콘인 에키노사이스틱산(echinocystic acid)으로 대체가 가능하다.

[0185] <7-1> 밀가루 식품의 제조

[0186] 밀가루 100 중량부에 제조예 2의 발효 더덕 추물물 0.5 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵,

케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.

[0188] <7-2> 유제품(dairy products)의 제조

[0189] 우유 100 중량부에 제조예 2의 발효 더덕 추물물 0.5 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0191] <7-3> 선식의 제조

[0192] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0193] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0194] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 제조예 2의 발효 더덕 추물물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0195] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 17 중량부, 보리 20 중량부),

[0196] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0197] 제조예 2의 발효 더덕 추물물(1 중량부),

[0198] 영지(0.5 중량부),

[0199] 지황(0.5 중량부)

[0201] <7-4> 건강음료의 제조

[0202] 액상과당(0.5 g), 올리고당(4 g), 설탕(2 g), 식염(0.5 g), 물(77 g)과 같은 부재료와 제조예 2의 발효 더덕 추물물 1 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[0204] <7-5> 야채 주스의 제조

[0205] 제조예 2의 발효 더덕 추물물 2 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ㎖에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

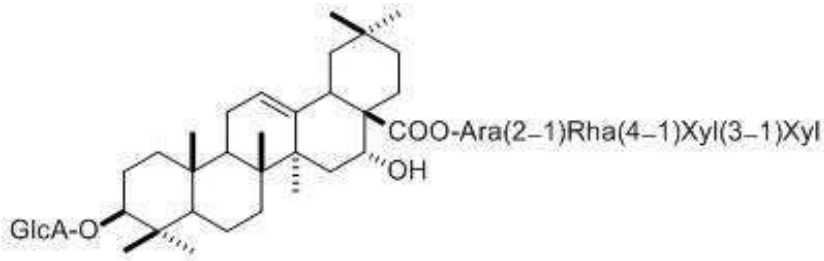
[0207] <7-6> 과일 주스의 제조

[0208] 제조예 2의 발효 더덕 추물물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ㎖ 에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

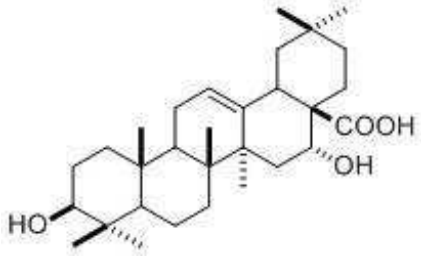
[0210] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

