



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0035458

(43) 공개일자 2015년04월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/085 (2006.01) A61K 31/045 (2006.01)

A61K 31/065 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0129619

(22) 출원일자 2014년09월26일

심사청구일자 없음

(30) 우선권주장

1020130114230 2013년09월26일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김현수

서울특별시 노원구 중계4동 131번지

김남이

부산광역시 해운대구 우동 957-1 양지빌 316호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 5 항

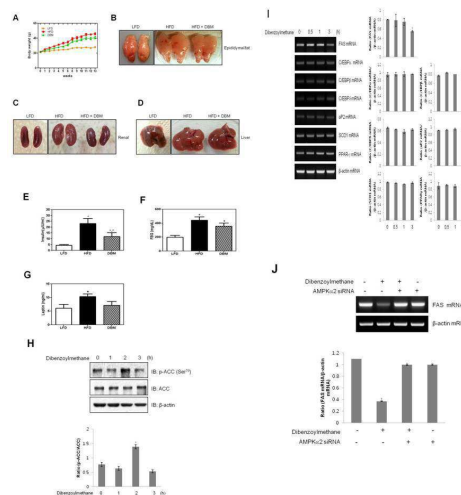
(54) 발명의 명칭 디벤조일메탄을 함유하는 비만 치료 또는 예방용 조성물

(57) 요약

본 발명은 디벤조일메탄(Dibenzoylmethane)을 유효성분으로 함유하는 비만 또는 콜레스테롤혈증의 치료 또는 예방용 조성물 및 비만 또는 콜레스테롤혈증 개선용 건강식품에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 디벤조일메탄(Dibenzoylmethane)은 체중 감소, 체지방 감소 및 총 콜레스테롤 감소 효과가 뛰어나, 비만 또는 콜레스테롤혈증의 치료 또는 예방에 유용하다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

이정욱

서울특별시 성북구 보문로26길 59, 에스앤빌 402호
(안암동1가)

이혜정

서울 성북구 인촌로24길 6

김수진

서울특별시 동대문구 한천로 224, 15동 1203호 (장
안동, 현대아파트)

김지혜

경기도 구리시 체육관로 69, 209동 1203호 (교문동, 하나아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013R1A2A2A05004796

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 연구재단

연구사업명 핵심연구

연구과제명 신규 발굴된 AMPK 활성화인자 및 결합단백질의 혈당 및 암 세포사멸 제어 인자로서의 활용가능성 탐색

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2013.05.01 ~ 2016.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

디벤조일메탄(Dibenzoylmethane)을 유효성분으로 함유하는 비만 치료 또는 예방용 의약조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 디벤조일메탄(Dibenzoylmethane)은 AMPK(AMP kinase)의 발현 또는 활성을 증가시켜 지방 대사를 조절하는 것을 특징으로 하는 비만 치료 또는 예방용 의약조성물.

청구항 3

디벤조일메탄(Dibenzoylmethane)을 유효성분으로 함유하는 비만 개선용 건강기능식품.

청구항 4

디벤조일메탄(Dibenzoylmethane)을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤혈증 치료 또는 예방용 의약조성물.

청구항 5

디벤조일메탄(Dibenzoylmethane)을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤혈증 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 디벤조일메탄(Dibenzoylmethane)을 유효성분으로 함유하는 비만 또는 콜레스테롤혈증(cholesterolemia)의 치료 또는 예방용 의약조성물 및 비만 또는 콜레스테롤혈증(cholesterolemia) 개선용 건강 식품에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 비만(obesity)은 지방세포의 크기나 수의 증가로 체내에 지방조직이 과다하게 축적된 상태, 즉 신체에 필요한 지방보다 더 많은 양의 지방이 있는 상태를 말한다.

[0003] 비만의 원인으로는 필요 이상의 음식 섭취와 운동량의 부족 그리고 유전적인 민감성 등을 꼽을 수 있다. 비만은 제2형 당뇨, 고혈압, 고 콜레스테롤혈증, 심혈관 질환 등 건강과 삶의 질에 있어서 부정적인 결과를 초래하고 있어, 그에 따른 사회적 비용이 점차 증가하는 추세이다. 미국의 경우 비만에 의한 사망자가 연간 300,000명 이상에 달하여 예방 가능한 사망의 2순위를 차지하고 있고 (McGinnis JM and Foege WH, JAMA 270: 2207-2212, 1993) 이에 따른 의료 및 사회적 비용이 연간 680억 달러를 초과 초과하는 것으로 보고되었다 (Colditz GA, Am. J. Clin. Nutr. 55: 503S-507S, 1992).

[0004] 이와 같이 비만으로 인한 대사성 질환이 다양하고 그 심각성도 심화되면서 이를 막기 위한 예방이나 치료가 절실한 상황이다.

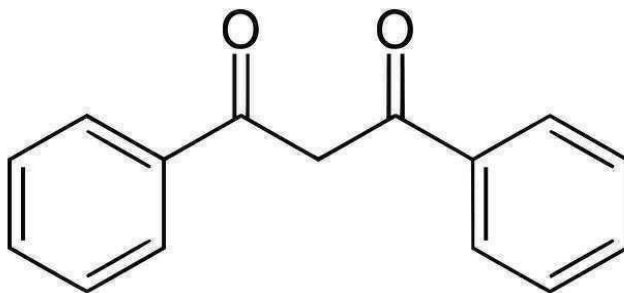
[0005] 현재 비만 치료제는 작용 기작에 따라 크게 포만감 항진제, 지방 흡수 억제제, 항정신성 식욕 억제제로 구분된다.

