



- (51) 국제특허분류:
A61K 31/765 (2006.01) A61K 31/195 (2006.01)
A61K 31/74 (2006.01) A61P 3/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/008158
- (22) 국제출원일: 2012년 10월 9일 (09.10.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (71) 출원인: 주식회사 바이오리더스 (BIOLEADERS CORPORATION) [KR/KR]; 305-500 대전광역시 유성구 용산동 559, Daejeon (KR). 국민대학교산학협력단 (KOOKMIN UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 136-702 서울특별시 성북구 정릉동 861-1 국민대학교, Seoul (KR). 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-333 대전광역시 유성구 어은동 52, Daejeon (KR). 인제대학교 산학협력단 (INJE UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 621-170 경상남도 김해시 여남동 607, Gyeongnam (KR).
- (72) 발명자: 성문희 (SUNG, Moon-Hee); 305-308 대전광역시 유성구 장대동 283-4 번지 갤러리빌 2차 902호, Daejeon (KR). 최재철 (CHOI, Jae-Chul); 305-751 대전

광역시 유성구 송강동 송강그린아파트 301-501, Daejeon (KR). 강재현 (KANG, Jae Heon); 137-797 서울특별시 서초구 잠원동 신반포한신 2차아파트 108-702, Seoul (KR). 장문경 (JANG, Moon-Jeong); 135-507 서울특별시 강남구 삼성동 105 삼성래미안 아파트 501-403, Seoul (KR). 임지영 (IMM, Jee-Young); 121-847 서울특별시 마포구 성산 1동 256-11 진흥테크빌 402, Seoul (KR). 부하령 (POO, Haryoung); 305-720 대전광역시 유성구 신성동 대림두레아파트 103-1405, Daejeon (KR).

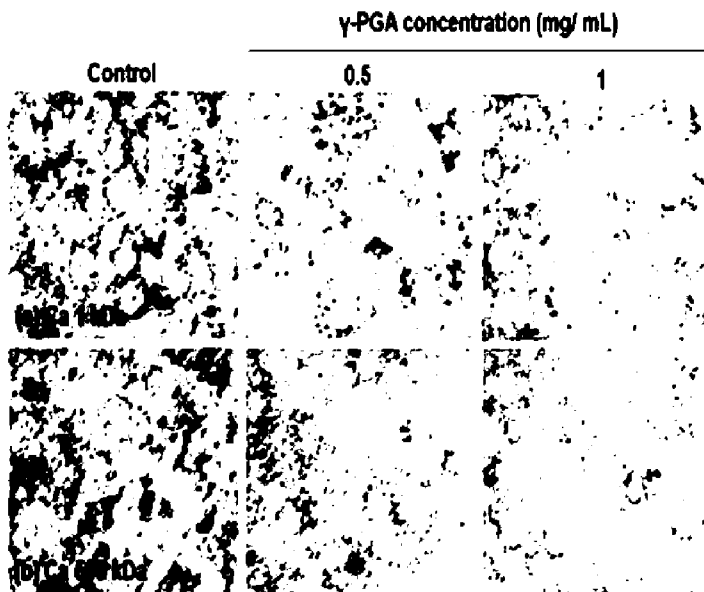
- (74) 대리인: 이처영 (LEE, Cheo Young); 135-080 서울특별시 강남구 역삼동 648-23 여삼빌딩 11층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION CONTAINING POLY-GAMMA GLUTAMIC ACID FOR IMPROVING BLOOD TRIGLYCERIDE LEVELS

(54) 발명의 명칭: 폴리감마글루탐산을 함유하는 혈중 중성지방 개선용 조성물

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for improving blood triglyceride levels, the composition containing, as an active ingredient, 100-5000kDa of molecular weight of a poly-gamma glutamic acid, and more particularly, to a composition for improving blood triglyceride levels, the composition containing, as an active ingredient, 100-5000kDa of molecular weight of a poly-gamma glutamic acid, which inhibits the generation of fat in adipocytes and reduces the expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and adipocyte differentiation-related transcription factors, thereby improving blood triglyceride levels. The composition containing the poly-gamma glutamic acid according to the present invention is not toxic, does not have side effects, and is safe, and thus can be ingested for a long time for the purpose of prevention, and is useful in preventing and treating metabolic diseases caused by triglycerides.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 분자량 100Da~5,000kDa의 폴리감마글루탐산을 유효성분으로 함유하는 혈중 중성지방 개선용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 지방세포에서의 지방생성을 억제시키고, glucose-6- phosphate dehydrogenase 활성 및 지방분화 관련 전사인자 발현을 감소시켜 혈중 중성지방 수치를 개선시키는 분자량 100Da~5,000kDa의 폴리감마글루탐산을 유효성분으로 함유하는 중성지방 개선용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 폴리감마글루탐산 함유 조성물은 독성 및 부작용이 없어 안전하여 예방 목적으로 장기복용이 가능하며, 중성지방에 의한 대사성질환을 예방 및 치료에 유용하다.