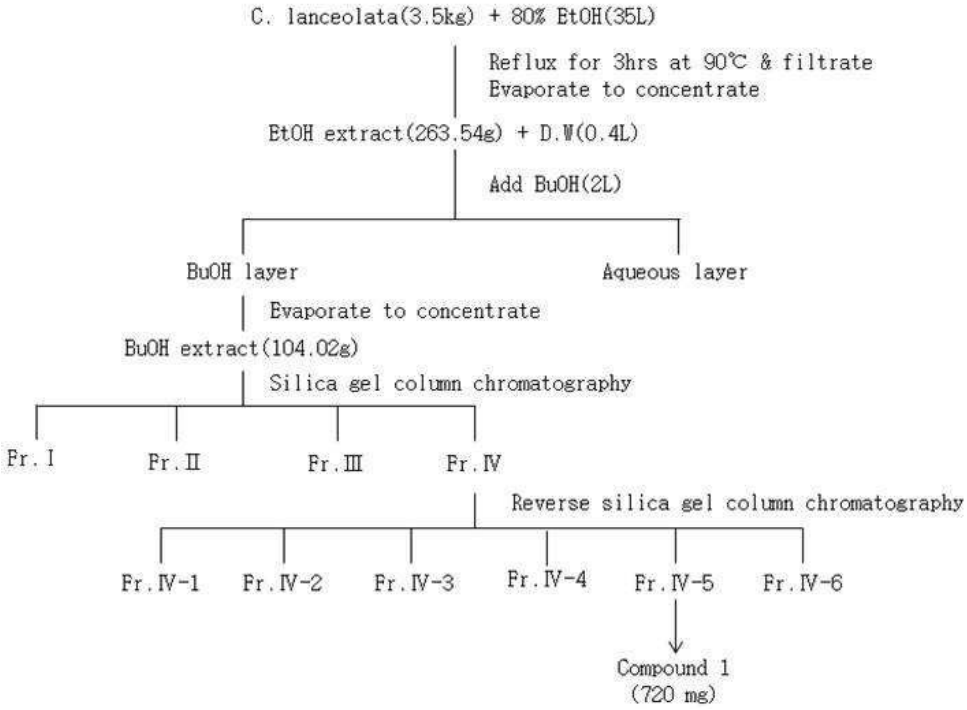
도면1



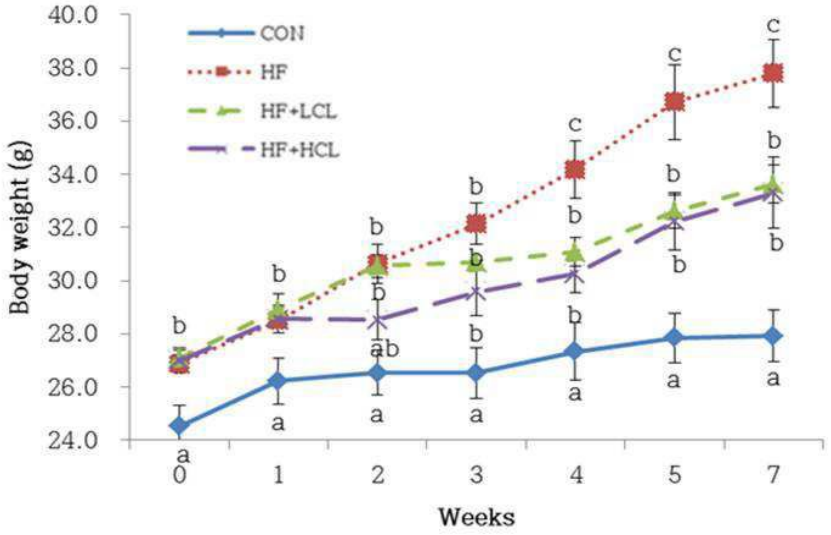
도면2



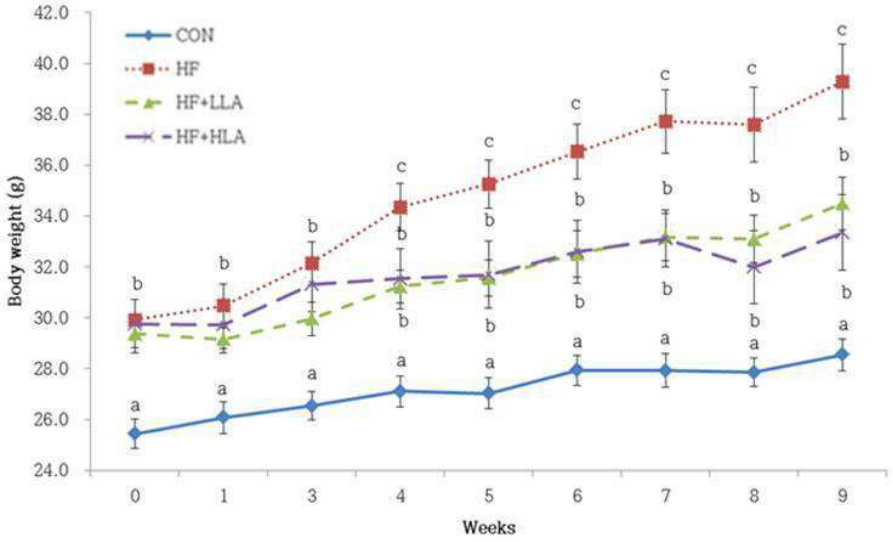
도면3



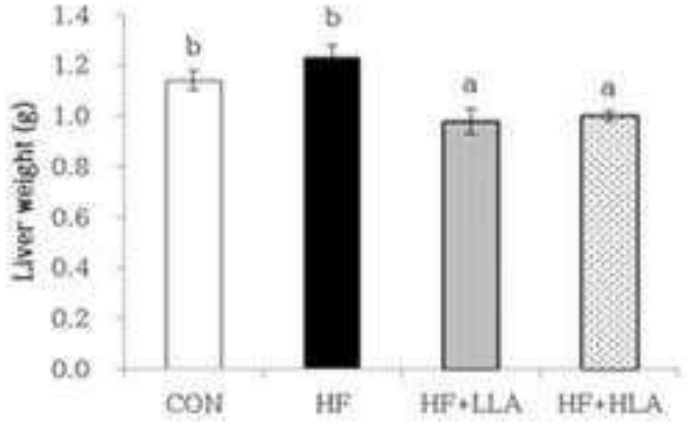
도면4


CON
HF
HF+LCL
HF+HCL
Body weight (g)
Weeks

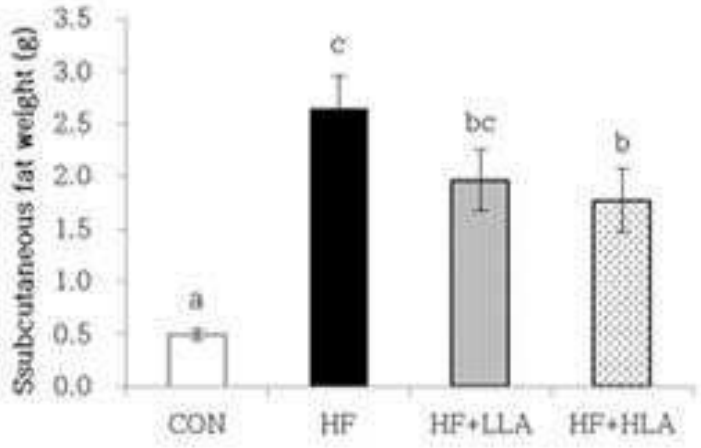
도면5


CON
HF
HF+LLA
HF+HLA
Body weight (g)
Weeks

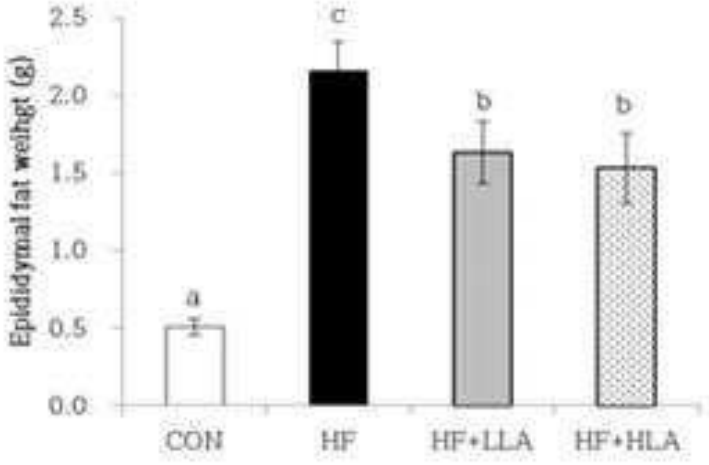
도면6


Liver weight (g)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
b
b
a
a
CON
HF
HF+LLA
HF+HLA

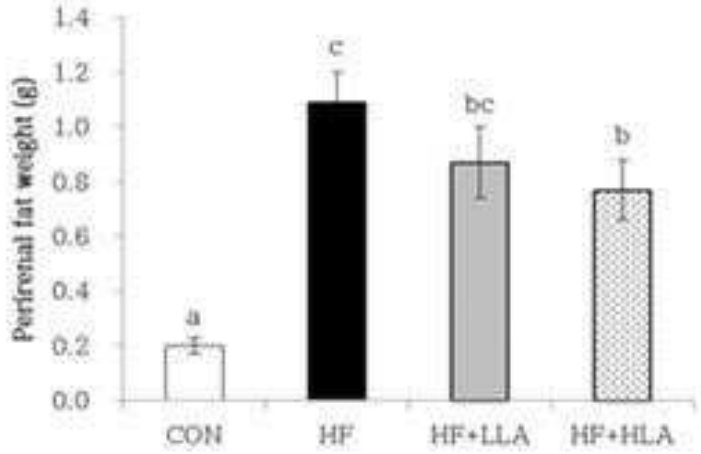
도면7


Ssubcutaneous fat weight (g)
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
a
c
bc
b
CON
HF
HF+LLA
HF+HLA