[0006] 포만감 항진제는 뇌에서 식욕을 조절하는 신경 호르몬 세로토닌(serotonin)과 노르아드레날린(noradrenalin)의 재흡수를 억제해 식욕을 저해하며, 기초대사량을 증가시켜 에너지 소모를 늘린다. 그 중 대표 제품이었던 리덕틸(Reductil)은 제품의 성분인 시부트라민(Sibutramine)이 심근경색과 뇌졸중 등 심혈관계의 부작용을 초래하여

2010년 10월 식약청에서 최종 판매 중지 결정 후 시장에서 퇴출 되었다.

- [0007] 지방 흡수 억제제는 지방을 체내로 흡수하는 소화효소인 리파아제(lipase)의 기능을 억제해 섭취한 지방을 몸 밖으로 배출하는 기능을 한다. 이러한 지방 흡수억제제로는 올리스타트(Orlistat) 성분으로 제니칼(Xenical)이 대표적이다. 현재 부작용이 가장 적은 것으로 알려진 제니칼 또한 지방변, 장내가스발생, 복부팽만감 등의 부작용을 나타내고 있고, 최근에는 신장장애를 호소하는 환자들도 생겨나는 추세이다.
- [0008] 항정신성 식욕 억제제는 뇌에서 식욕을 조절하는 신경 호르몬 노르에피네프린(norepinephrine)과 도파민(dopamine)의 생성을 촉진해 식욕 자체를 감소시킴으로써 비만을 치료하고, 그 성분으로는 펜디메트라진(phendimetrazine), 펜터민(phentermine)이 있다.
- [0009] 렙틴(leptin)은 비만치료의 또 다른 후보로서 최근 각광을 받아온 대표적인 물질 중 하나이다. 지방 세포에서 혈중으로 방출되어 뇌혈관장벽(blood-brain barrier)을 통과한 후 중추 신경계내의 수용체에서 작용을 하여 음식물 섭취를 억제하고, 체중을 감소하며, 에너지 소비를 촉진시키는 역할을 한다. 비만환자의 경우 시상하부가 렙틴에 지속적으로 노출됨에 따라 렙틴에 대한 저항성이 생겨 고렙틴혈증이 나타난다. 혈중에는 고농도의 렙틴이 존재하지만 식욕억제 및 대사에 대한 신호를 전달하지 못하기 때문에, 렙틴을 이용한 비만조절 약물개발은 현재 어려운 실정이다.
- [0010] AMPK(AMP kinase)는 세포 내의 에너지 항상성 유지에 센서 역할을 하는 효소로서 ATP가 고갈되어 AMP/ATP 비율이 증가하는 경우에 활성화되어 ATP 소비과정을 억제하고 ATP 생산과정을 촉진한다. AMPK는 지방산의 합성과 분해를 매개함으로써 간 지방대사의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. AMPK의 활성화는 ATP를 소비하는 지방산 합성과 콜레스테롤 합성에 필요한 효소인 acetyl-CoA carboxylase(ACC)와 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase)를 인산화하여 불활성화시키고, fatty acid synthase, pyruvate kinase 및 ACC와 같은 지질 합성에 관여하는 유전자의 발현을 억제시킨다(Foretz M. et al., J Biol Chem 273:14767-14771, 1998; Woods A. et al., Mol Cell Biol, 20:6704-6711, 2000). 또한, AMPK 활성화는 근육에서 지방산 산화를 증가시키는 역할을 하는 것으로 보고되었다 (Minokoshi Y. et al., Nature 415:339-343, 2002).
- [0011] 한편, 디벤조일메탄(Dibenzoylmethane)은 일반적으로 아래 화학식 1의 구조를 가진 화합물로 감초(Glycyrrhiza glabra)에서 추출할 수 있는 성분으로서, 자외선 차단제 (Nogueira M.A. et al., Farmaco, 58(11):1163-9, 2003), 항산화제 (Hegedus C. et al., Pharmacol Res, 72:25-34, 2013), 항암제 (Pan M.H. et al., J Agric Food Chem. 2;51(14):3977-84, 2003) 및 당뇨치료제 (Schweizer R.A. et al., Mol Cell Endocrinol. 30:212(1-2):41-9, 2003)로써 효과가 있음이 알려져 있으나, 비만 또는 콜레스테롤혈증의 치료 또는 예방과의 연관성은 알려진 바 없다.

화학식 1



- [0012]
- [0013] 이에, 본 발명자들은 비만 억제제를 개발하고자 예의 노력한 결과, 디벤조일메탄(Dibenzoylmethane)이 AMPK(AMP kinase)의 발현 또는 활성증가를 통한 비만 또는 콜레스테롤혈증 억제 효능이 뛰어나다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명의 목적은 디벤조일메탄(Dibenzoylmethane)을 유효성분으로 함유하는 비만 또는 콜레스테롤혈증의 치료 또는 예방용 의약조성물 및 비만 또는 콜레스테롤혈증 개선용 건강 기능식품을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 디벤조일메탄(Dibenzoylmethane)을 유효성분으로 함유하는 비만 치료 또는 예방용 의약조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한, 디벤조일메탄(Dibenzoylmethane)을 유효성분으로 함유하는 비만 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한, 디벤조일메탄(Dibenzoylmethane)을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤혈증(cholesterolemia) 치료 또는 예방용 의약조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명은 또한, 디벤조일메탄(Dibenzoylmethane)을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤혈증(cholesterolemia) 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명에 따르면, 디벤조일메탄(Dibenzoylmethane)은 체중 감소, 체지방 감소 및 총 콜레스테롤 감소 효과가 뛰어나, 비만 또는 콜레스테롤혈증의 치료 또는 예방에 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 DBM에 의해 skeletal muscle 세포주에서 AMP-activated kinase (AMPK)의 인산화가 증가되는 것을 확인한 실험결과이다.
- 도 2는 DBM에 의한 당섭취의 증가는 AMPK 신호전달 경로를 통해 작동한다는 것을 확인한 실험결과이다.
- 도 3는 세포 내 칼슘 이온의 방출에 의해 DBM으로 유도된 AMPK 인산화가 증가한다는 것을 확인한 실험결과이다.
- 도 4는 DBM에 의한 p38 MAPK의 인산화의 증가는 AMPK 신호전달 경로에 의해 작동한다는 것을 확인한 실험결과이다.
- 도 5는 DBM에 의해 GLUT4 유전자의 발현 및 translocation이 증가한다는 것을 확인한 실험 결과이다.
- 도 6은 DBM에 의한 체중 감소 및 체지방축적 억제를 확인한 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0022] 본 발명은 일 관점에서, 디벤조일메탄(Dibenzoylmethane)을 유효성분으로 함유하는 비만 치료 또는 예방용 의약조성물에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명의 디벤조일메탄(Dibenzoylmethane)은 AMPK (AMP kinase)의 발현 또는 활성을 증가시켜 지방대사를 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 실시예에서는, 근육전구세포에 디벤조일메탄을 처리하여, AMPK의 활성을 분석한 결과, 디벤조일메탄의 처리에 의하여 근육전구세포에서 인산화된 AMPK의 농도가 디벤조일메탄의 농도에 비례하여 증가하는 것을 확인하였고(도 1), 디벤조일메탄에 의하여 AMPK와 AMPK에 의하여 조절되는 ACC의 인산화가 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였으며(도 1); 이는 디벤조일메탄을 처리하면 세포내 칼슘의 농도가