명세서

발명의 명칭: 폴리감마글루탐산을 함유하는 혈중 중성지방 개선용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 분자량 100Da~5,000kDa의 폴리감마글루탐산을 유효성분으로 함유하는 혈중 중성지방 개선용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 지방세포에서의 지방생성을 억제시키고, glucose-6- phosphate dehydrogenase 활성 및 지방분화 관련 전사인자 발현을 감소시켜 혈중 중성지방 수치를 개선시키는 분자량 100Da~5,000kDa의 폴리감마글루탐산을 유효성분으로 함유하는 중성지방 개선용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 중성지방은 우리 몸속에 존재하는 지질의 한 종류로 트리글리세라이드라고도 한다. 지방조직에 가장 많이 들어 있는 것이 중성지방이다. 중성지방의 가장 큰 역할은 체내 활동의 에너지원이 되는 것이며, 에너지를 저장하는 성질 때문에 저장지방이라고도 불리며 유리지방산도 이 부류이다. 콜레스테롤이나 인지질 등도 지질이지만 중성지방처럼 에너지가 되지 않고 세포막처럼 몸의 구조를 이루는 재료가 되어 구조지질이라고 불린다. 중성지방은 근육 등에서 에너지로 사용되는데 남은 분량은 지방조직 속 지방세포에 저장되며 이 저장량이 일정량 이상 증가한 상태가 비만이다.
- [4] 음식물에서 섭취한 중성지방은 소장에서 쓸개즙이라는 소화액과 췌장액에 들어 있는 지방분해효소에 의해 흡수되기 쉬운 작은 형태(유리지방산과 글리세롤)로 분해된다. 흡수된 후에는 중성지방으로 합성되어 혈액을 타고 몸 전체에 운반된다. 음식으로 섭취된 혈액 속의 포도당은 대부분 중성지방처럼 에너지로 사용되지만 남은 것은 간으로 운반된다. 중성지방의 재생 공장인 간은 운반되어온 포도당과 지방세포에서 방출된 유리지방산을 합성해 새로운 중성지방을 만들어낸다.
- [5] 지방세포는 중성지방을 축적하는 역할 외에도 호르몬과 비슷한 물질을 분비하는 역할을 한다. 지방세포가 분비하는 물질인 아디포사이토카인은 대사가 활발하게 이루어지는 내장지방의 지방세포에서 더 많이 분비하게 되며 지방세포가 비대해지면 해로운 아디포사이토카인 분비량이 증가하게 되어 동맥경화나 고혈압, 당뇨병 등이 생길 위험이 높아진다.
- [6] 중성지방은 1g당 9kcal의 에너지를 내는데 중성지방 자체로는 에너지로의 기능을 하지 못하고 유리지방산이라는 지질로 분해되어야 한다. 리파아제는 지방세포와 혈액 속에 있는 중성지방을 유리지방산과 글리세롤로 분해하고 유리지방산은 혈액 속에서 근육으로 운반되어 연소된다. 에너지로 사용되지

못한 유리지방산은 혈액 속을 흐르다 간에 흡수된다. 필요 이상으로 분해되고 남은 유리지방산은 지방세포안에서 중성지방으로 합성되어 지방세포에 축적되는데 너무 많이 쌓이면 지방세포가 비대해지며 배출되는 유리지방산의 양도 증가하게 된다. 유리지방산이 혈액 속에 많으면 포도당과 합성되는 양도 많아져 중성지방이 점점 증가하게 된다. 이런 식으로 중성지방과 내장지방의 악순환이 계속되는 것이다.