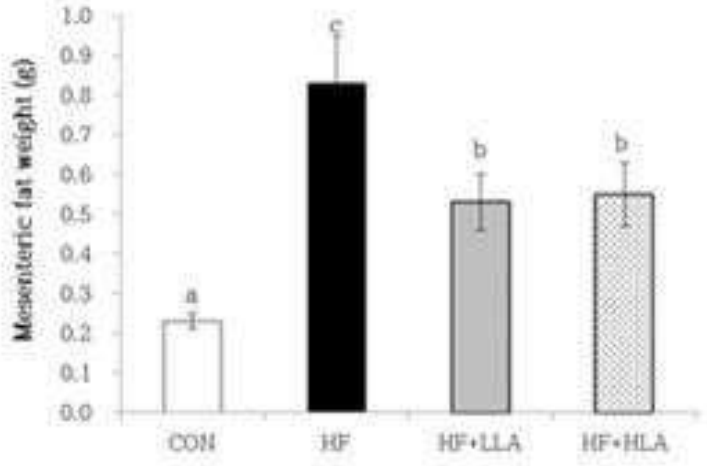
도면8


Epididymal fat weihgt (g)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
a
c
b
b
CON
HF
HF+LLA
HF+HLA

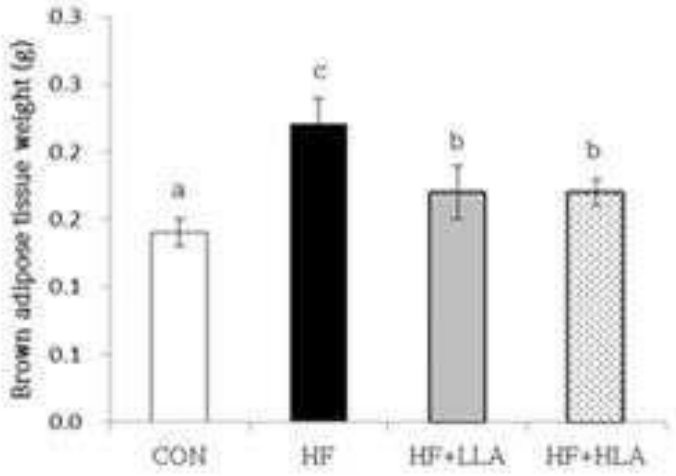
도면9


Perirenal fat weight (g)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
a
c
bc
b
CON
HF
HF+LLA
HF+HLA