CaMKK(Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase)에 의해 증가하였기 때문이라는 것을 확인하였다(도 3)

[0025] 본 발명의 일 실시예에서는, 디벤조일메탄의 처리에 의하여, AMPK에 의한 당 섭취능력이 증가하는 것을 확인하였고(도 2), AMPK 신호전달 과정의 하위 단계인 p38 mitogen-associated protein kinase (MAPK)의 인산화가 디벤조일메탄의 농도에 비례하여 증가하고(도 4), p38 mitogen-associated protein kinase (MAPK) 신호전달 과정의 하위 단계인 GLUT4 유전자의 발현 및 세포 표면으로의 위치이동을 촉진한다는 것을 확인하였다(도 5).

[0026] 본 발명의 디벤조일메탄은 AMPK의 인산화를 통하여 AMPK의 활성을 증가시키며, 체중증가를 감소시키므로, 비만 치료 또는 예방용 조성물 및 비만 개선용 건강기능식품의 유효성분으로 사용될 수 있다.

[0027] 다른 관점에서, 본 발명은 상기 비만 치료 또는 예방용 조성물을 유효성분으로 함유하는 비만 개선용 건강식품에 관한 것이다.

[0028] 본 발명의 다른 실시예에서는, 고지방식만을 제공한 생쥐와 고지방식과 함께 디벤조일메탄을 섞어 제공한 생쥐를 비교한 결과, 디벤조일메탄을 함께 제공한 생쥐에서 체중 감소, 체지방 감소 및 총 콜레스테롤 농도 감소가 나타나는 것을 확인하였다(도 6).

[0029] 또 다른 관점에서, 본 발명은 디벤조일메탄(Dibenzoylmethane)을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤혈증 치료 또는 예방용 의약조성물에 관한 것이다.

[0030] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 콜레스테롤혈증 치료 또는 예방용 조성물을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤혈증 개선용 건강식품에 관한 것이다.

[0031] 본 발명의 조성물은 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 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, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 혼합생약제에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0034] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0035] 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 상기 조성물은 1일 0.0001 내지 1 g/으로, 바람직하게는 0.001 내지 200 /으로 투여하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0036] 본 발명의 건강식품은 상기 디하이로진저론을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수

있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0037] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 비스킷, 떡, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0038] 본 발명에 따른 디하이로진저론은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 디하이로진저론의 양은 전체 식품중량의 0.01 내지 15중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 디하이로진저론을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0040] 상기 외에 본 발명의 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 점결제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

[0041] 그 밖에 본 발명의 디하이로진저론은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 디벤조일메탄 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0042] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 증진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calciumcarbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propyleneglycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텔솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0043] 본 명세서에 용어, "개선"이란 증상의 예방, 개선, 치료 또는 이러한 증상의 발현 지연을 포함하는 의미이다.

[0044] 본 명세서에서 용어 "비만 개선"이란 조성물의 투여로 비만의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0045] 본 명세서에서 용어 "기능성 식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0046] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식

을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0047] <실험방법>

[0048] 본 실험에 공통적으로 사용된 방법은 다음과 같다.

[0049] 사용 시약

[0050] CaMKK 저해제인 STO-609 및 metformin는 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-ribofuranoside (AICAR)는 Toronto Research Chemical Incorporation (Toronto, ON, Canada)에서 구입하였다. DBM (1, 7-bis [4-hydroxy-3-methoxyphenyl]-1, 6-heptadiene-3, 5-dione) 및 p38 MAPK 저해제인 SB203580는 Biomol International LP (Butler Pike, PA, USA)에서 구입하였다. 항 인산화-AMPK에 대한 다중클론성 항체, 항 인산화 ACC에 대한 항체, 항 인산화 p38 MAPK 항체, 항 AMPKa 항체, 항 ACC 항체, 항 p38 MAPK 항체, 및 항 actin 항체는 Millipore (MA, USA)에서 구입하였다. AMPK 저해제인 Compound C는 Merck (RY 70-100; Rahway, NJ, USA)에서 구입하였다. Hybond ECL nitrocellulose membranes은 Amersham (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다.