- [7] 대사증후군은 내장지방형 비만을 중심으로 몇가지 위험 인자가 모인 상태를 가리키는 새로운 질환으로써 그 위험 인자는 내장지방형 비만, 고지혈증, 고혈압, 고혈당의 네 가지이다. 이러한 위험인자 중에서 내장지방형 비만을 포함하여 세가지 이상의 위험 인자가 있으면 대사증후군으로 진단된다. 대사증후군의 위험 인자를 가진 사람은 위험 인자가 없는 사람보다 협심증이나 심근경색 등 심장병에 걸릴 위험이 크다.
- [8] 중성지방의 치료를 위해서는 운동과 식이 조절이 가장 중요하며, 식단은 저열량 식이로 지방이 많이 포함된 음식을 줄여야 한다. 단순히 기름진 것을 적게 먹는다는 개념이 아니라, 탄수화물까지를 포함해서 적게 먹는 것이 필요하다. 몸무게가 많은 경우 체중감량 만으로도 중성지방 수치 및 각종 당뇨나 각종 심혈관계합병증의 위험을 줄일 수 있게 된다. 약물적인 방법으로는 fibrate제제(gemfibrozil, fenofibrate)를 사용할 수 있다. 이 약품은 중성지방 수치를 35-50% 정도 수치를 낮출 수 있는 것으로 알려져 있으나 타 약품을 복용시에 근육병증의 위험성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 다른 약물로는 statins, nicotinic acid, 고용량의 오메가3지방산이 효과가 있으며, 중성지방을 낮추기 위해서 statin을 복용하는 경우는 LDL을 낮추기 위해서 복용하는 것보다 더 고용량을 사용해야 하는 단점이 있으며, 고용량의 오메가3지방산을 복용하는 것도 ~40%정도 중성지방을 낮출수 있는것으로 알려져 있다.
- [9] 폴리감마글루탐산(γ -PGA)은 미생물에 의해 생산되는 점액성 물질이다. 폴리감마글루탐산은 벚짚을 이용한 한국의 전통 콩 발효식품인 청국장, 일본의 전통 콩 발효식품인 낫또, 네팔의 전통 콩 발효식품인 키네마 등에서 분리된 바실러스 속 균주로부터 생산된다. 바실러스 속 균주로부터 생산되는 폴리감마글루탐산은 식용, 수용성, 음이온성 및 생분해성 고분자물질로 흡습제, 보습제 및 화장품의 원료물질로 이용이 가능하다.
- [10] 본 발명자들은 고분자량 폴리감마글루탐산 및 그 이용방법에 대한 물질특허(대한민국 등록특허 제399091호), 고분자량의 폴리감마글루탐산을 생산하는 내염성 균주 바실러스 서브틸리스 청국장 균주를 사용하여 폴리감마글루탐산을 생산하는 방법에 관한 특허(대한민국 등록특허 제500796호)를 획득하였으며, 그 외에 폴리감마글루탐산을 함유하는 향암조성물, 면역보강제, 면역증강제 및 바이러스 감염 억제에 대한 특허(대한민국 등록특허 제496606호, 대한민국 등록특허 제517114호 및 대한민국 등록특허 제475406호, 대한민국 등록특허 제0873179호)를 획득한 바

있다. 또한, 폴리감마글루탐산의 면역증강을 통한 항암기능을 밝힘으로써 [Poo, H. R. et al., *Journal of Immunology*, 178:775, 2007, Poo, H. R. et al., *Cancer Immunol Immunother*, 59:11,2010], 폴리감마글루탐산의 의약 용도에 대한 연구가 진행되는 등, 폴리감마글루탐산에 대한 지속적인 용도 개발을 수행하며 다양한 효능들을 연구하였다.

- [11] 이에, 본 발명자들은 폴리감마글루탐산의 중성지방 개선에 대한 효과를 확인하고자 예의 노력한 결과, 분자량 100Da~5,000kDa의 폴리감마글루탐산이 고분자량의 폴리감마글루탐산보다 효과적으로 지방세포에서의 지방생성을 억제시키고 지방세포에서 활성이 증가되는 glucose-6-phosphate dehydrogenase 활성을 억제하고 지방분화 관련 전사인자 발현을 감소시킴으로써 중성지방 수치를 개선시키는 것을 확인하고, 분자량 100Da~5,000kDa의 폴리감마글루탐산이 중성지방에 의한 대사성질환을 예방 또는 치료할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[12]

[13] 발명의 요약

- [14] 본 발명의 주된 목적은 혈중 중성지방 개선에 대한 효과가 있는 폴리감마글루탐산 또는 그의 염을 유효성분으로 함유하는 혈중 중성지방 개선용 약학조성물을 제공하는 데 있다.