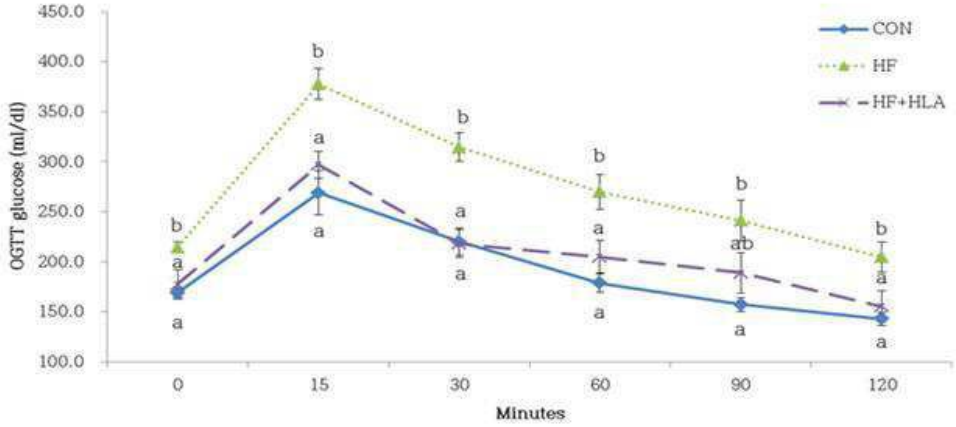
도면10



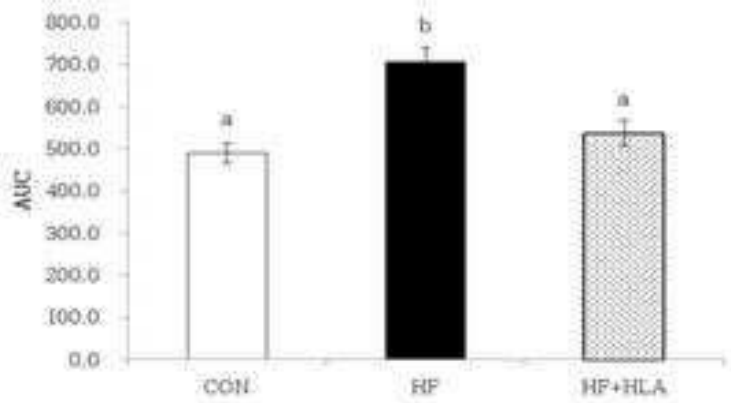
도면11



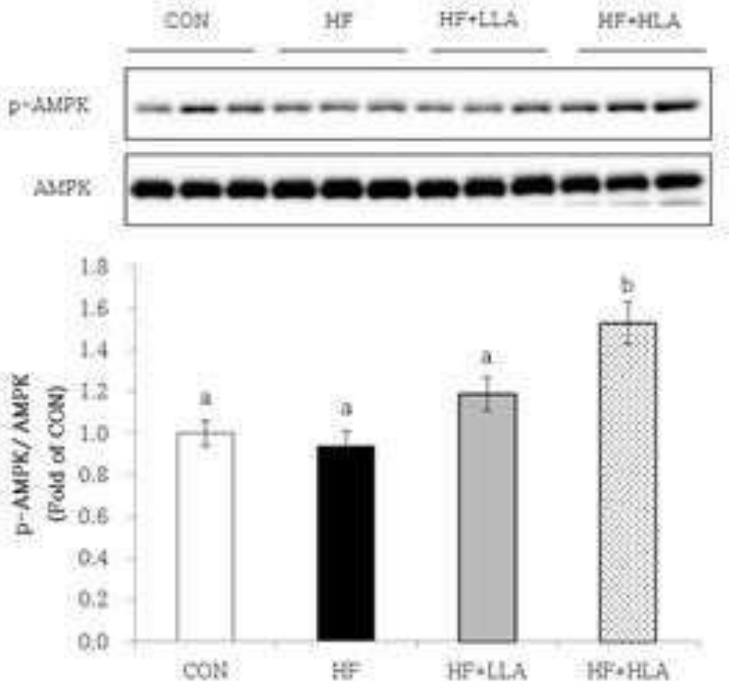
도면12



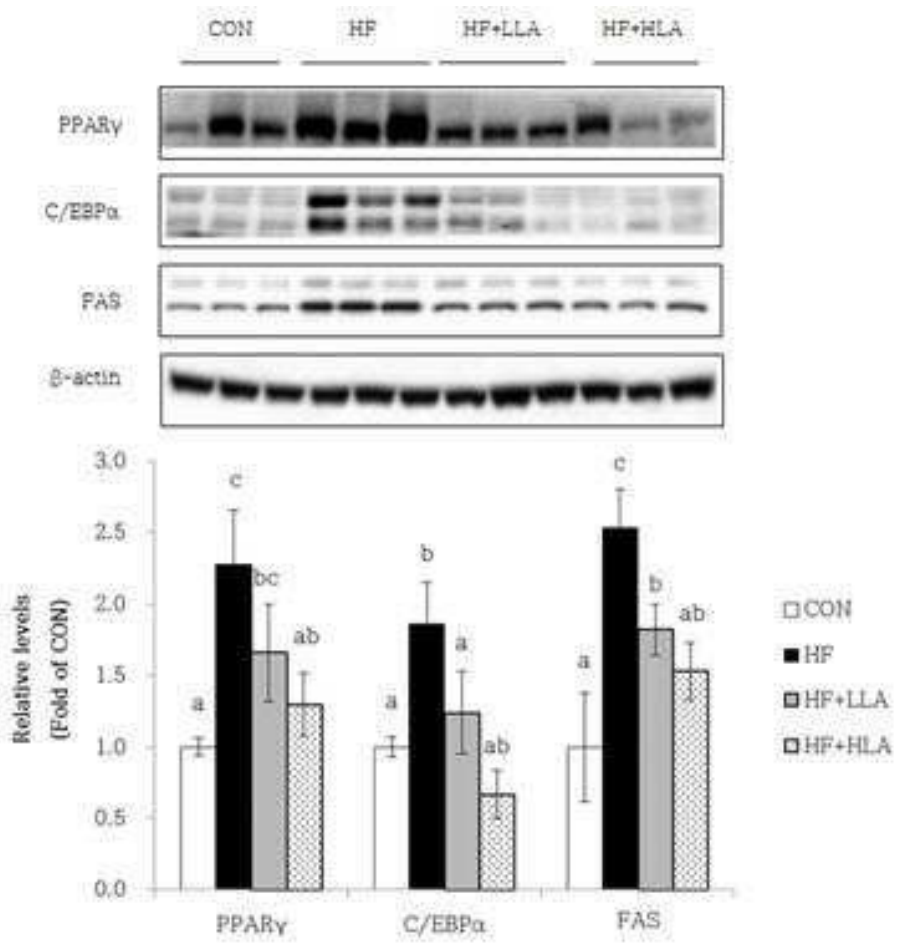
도면13


800.0
700.0
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
AUC
a
b
a
CON
HF
HF+HLA

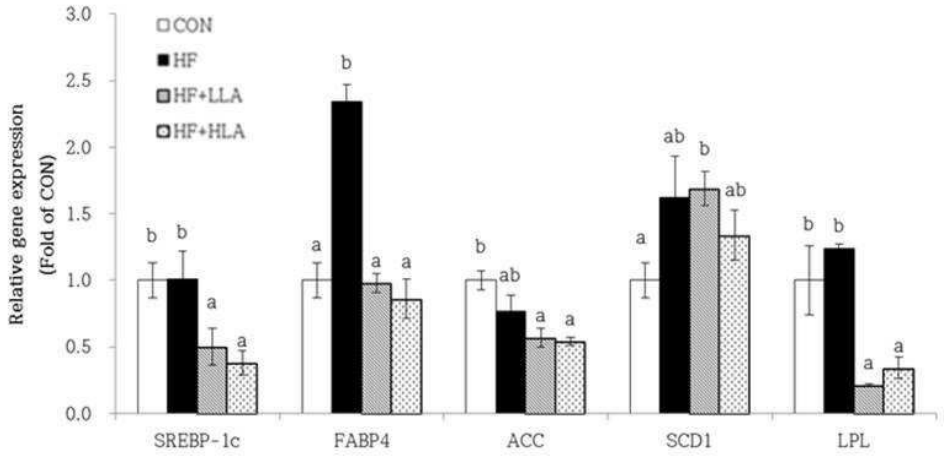
도면14


CON
HF
HF+LLA
HF+HLA
p-AMPK
AMPK
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
p-AMPK/ AMPK
(Fold of CON)
a
a
a
b
CON
HF
HF+LLA
HF+HLA

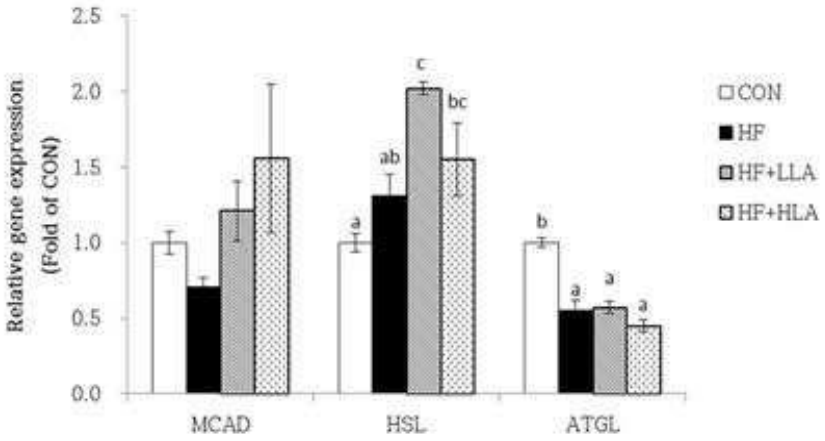
도면15


CON
HF
HF+LLA
HF+HLA
PPARγ
C/EBPα
FAS
β-actin
Relative levels (Fold of CON)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
PPARγ
C/EBPα
FAS
CON
HF
HF+LLA
HF+HLA