[0051] 세포 배양

[0052] Mouse myoblast인 C2C12 세포주, rat myoblast인 L6 세포주 및 pre-adipocyte인 3T3-L1 세포주는 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) 및 1% 항생제 (100 U/mL penicillin 및 100 g/mL streptomycin)이 첨가된 Dulbeccos modified Eagle medium (DMEM)에서 5% CO₂를 첨가하여 37°C에서 배양하였다. 당 섭취능력을 확인하기 위한 myotube로의 분화실험을 위하여, rat myoblast L6 세포주를 2X10⁴ cells/mL의 밀도로 12well 플레이트에 분주하여, 80% 이상의 confluence를 나타내도록 24시간 배양한 후, 2%(v/v) FBS를 포함하는 DMEM 배지로 전환시켜 2, 4, 및 6일간 배양하였다. myotube로의 분화가 완료된 7일 후에 당섭취 능력을 실험하였다.

[0053] Western blot 분석

[0054] C2C12, L6, 또는 3T3-L1 세포주를 60-70%의 confluence를 가지도록 6-well plate에서 배양하였다. selected agents를 처리하기에 앞서, 37°C에서 24시간의 serum starvation을 가하였다. Agent를 처리한 후, 배지를 흡입하고, 세포주를 차가운 phosphate-buffered saline (PBS)로 두 번 씻어준 뒤, 프로테아제 저해제(0.5 M aprotinin, 1 M phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1 M leupeptin) (Sigma)를 함유하는 100 L의 lysis buffer (0.5% deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS], 1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 및 50 mM Tris-HCl, [pH 8.0])를 이용하여 분쇄하였다. 상등액을 95°C에서 5분간 가열하는 sonication 과정을 거쳐 5분간의 원심분리후, 8-16% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 통해 분리한 후, polyvinylidene difluoride membranes에 transfer하였다. 상기 멤브레인에 1차 항체를 처리하고 4°C에서 overnight으로 배양한 후, 0.1%Tween 20를 포함하는 Tris-buffered saline으로 6번 씻어주었다. 그 뒤horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 2차 항체를 실온에서 처리하여 1시간 동안 배양하였다. Anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 항체가 단백질의 로딩량을 normalize하기 위하여 사용하였다. ECL Gel Electrophoresis System (Amersham Biosciences; Buckinghamshire, UK)을 이용하여 wetsern blotting 결과를 시각화 하였다. 상기 멤브레인을 스캔하여 Image J anlysis를 사용하여 densitometry 분석을 수행하였다.

[0055] RT-PCR

[0056] First-strand cDNA합성은 C2C12 세포주에서 분리한 전체 RNA 1g를 Thermoscript II one-step RT-PCR Kit (Life Technologies; Paisley, UK)에서 55°C 20분의 반응을 통해 수행하였다. 합성된 cDNA의 증폭은 inactivate reverse transcriptase를 이용한 94°C 5분의 가열 과정을 거친 뒤, Gene Amp System 9700 thermocycler (Applied Biosystems; Warrington, UK)를 사용하여 하기의 조건으로 수행하였다: 34 사이클 94°C 30초, 55°C 30초, 및 72°C 60초 및 72°C에서의 마지막 10분간 배양. PCR 사이클의 횟수는 증폭과정인 exponential phase에 있음을 확인하기 위하여 사용하였다. 각 사이클의 RT-PCR 반응 샘플에서 10ug을 채취하여 전기영동을 통해 분석하

였다. 전기영동에서 각 밴드들은 ethidium bromide를 사용하여 염색한 뒤, 자외선을 이용하여 시각화 하였다. gel documentation system (Gene Genius; Syngene, UK)을 이용하여 밴드의 강도를 정량하였다.

상기 RT-PCR에서 사용한 프라이머는 하기와 같다.

서열번호 1: GLUT4-sense (5-TTG GAG AGA GAG CGT CCA AT-3)

서열번호 2: GLUT4-antisense (5-CTC AAA GAA GGC CAC AAA GC-3)

서열번호 3: FAS-sense (5-CAC ACA CAA TGG ACC CCC AG-3)

서열번호 4: FAS-antisense (5-CAG AGG TGT TCG GCT TCA GG-3)

서열번호 5: C/EBPa-sense (5-AGG TGC TGG AGT TGA CCA GT-3)

서열번호 6: C/EBPa-antisense (5-CAG CCT AGA GAT CCA GCG AC-3)

서열번호 7: C/EBPb-sense (5-CGG GGT TGT TGA TGT TTT TGG-3)

서열번호 8: C/EBPb-antisense (5-TCG AAA CGG AAA AGG TTC TCA-3)

서열번호 9: C/EBP-sense (5-CTT CGC CGA CCT CTT CAA C-3)

서열번호 10: C/EBP-antisense (5-CGC ACA CCG CCA CTT G-3)

서열번호 11: aP2-sense (5-AAG ACA GCT CCT CCT CGA AGG TT-3)

서열번호 12: aP2-antisense (5-TGA CCA AAT CCC CAT TTA CGC-3)

서열번호 13: SCD1-sense (5-CCT TCT TGC GAT ACA CTC TGG TG-3)

서열번호 14: SCD1-antisense (5-TCA GCT ACT CTT GTG ACT CCC G-3)

서열번호 15: PPAR--sense (5-GGT GAA ACT CTG GGA GAT TC-3)

서열번호 16: PPAR--antisense (5-CAA CCA TTG GGT CAG CTC TT-3),

서열번호 17: -actin-sense (5-CAG GAG GAG CAA TGA TCT TGA-3)

서열번호 18: -actin-antisense (5-ACT ACC TCA TGA AGA TCC TCA-3).