- [15] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 폴리감마글루탐산 또는 그의 염을 유효성분으로 함유하는 혈중 중성지방 개선용 약학조성물 및 건강기능식품을 제공한다.

[16]

도면의 간단한 설명

- [17] 도 1은 폴리감마글루탐산의 지방생성 억제 효능을 나타낸 것이다.
- [18] 도 2는 폴리감마글루탐산에 의한 지방세포 내 포도당-6-인산탈수소효소 활성 억제 효능을 나타낸 것이다.
- [19] 도 3은 폴리감마글루탐산에 의한 PPAR γ 와 C/EBP α 의 mRNA 발현 감소를 나타낸 것이다.
- [20] 도 4는 폴리감마글루탐산에 의한 SREBP1c의 발현 감소를 나타낸 것이다.
- [21] 도 5는 폴리감마글루탐산에 의한 leptin과 fatty acid synthase의 mRNA 발현 감소를 나타낸 것이다.
- [22] 도 6은 고중성지방혈증을 유도시킨 동물모델에서의 폴리감마글루탐산의 혈중 중성지방 감소 효능을 나타낸 것이다.
- [23] 도 7은 고중성지방혈증을 유도시킨 동물모델에서의 간내 포도당-6-인산탈수소효소 활성 억제 효능을 나타낸 것이다.

[24]

- [25] 발명의 상세한 설명 및 구체적인 구현예

- [26] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [27] 본 발명은 분자량 100Da~5,000kDa의 폴리감마글루탐산 또는 그의 염을 유효성분으로 함유하는 혈중 중성지방 개선용 약학조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.
- [28] 본 발명에 있어서, 상기 염은 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 마그네슘염, 암모늄염 및 아연염으로 구성된 군에서 선택되는 것임을 특징으로 할 수 있다.
- [29] 본 발명에 있어서, 분자량 100Da 이하의 폴리감마글루탐산을 사용할 경우, 중성지방저해 효과를 기대할 수 없으며, 분자량 5,000kDa 이상의 폴리감마글루탐산을 사용할 경우, 중성지방 저해능이 현저히 감소하였다.
- [30] 본 발명의 일 양태에서는 바실러스 서브틸리스 청국장 균주가 생산하는 폴리감마글루탐산을 사용하였으며, 폴리감마글루탐산 나트륨염, 폴리감마글루탐산 칼슘염 및 폴리감마글루탐산 암모늄염을 사용하였다.
- [31] 본 발명의 약학조성물은 폴리감마글루탐산 또는 그의 염을 유효성분으로 함유하고 있으며, 폴리감마글루탐산은 이미 식품 및 화장품 계통에서 주요성분으로 구성되어 제조되고 시판되어 널리 이용되고 있는 것으로 알려져 있다.
- [32] 본 발명의 일양태에서는 폴리감마글루탐산을 처리한 지방세포에서 지방구 생성 효과를 확인하였을 때, 1kDa의 폴리감마글루탐산을 처리하였을 때 500kDa의 폴리감마글루탐산 보다 지방축적 저해율이 우수하다는 것을 확인하였으며, GPDH(glycerol -3-phosphate dehydrogenase) 활성을 측정하였을 때, 1kDa의 저분자 폴리감마글루탐산을 처리하였을 때 GPDH 활성이 500kDa 폴리감마글루탐산을 처리하였을 때 보다 현저히 저해되는 것을 확인하였다.
- [33] 또한, 지방분화 관련 전사인자 발현에 있어서도, 1kDa 폴리감마글루탐산을 처리한 지방전구세포에서 지방분화지표인 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현이 500kDa 폴리감마글루탐산을 처리한 지방전구세포보다 훨씬 더 저해되는 것을 확인하였다.
- [34] 본 발명의 다른 양태에서는 생리적 섭취 수준 즉, 일상적 섭취 수준에서 γ PGA의 중성지방 개선 효과를 확인하기 위하여, 동물에 고지방 식이를 이용하여 비만, 고지혈증을 유발한 후 γ PGA 및 염 형태의 γ PGA를 식이 무게의 0.1% 수준(0.2g/kg 몸무게) 수준에서 섭취케 한 후 체중증가, 식이 섭취량, 체내 지질대사, 혈당, 지방세포 조직학적 형태 및 지방합성 효소 유전자 발현에 미치는 영향을 분석한 결과, 정상체중군에서는 γ PGA나 염 형태의 γ PGA 섭취시 체중증가에는 영향을 주지 않았고, 고지방식이군에서 0.1% γ PGA 첨가시 체중증가를 유의적으로 억제하였으며, 염의 형태가 아닌 γ PGA에서 가장 체중증가량이 적었다.