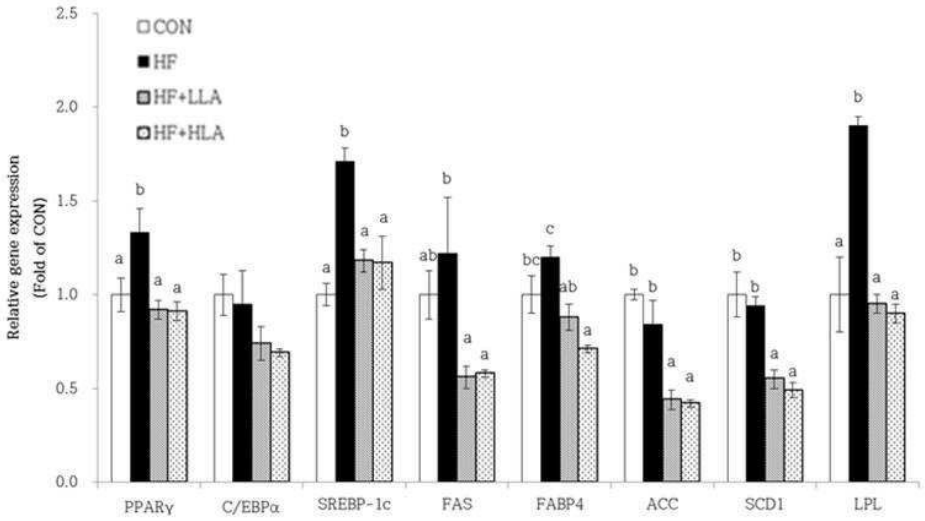
도면16


Relative gene expression (Fold of CON)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
CON
HF
HF+LLA
HF+HLA
SREBP-1c
FABP4
ACC
SCD1
LPL