세포 내 칼슘 농도 측정

칼슘이온의 농도는 L6 세포주를 칼슘 이온 indicator인 fluo-3 AM으로 처리하고, 공초점 현미경인 Zeiss LSM 510 Meta(Zeiss; Oberkochen, Germany)를 사용하여 관찰하였다. 상기 세포주들을 상온에서 5mM의 fluo-3 AM을 포함하는 배지에서 투입하여 45분간 배양한 뒤, 씻어내고, fluo-3 AM이 없는 배지에서 15분간 배양하였어서 방출 신호를 관찰하였다. 20X 배율의 온도 조절이 가능한 현미경에 culture plate를 투입한 뒤, 488nm에서 측정하였다.

2-Deoxy-D [H³]glucose(2-DG) 섭취 능력

당 섭취능력은 분화된 L6 myotubes에서 2-deoxy-D [H³]glucose(2-DG)의 섭취능력을 측정하여 분석하였다. 세포 주들을 37의 PBS로 씻어낸 뒤, serum-free DMEM에서 3시간 동안 배양하였다. DBM을 처리한 뒤, 세포주들을 0.5 Ci의 2-DG를 포함하는 Krebs Ringer Henseleit (KRH) 버퍼 (20 mM HEPES, pH 7.4, 130 mM NaCl, 1.4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1.2mMMgSO₄, and 1.2mMKH₂PO₄)에서 37에서 15분간 배양하였다. 상기 반응 plate를 얼음에 위치하여 멈춘 뒤, 차가운 PBS로 두 번 씻어주었다. 0.5N NaOH를 이용하여 세포주를 분쇄한 뒤, 400ul의 분쇄물과 3.5ml의 scintillation cocktail을 섞어, scintillation counting을 통하여 radioactivity를 측정하였다.

AMPKa2 silencing

[0081] Rat myoblast L6 세포주를 6-well plate에 분주 한뒤, 70%의 confluence를 나타내도록 24시간 동안 배양하였다. Lipofectamine 2000(Invitrogen;Carlsbad,CA,USA)를 사용하여 transfection을 수행하였다. 간략하자면, Dharmacon (Thermo Scientific; L-040809-00-0005)에서 구매한 AMPK2 siRNA 및 Bioneer; Daejon, Korea에서 설계하고 합성한 non-targeted control siRNA를 transfection에 사용하였다. 각 siRNA 5ul와 5ul의 Lipofectamine 2000 혼합물을 reduced serum medium (Opti-MEM; Invitrogen) 95ul와 섞어준 뒤, 30분간 실온에서 배양하고, 한 방울씩 800ul의 Opti-MEM를 포함하는 배지 well에 투입하여 최종 siRNA 농도가 100 nM가 되도록 하였다. Transfection 후 4시간 이후에, 배지를 신선한 complete medium으로 교체 하였다.

[0082] **Myc-GLUT4 translocation assay**

[0083] GLUT4myc의 세포 표면에서의 발현을 정량하기 위하여 항체와 결합한 colorimetric absorbance assay를 수행하였다(N. Wijesekara, A. Tung, F. Thong, A. Klip. (2006) Muscle cell depolarization induces a gain in surface GLUT4 via reduced endocytosis independently of AMPK. Am J Physiol Endocrinol Metab 290: E1276-1286). DBM을 처리한 GLUT4myc를 안정적으로 발현하는 L6 세포주에 with polyclonal 항-myc 항체(1:1000)를 60분간 처리한 뒤, 4% paraformaldehyde를 포함하는 PBS에서 10분간 배양하고, HRP가 결합된 goat 항-rabbit IgG 항체 (1:1000)를 처리하였다. PBS를 이용하여 상기 세포주를 6회 씻어준 뒤, OPD reagent (0.4 mg/mL) 1ml을 30분간 처리하고, 492nm에서 상층액의 흡광도를 측정하였다.

[0084] **High fat diet in mice**

[0085] Dae Han Bio Link Co. (Chungbuk, Korea)에서 4주된 수컷 C57BL/6 mice를 구입하였다. 상기 쥐들을 4주간 상용 사료를 이용하여 키웠다. 8주차때, 랜덤하게 10마리씩 3그룹으로 나누고, HFD를 주거나, HFD와 DBM(100mg/kg)을 주거나, 상용 사료를 배식하여 12주간 키웠다. 매 주, 사료 소모량 및 몸무게를 측정하여 기록하였다. 12주가 지난 뒤, Zoletil (Virvac Laboratories; Carros, France)을 사용하여 안락사 시킨뒤, 추후 분석에 이용하였다.

[0086] **데이터 분석**

[0087] 인슐린 방출의 강도를 측정하기 위하여, one-way ANOVA, Holm-Sidak comparisons 및 post-hoc Fisher test를 사용하였다. 각 평균값의 차이는 p-value가 0.05보다 작을 때, 통계적으로 의미있는 값으로 사용하였다.

[0088] **실시예 1. DBM에 의한 skeletal muscle cells에서의 인산화된 AMPK의 농도 증가**

[0089] C2C12 myoblasts에 미치는 DBM의 영향을 분석하기 위하여, 당 섭취에 필수적인 AMPK 효소의 활성화를 측정한 결과, DBM의 농도 및 시간에 비례하여 인산화된 AMPK가 증가하는 것을 확인하였다(도 1A, B). DBM은 curcumin의 analog로서, AMPK의 인산화와 그 신호전달 단계의 하위단계인 ACC의 인산화에 더욱 강력한 영향을 끼치는 것을 확인 하였다(도 1C). 당 섭취 능력을 비교한 결과, DBM은 AMPK activator로 알려진 metformin과 비슷한 강도를 나타내는 것을 확인하였다(도 1D). 이러한 결과를 통해, DBM이 C2C12 세포주에서 AMPK의 인산화를 증가시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

[0090] **실시예 2. DBM에 의한 2-DG 섭취의 증가**

[0091] L6 myotubes가 당 섭취 능력을 시험하는데 좋은 대상이라는 것은 알려져 있다(V. Sarabia, T. Ramlal, A. Klip. (1990) Glucose uptake in human and animal muscle cells in culture. Biochem Cell Biol 68: 536-542.). 따라서, 분화된 L6 세포주를 이용하여 DBM에 의한 2-DG의 섭취능력을 시험한 결과, DBM에 의하여 2-DG의 섭취가 증가하는 것을 확인하였다(도 2A). AMPK 저해제인 compound C를 2uM 사전 처리한 결과, DBM에 의해 유도된 2-DG의 섭취가 저해되는 것으로 보아, AMPK가 DBM에 의해 유도된 당섭취에서 핵심적인 역할을 함을 알 수 있었다.