- [35] 실험동물의 간, 신장주변 지방과 부고환 지방의 무게를 측정한 결과, 간과 부고환의 지방 무게, 신장주변 지방무게는 10% 지방식이를 섭취하였던 저지방식이군이 45% 지방을 섭취하였던 고지방식이군에 비해 유의하게 낮게 나타났고, 비만 유도시 간, 부고환 지방의 무게는 γ PGA 섭취에 의한 영향이 나타나지 않았다. 그러나 내장지방인 신장주변의 지방은 γ PGA 섭취로 인해 유의하게 낮아졌으며 γ PGA 섭취시 염 형태의 γ PGA 섭취에 비해 가장 낮아서, γ PGA 섭취는 내장지방의 발달을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 신장주변의 지방세포의 형태학적 발달은 정상체중군에 비해 비만 유발군의 지방세포의 크기가 컸으며, γ PGA 섭취로 인해 지방세포의 크기가 작아졌으며 이는 정상체중군이나 비만 유발군에서 모두 γ PGA 섭취의 영향이 있었다. 지방세포의 크기는 정상체중군에 비해 비만 유발군에서 지방세포의 크기가 유의하게 커졌으며, γ PGA 섭취로 인해 정상체중군이나 비만 유발군에서 지방세포가 작아졌으며 염 형태의 γ PGA에 의한 차이는 없었고, γ PGA는 내장지방의 발달을 억제하는 것을 알 수 있었다.
- [36] 본 발명의 다른 실시예에서, 혈장 내 중성지방 농도는 저지방식이군에 비해 고지방식이군이 낮았으나 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤은 유의하게 높았으며, HDL-콜레스테롤은 유의하게 낮아졌다. 정상체중군인 저지방식이군에서 γ PGA 섭취시 혈중 중성지방을 감소시켰으며 칼슘염 형태의 γ PGA 섭취군에서 가장 혈중 중성지방을 감소시켰다. 혈중 총 콜레스테롤 농도도 정상체중군에서 γ PGA 섭취에 의해 감소하였으며 칼슘염 형태의 γ PGA 섭취군에서 가장 낮았다. 고지방식으로 비만을 유도시 HDL 콜레스테롤이 감소하나 γ PGA는 HDL 콜레스테롤을 상승시키는 효과가 있었으며 γ PGA 섭취군에서 가장 높았다. 혈중 LDL 콜레스테롤은 비만 유도군에서 높았으나 모두 정상범위였고, γ PGA 섭취에 의한 효과는 없었다.
- [37] 간 조직 내의 총 지방과 콜레스테롤함량은 비만 유발군에서 유의하게 증가하였다. γ PGA 섭취시 정상 체중군에서 총 지방과 콜레스테롤 축적을 억제하였으며, γ PGA보다 염 형태의 γ PGA에서 그 효과가 더 높았다. 비만 유발군에서 염형태의 γ PGA의 섭취는 총 지방과 콜레스테롤 축적을 억제하는 경향이었으나 유의적이지는 않았다.
- [38] 포도당-6-인산탈수소효소(glucose-6-phosphate dehydrogenase)의 mRNA를 실시간 RT-PCR로 측정한 것은 도 2와 같으며, γ PGA의 섭취시 포도당-6-인산탈수소효소 유전자의 발현을 유의하게 억제하였으며 칼슘염 형태의 γ PGA 섭취군에서 가장 유전자 발현이 낮았다. γ PGA 섭취의 효과는 정상체중군과 비만 유발군 모두에서 유의하여 γ PGA 섭취시 지방합성을 유의하게 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었으며, 이로 인해 간 내 지방 축적, 지방세포 크기를 감소시킬 수 있는 것으로 판단된다.
- [39] 본 발명의 또 다른 양태에서는 기존 전임상 및 인체시험 자료 분석을 통하여, 1차적으로 확인한 폴리감마글루탐산의 콜레스테롤 개선 기능성을 인체에서

확인하기 위해 인체시험을 실시한 결과, 피험자 각 실험군과 대조군의 나이 및 임상시험 평균 복용량은 통계적으로 유의한 차이가 없었으며, 8주 후 혈압 및 맥박의 각 군간의 변화에서 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다. 8주 후 체중 및 신체계측 변화를 살펴보면 각 군간 비교에서 통계적으로 유의한 차이가 나타나는 변수는 없었으나, 대조군에 비해 0.15g 섭취군에서는 체질량지수가 대조군과 비교하여 감소하는 경향을 보였으며, 혈중 중성지방 수치는 유의적으로 감소한 것으로 나타났다.