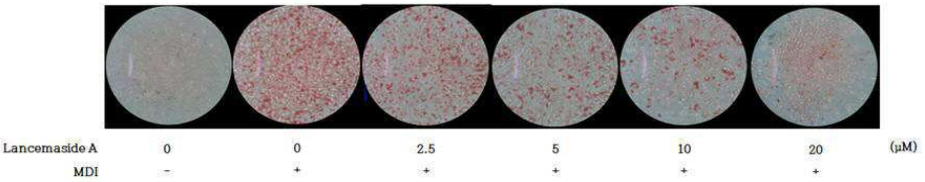
도면17



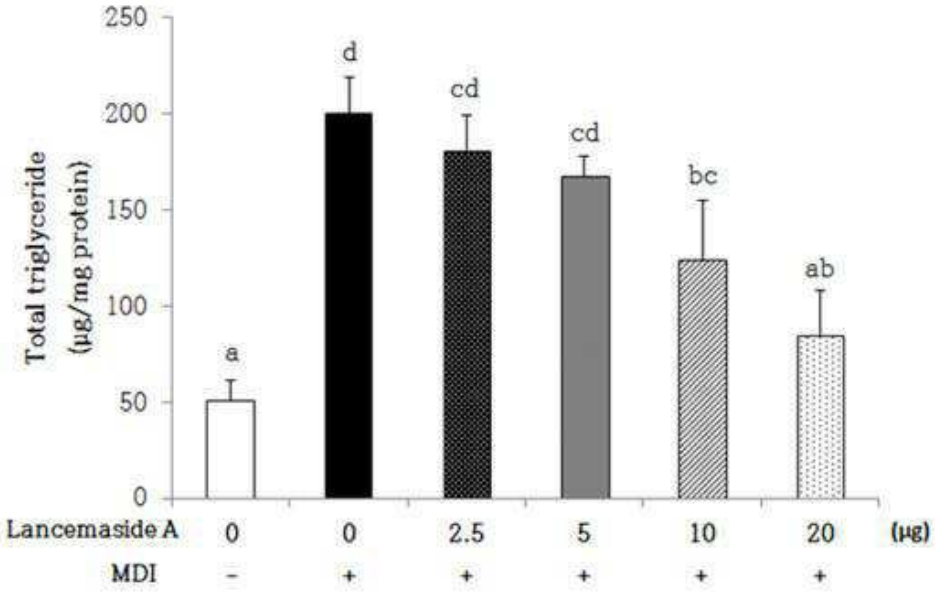
도면18



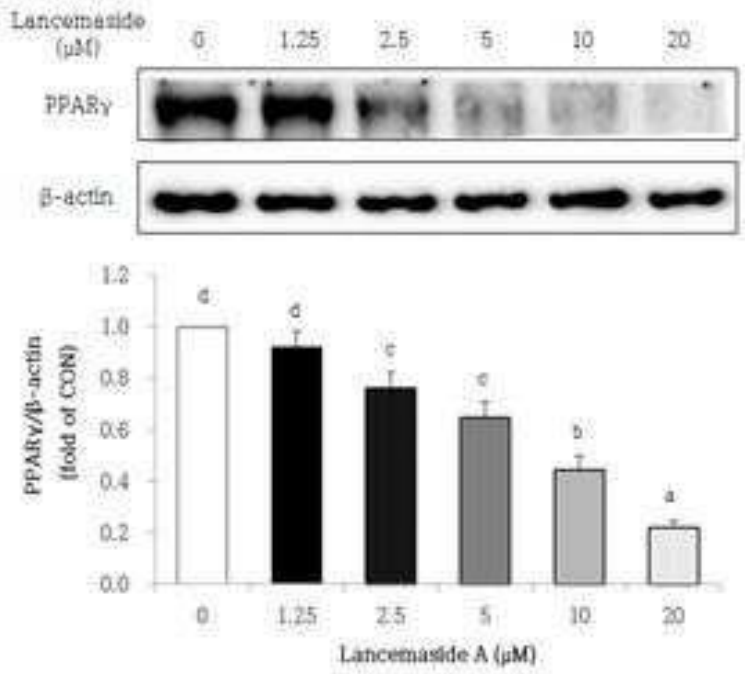
도면19



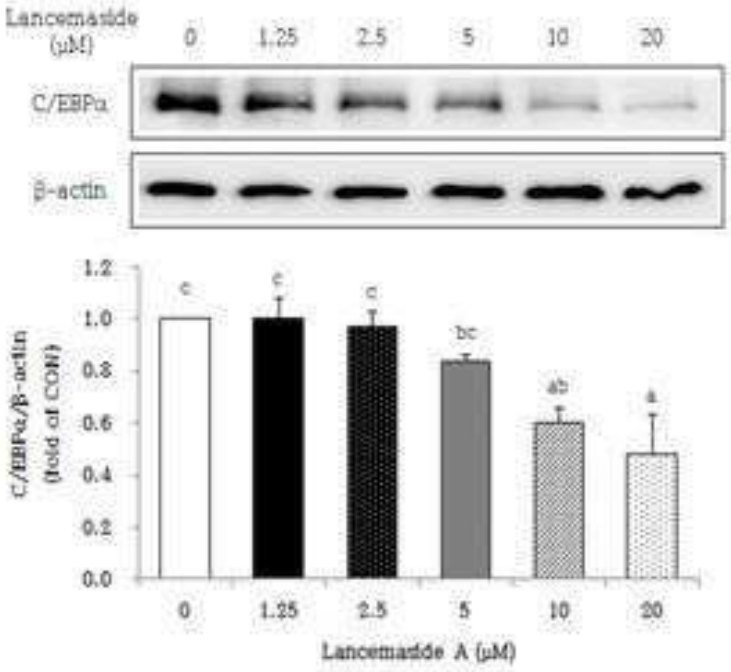
도면20


Total triglyceride (μg/mg protein)
250
200
150
100
50
0
a
d
cd
cd
bc
ab
Lancemaside A 0 0 2.5 5 10 20 (μg)
MDI - + + + + +

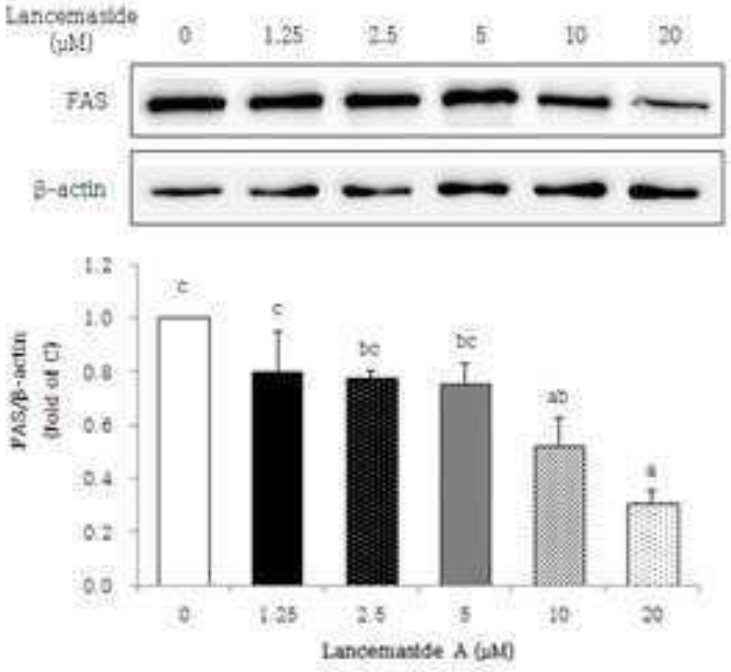
도면21


Lancemaside (μM)
0 1.25 2.5 5 10 20
PPARγ
β-actin
PPARγ/β-actin (fold of CON)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
d d c c b a
0 1.25 2.5 5 10 20
Lancemaside A (μM)

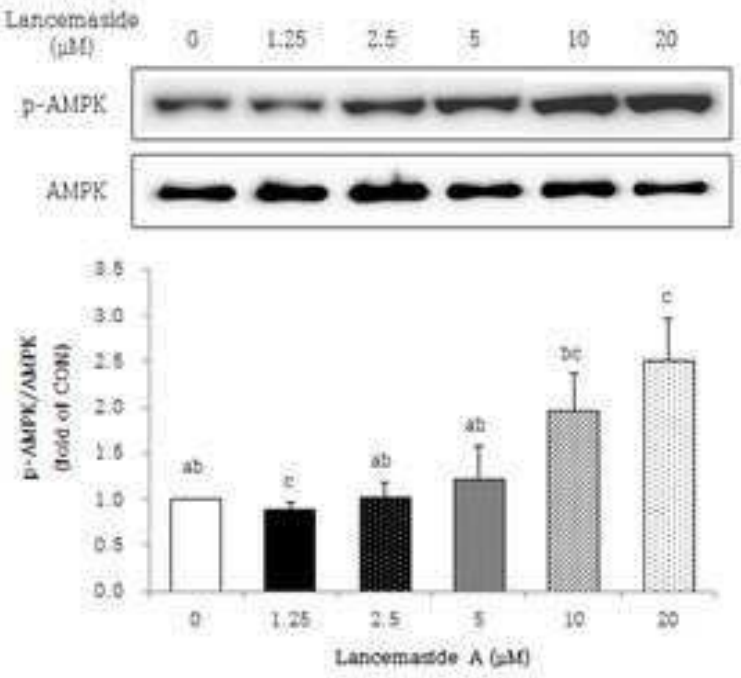
도면22


Lancemaside (μM)
0
1.25
2.5
5
10
20
C/EBPα
β-actin
C/EBPα/β-actin (fold of CON)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
c
c
c
bc
ab
a
0
1.25
2.5
5
10
20
Lancemaside A (μM)