[0092] 이를 확인하기 위하여, AMPK2 knockdown에 의한 당 섭취 능력을 확인하였다. AMPK2 short interfering RNA

(siRNA)를 transfection한 뒤, AMPK2의 발현이 저해된 것을 항-AMPK 항체를 이용한 웨스턴 블로팅을 통하여 확인하였다. AMPK2 siRNA를 처리한 세포주에서는 DBM에 의해 유도되는 당 섭취가 관찰되지 않았다(도 2B). AMPK2 K45R kinase 비활성 변이체 역시, DBM의 효과를 억제하였다(도 2C). 도 2D에 나타난 바와 같이, (GFP)-tagged AMPK2 K45R변이체는 약 30-40%의 세포에 transfection된 것을 확인할 수 있다. 상기 결과들을 통하여, AMPK2가 DBM에 의해 유도되는 당 섭취 능력에 중요함을 확인할 수 있었다.

실시예 3. 세포 내 칼슘 이온에 의한 DBM에 의해 유도된 AMPK 인산화

APMK 신호전달 경로의 상위 단계를 더욱 분석하기 위하여 세포 내 칼슘이온의 농도를 fluo-3 AM 칼슘 결합 형광 염색물질을 이용하여 측정한 결과, L6 세포주에서 DBM이 형광강도를 증가시키는 것을 확인하였다(도 3A). 이러한 결과는 AMPK 신호전달 경로의 상위 단계에서 작동하는 CaMKK가 중요한 역할을 한다는 것을 의미하고, 이를 확인하기 위하여 CaMKK 저해제인 STO-609를 첨가한 결과, AMPK의 인산화가 저해되고(도 3B), DBM에 의해 유도되는 2-DG의 섭취가 저해되는 것을 확인하였다(도 3C). 이러한 결과를 통하여, DBM에 의해 유도되는 당 섭취는 칼슘에 의해 매개되는 CaMKK/AMPK 신호전달 경로를 통하여 작동한다는 것을 확인하였다.

실시예 4. DBM에 의한 p38 mitogen-associated protein kinase (MAPK) 인산화의 증가

APMK 신호전달 경로의 더욱 분석하기 위하여, AMPK의 하위 단계에서 작동하는 p38 MAPK의 인산화를 측정하였다. DBM을 처리한 결과, C2C12 세포주에서 p38 MAPK의 인산화가 증가하는 것을 확인하였다(도 4A). AMPK의 저해제인 compound C를 처리한 결과, DBM에 의해 유도되는 p38 MAPK의 인산화가 저해되는 것을 확인하였다(도 4B). 더욱이, DBM에 의해 유도되는 2-DG의 섭취가 p38 MAPK 저해제인 SB203580을 처리할 경우, 저해되는 것을 확인하였다(도 4C). 이러한 결과를 통해, DBM에 의해 유도되는 당 섭취는 AMPK 의존적인 p38 MAPK의 활성화에 의해 조절된다는 것을 확인할 수 있었다.

실시예 5. DBM에 의한 GLUT4의 발현 및 GLUT4 translocation의 증가

p38 MAPK의 활성화에 DBM이 영향을 미치므로, 이의 하위단계에서 작동하는 GLUT4 유전자의 발현에도 영향을 미치는지를 확인하였다. DBM을 처리한 C2C12 세포주에서 GLUT4 mRNA의 농도가 증가하는 것을 확인하였고(도 5A), 단백질의 농도 역시 증가하는 것을 확인하였다(도 5B). HRP-conjugated 2차 항체와 융합한 colorimetric assay를 사용한 결과, GLUT4myc의 세포 표면에서의 발현이 증가하는 것을 확인하였으며, 이러한 결과는 compound C를 처리한 결과 관찰되지 않는 것을 확인하였다(도 5C). 이러한 결과를 통해 DBM에 의해 유도되는 당 섭취는 GLUT4의 발현 및 GLUT4의 translocation의 촉진을 통해 작동한다는 것을 확인 하였다.

실시예 5. DBM의 고지방에 의해 유도된 비만 모델에서의 체중 감소 및 지방 축적 감소 효과

HFD(High-Fat Diet)에 의해 유도된 몸무게의 증가에 DBM이 영향을 미치는 지를 확인하였다. DBM을 꾸준히 섭취한 결과, HFD에 의해 유도된 몸무게의 증가가 억제되는 것을 확인하였다(도 6A). 체지방의 저장을 확인하기 위하여, 복부 지방의 사진을 찍어 관찰한 결과, DBM을 HFD와 같이 섭취한 쥐에서 지방의 저장량이 현저히 적은 것을 확인하였다(도 6B, C). 간에서의 지방 저장 역시, DBM의 섭취에 의해 억제되는 것을 확인하였다(도 6D). HFD만 섭취한 쥐에 비해 DBM을 같이 섭취한 쥐에서는 인슐린의 농도 역시 감소하는 것을 확인하였으며(도 6E), 혈당 역시 약간 낮은 것을 확인하였다(도 6F). Leptin의 농도는 크게 차이가 나지 않았다(도 6G). 지방 합성 억제 효과를 확인하기 위하여 지방산 합성의 핵심 효소인 acetyl-CoA carboxylase(ACC)의 인산화를 측정한 결과, DBM에 의하여 ACC의 인산화가 증가하는 것을 확인하였다(도 6H). ACC의 인산화는 ACC의 활성의 감소를 타나내므로, DBM에 의한 지방 합성 억제효과가 나타남을 확인할 수 있었다.