[40] 본 발명에 따른 중성지방 개선용 약학조성물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태, 투여경로 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위하여, 1회 투여량은 0.1~10 g/kg이 바람직하며, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 또한, 연령, 성별, 체중 및 건강상태에 따라 증감될 수 있다.

[41] 본 발명의 중성지방 개선용 약학조성물은 혈중 중성지방 개선을 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있다. 본 발명의 중성지방 개선용 약학조성물은 건강기능식품 1일 섭취량에 대하여, 0.05 g~2 g이 바람직하며, 1일 섭취량 0.05 g 이하일 경우, 중성지방 개선 효과를 기대할 수 없으며, 2g 이상일 경우 함량증가에 따른 중성지방 개선 효과를 기대할 수 없을 뿐만 아니라 고비용을 초래하여, 경제적이지 못하다.

[42] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명이 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[43]

[44] 실시예 1: 고분자량 폴리감마글루탐산 및 그 염의 제조

[45]

[46] 폴리감마글루탐산 생산용 기본배지(3%의 L-글루탐산이 첨가된 배지; 글루코오스 3%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1%, KH_2PO_4 0.27%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/12\text{H}_2\text{O}$ 0.17%, NaCl 0.1%, 시트르산나트륨(Sodium citrate) 0.5%, Soypeptone 0.02%, $\text{MgSO}_4/7\text{H}_2\text{O}$ 0.7%, 비타민용액(Vitamin solution) 10ml/l, pH 6.8)을 멸균시켜 준비하고, 5ℓ 발효기(Jar fermentor, working volume은 3ℓ)에 바실러스 서브틸리스 청국장 균주(*Bacillus subtilis* var chungkookjang, KCTC0697BP)의 종균 배양액(LB 배지)을 4% 접종하여 발효시켰다. 교반속도는 500rpm, 공기주입속도는 1.0vvm으로 하여 37°C에서 48시간 동안 발효시킨 후 필터프레스(규조토 함유)를 사용하여 균체를 제거하여 폴리감마글루탐산 함유 시료 액을 수득하였다.

[47] 폴리감마글루탐산 함유 시료액에 2N 황산용액을 이용하여 pH 2.0으로 조정 한 후 10°C에서 15시간 동안 정치시켜 폴리감마글루탐산 침전물을 수득하였다. 수득한 폴리감마글루탐산 침전물을 충분한 양의 10°C 이하의 냉각 증류수로 세척한 후(pH 3.5 이상), 누체여과기를 이용하여 폴리감마글루탐산 침전물을

수득 후 동결건조하여 고분자량 폴리감마글루탐산을 제조하였다.

- [48] 폴리감마글루탐산 염을 제조하기 위하여, 황산용액을 이용하여 침전시켜 얻은 폴리감마글루탐산 침전물에 식품첨가물 수산화나트륨을 첨가하여 중성의 pH로 용해시켜 얻은 폴리감마글루탐산 나트륨염 용액 및 폴리감마글루탐산 칼슘염 용액을 동결건조하고, 폴리감마글루탐산 나트륨염 및 폴리감마글루탐산 칼슘염 분말을 제조하였다. 또한 식품첨가물 중수산화마그네슘 첨가하여 중성의 pH로 용해시켜 얻은 폴리감마글루탐산 마그네슘염 용액을 동결건조하여 폴리감마글루탐산 마그네슘염 분말을 제조하였다. 또한 식품첨가물 중탄산암모늄을 첨가하여 중성의 pH로 용해시켜 얻은 폴리감마글루탐산 암모늄염 용액을 동결건조하여 폴리감마글루탐산 암모늄염 분말을 제조하였다.