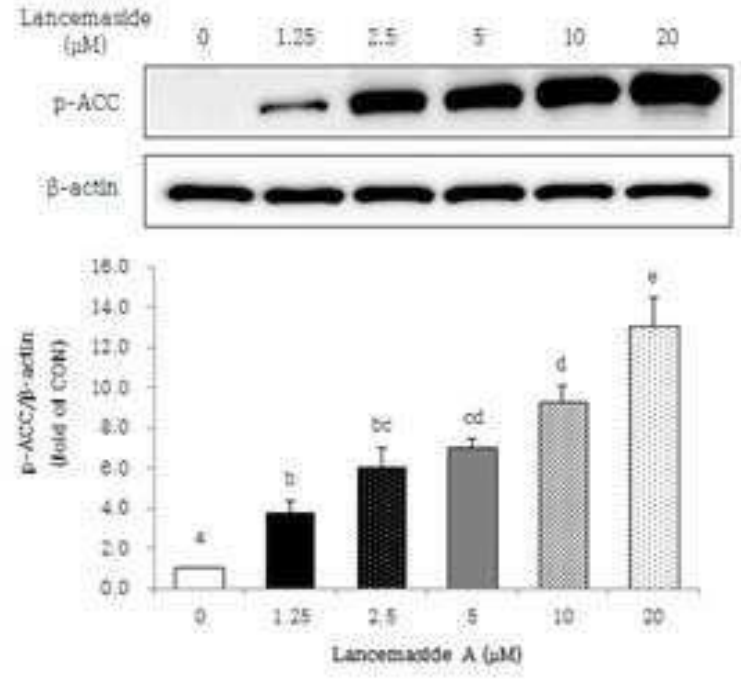
도면23


Lancemaside (μM)
0
1.25
2.5
5
10
20
FAS
β-actin
FAS/β-actin (fold of C)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
c
c
bc
bc
ab
a
0
1.25
2.5
5
10
20
Lancemaside A (μM)

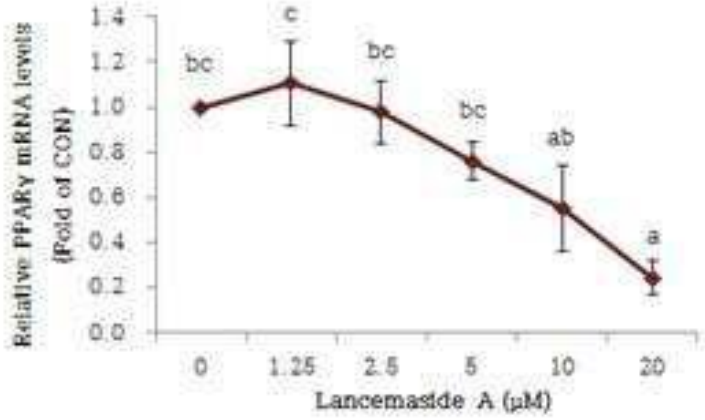
도면24


Lancemaside (μM)
0
1.25
2.5
5
10
20
p-AMPK
AMPK
p-AMPK/AMPK (fold of CON)
ab
c
ab
ab
bc
c
Lancemaside A (μM)

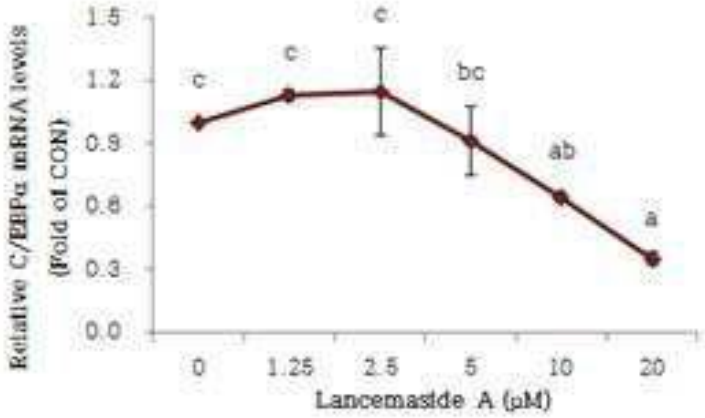
도면25


Lancemaside (μM)
0
1.25
2.5
5
10
20
p-ACC
β-actin
p-ACC/β-actin (fold of CON)
a
b
bc
cd
d
e
Lancemaside A (μM)