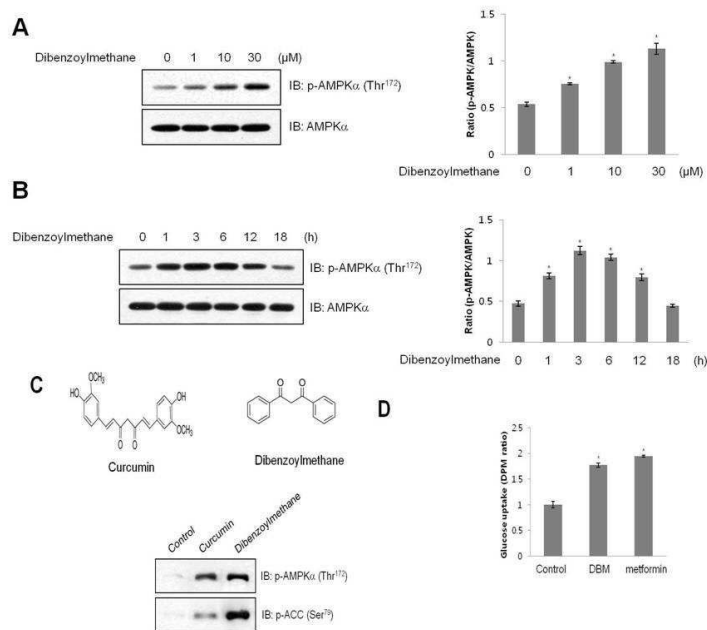
DBM의 작동기작을 추가로 분석하기 위하여, 지방합성과 관련된 여러 유전자들의 RT-PCR 분석을 수행하였다. FAS 유전자의 발현이 DBM의 처리에 의하여 획기적으로 감소되는 것을 확인하였고(도 6I), 이는 AMPK2 knockdown 조건에서는 관찰되지 않았다(도 6J). 이러한 결과를 통하여, DBM에 의한 지방 합성 억제효과는 AMPK에 의해 매개되는 지방 합성 유전자의 발현 억제를 통해 작동한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0102]

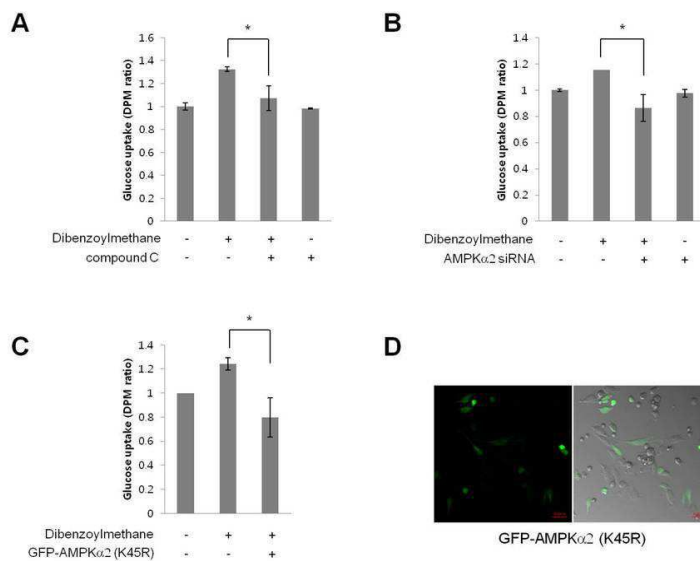
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