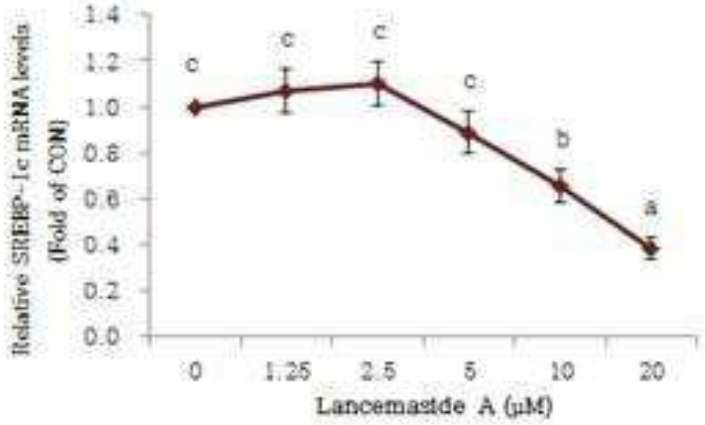
도면26



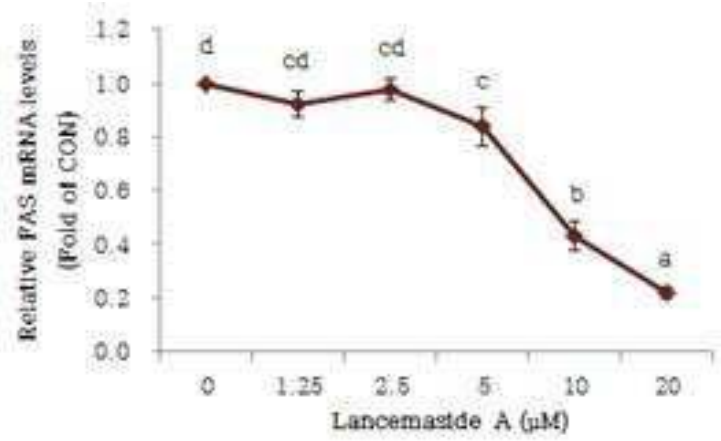
도면27



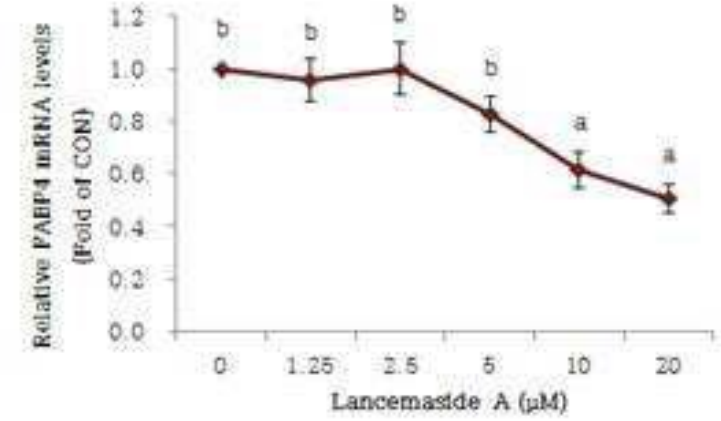
도면28



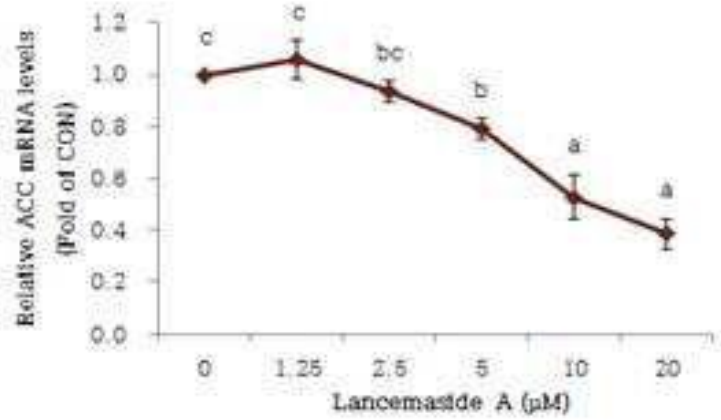
도면29



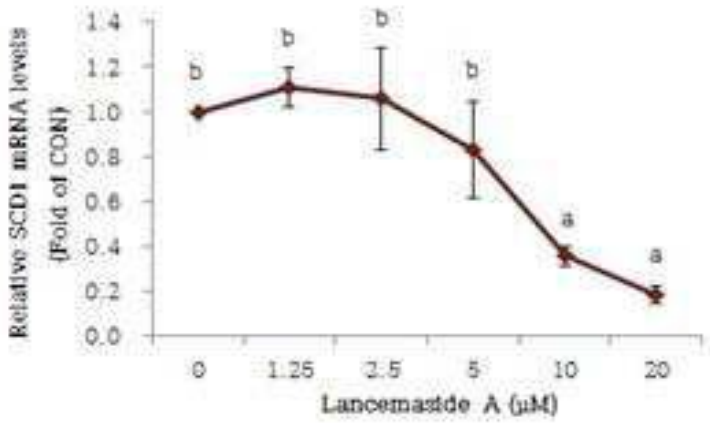
도면30



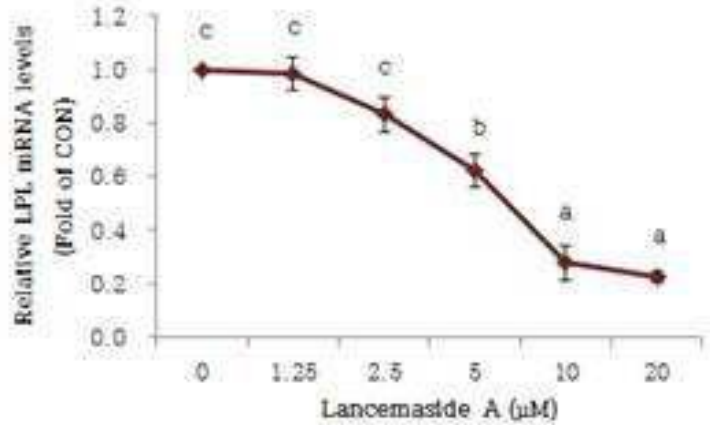
도면31



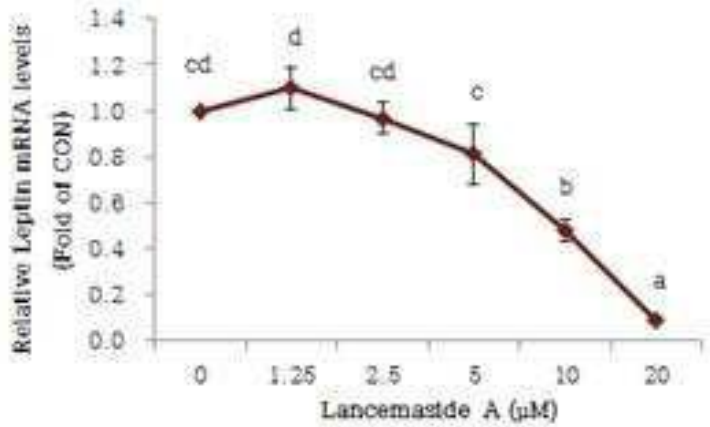
도면32



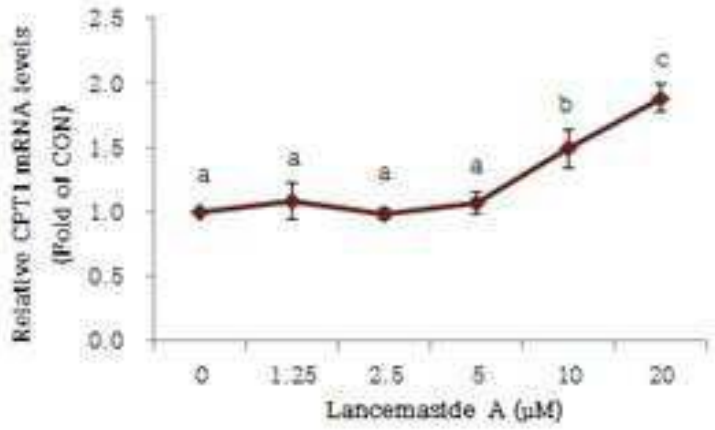
도면33



도면34



도면35


Relative CPT1 mRNA levels
(Fold of CON)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
a
a
a
a
b
c
0
1.25
2.5
5
10
20
Lancemaside A (μM)