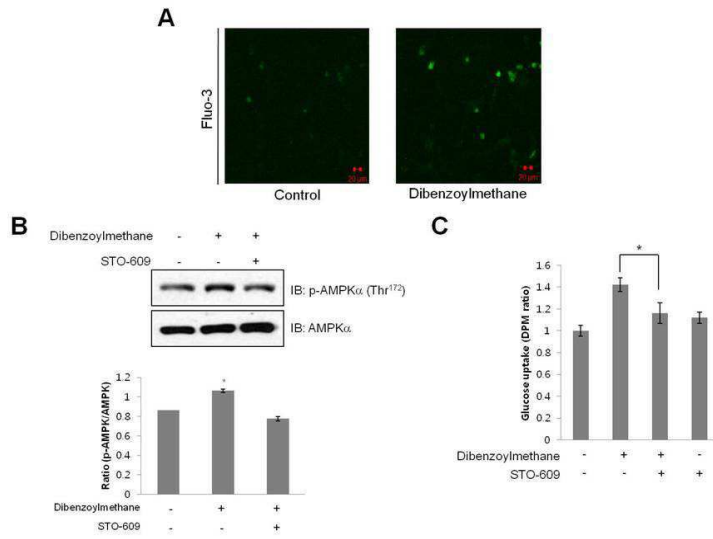
도면1



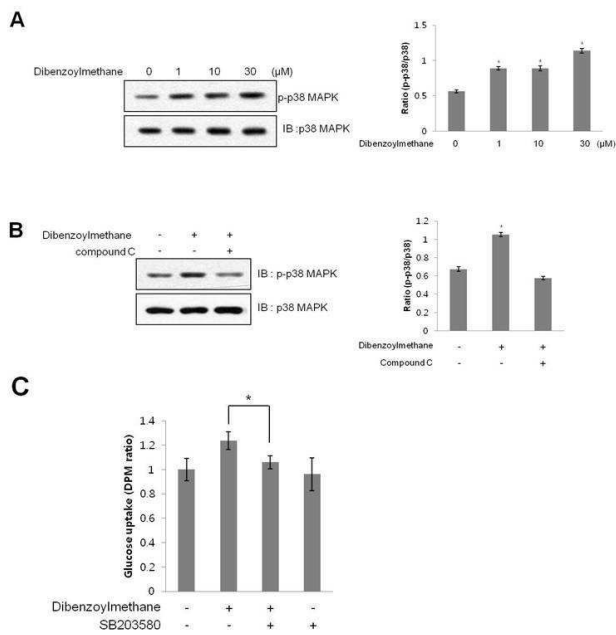
도면2



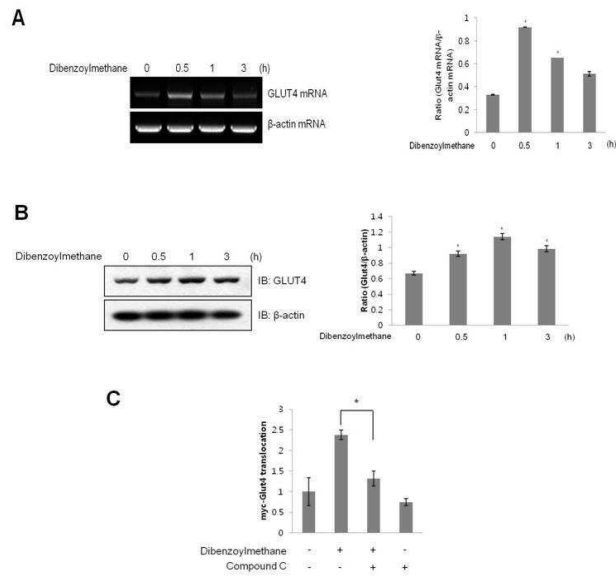
도면3



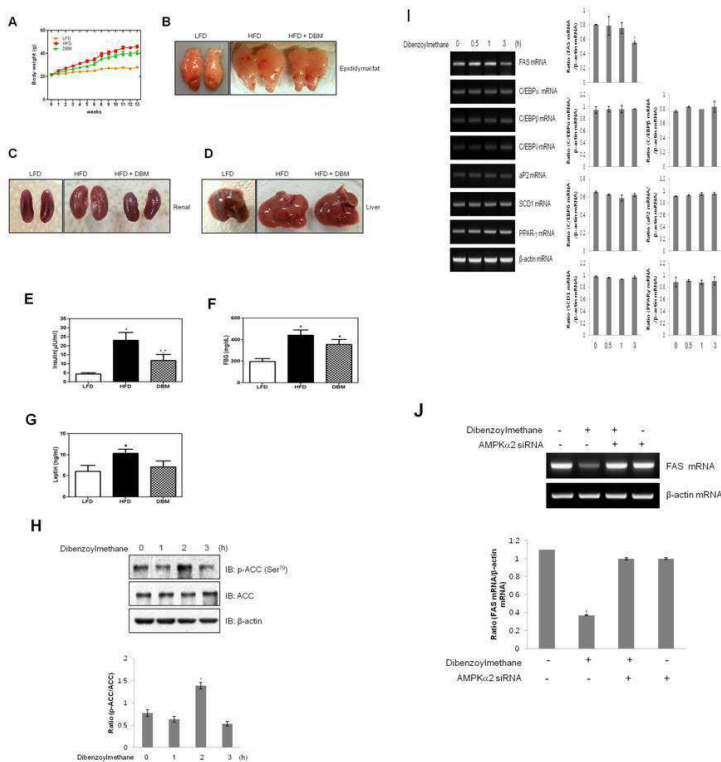
도면4



도면5



도면6



서열목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Composition for Anti-obesity Containing Dibenzoylmethane
- <130> P14-B302

<150>	KR 10-2013-0114230	
<151>	2013-09-26	
<160>	18	
<170>	KopatentIn 2.0	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GLUT4-sense	
<400>	1	
	ttggagagag agcgtccaat	20
<210>	2	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><		
223>	GLUT4-antisense	
<400>	2	
	ctcaaagaag gccacaaagc	20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	FAS-sense	
<400>	3	
	cacacacaat ggacccccag	20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	FAS-antisense	
<400>	4	
	cagaggtgtt cggcttcagg	20
<210>	5	

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	C/EBPa-sense	
<400>	5	
	aggtgctgga gttgaccagt	20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	C/EBPa-antisense	
<400>	6	
	cagcctagag atccagcgac	20
<210>	7	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	C/EBPb-sense	
<400>	7	
	cggggttgtt gatgtttttg g	21
<210>	8	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	C/EBPb-antisense	
<400>	8	
	tcgaaacgga aaaggttctc a	21
<210>	9	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta-actin-antisense	
<400>	9	
	cttcgccgac ctcttcaac	19

<210>	10	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta-actin-antisense	
<400>		
>	10	
	cgcacaccgc cacttg	16
<210>	11	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta-actin-antisense	
<400>	11	
	aagacagctc ctctcgaag gtt	23
<210>	12	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	aP2-antisense	
<400>	12	
	tgaccaaadc cccatttacg c	21
<210>	13	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SCD1-sense	
<400>	13	
	ccttcttgcg atacactctg gtg	23
<210>	14	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SCD1-antisense	

<400>	14	
tcagctactc ttgtgactcc cg		22
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PPAR-gamma-sense	
<400>	15	
ggtgaaactc tgggagattc		20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PPAR-gamma-antisense	
<400>	16	
caaccattgg gtcagctctt		20
<210>	17	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta-actin-sense	
<400>	17	
caggaggagc aatgatcttg a		21
<210>	18	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta-actin-antisens	
<400>	18	
actacatcat gaagatcctc a		21