[49]

- [50] 실시예 2: 지방세포를 이용한 폴리감마글루탐산의 중성지방 감소 기능

[51]

- [52] 2-1: 지방세포의 지방구 생성 저해 효과

- [53] 폴리감마글루탐산의 첨가가 지방생성 저해에 효과가 있는지를 측정하기 위하여 Oil-Red O staining을 실시하였다. Oil-Red O로 염색하게 되면 중성지방, cholesterol ester만이 염색되고, 그 외 유리지방산, 인지질은 염색이 되지 않는다. 지방의 축적된 부분은 대부분이 중성지방이기 때문에 Oil-Red O로 염색하여 지방축적 및 지방세포 분화 정도를 확인할 수 있다. 본 실험에서는 세포독성이 전혀 나타나지 않았던 1, 500, 2000 kDa의 시료를 각각 0.5, 1 mg/mL의 농도로 처리하여 분화를 유도한 후 Oil-Red O 염색하여 위상차 현미경으로 관찰하였다. 폴리감마글루탐산을 처리하지 않고 분화를 유도하였을 경우에 세포질 내 lipid droplet의 형성이 활발하게 유발되는 것으로 관찰되었으나, 폴리감마글루탐산의 처리에 의하여 lipid droplet 형성이 1, 500, 2000 kDa 모두 농도 의존적으로 저해되는 것을 확인하였다.

- [54] 지방구에 염색된 Oil-Red O를 isopropanol로 용출시켜 흡광도를 측정한 결과 폴리감마글루탐산의 Ca 형태가 Na 형태에 비해 전체적으로 지방축적을 저해하는 효과를 나타내었다. 특히 폴리감마글루탐산 Ca 형태 1, 500 kDa를 1 mg/mL 처리한 시료에서는 대조구와 비교하여 각각 48%, 41%의 지방축적 저해율을 보여 가장 우수한 효과를 나타내었다.

[55]

- [56] 2-2: Glycerol-6-phosphate dehydrogenase 활성 저해 효과

- [57] GPDH는 지방 및 근육세포에서 dihydroxyacetone phosphate를 glycerol-6-phosphate로 전환함으로써 Triglyceride(TG) 생합성에 관여하는 효소 중의 하나이다. 따라서 폴리감마글루탐산에 의한 중성지방 생성 감소에 GPDH의 관여 여부를 알아보기 위해 Oil-Red O에서 우수한 효과를 나타낸 Ca 형태의 1, 500 kDa를 농도별로 처리하였다. 시료를 처리하지 않은 대조구에 비해 두 분자량 모두 GPDH 활성을 현저히 저해하였다. 특히 500 kDa의 고분자 보다 1 kDa의

저분자에서 GPDH 활성이 저해되는 것으로 나타났다. 따라서 지방 세포 내 중성지방 생성 저해는 폴리감마글루탐산에 의한 GPDH 활성 저해가 관여하는 것으로 확인되었다.

[58]

[59] 2-3: 지방분화 관련 전사인자 발현에 미치는 영향

[60] 지방전구세포에서 지방세포로 분화되는 adipogenesis 과정은 많은 종류의 adipogenic transcription factor들의 단계적인 조절에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있다. 특히 이러한 adipogenic transcription factor들 중에서 C/EBP 및 PPAR family가 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다. 먼저 분화유도인자에 노출되면 몇 시간 이내에 C/EBP β 의 발현이 유발되면서 분화가 시작되며, C/EBP β 는 insulin-sensitive glucose uptake와 같은 성숙한 비만세포의 특징을 증가시키는 C/EBP α 및 PPAR γ 의 발현을 촉진하여 분화과정을 이룬다. 따라서 폴리감마글루탐산이 adipogenic transcription factor들의 발현에 미치는 효과를 분석하기 위하여, 앞선 실험에서 효과가 우수하였던 Ca 형태 폴리감마글루탐산을 농도별로 처리하여 mRNA 발현 양상을 분석하였다.

[61]

[62] 표 1

[Table 1]

지방세포 유래 호르몬 및 전사 유전자 증폭용 프라이머

	Primer	Sequence	서열번호
β -actin	Forward	5'-CGT-GGG-CCG-CCC-TAG-GCA-CCA-3'	1
	Reverse	5'-CTC-TTT-GAT-GTC-ACG-CAC-GAT-TTC-3	2
C/EBP α	Forward	5'-CTG-CGA-GCA-CGA-GAC-GTC-TAT-AG-3'	3
	Reverse	5'-TCA-TTG-TCA-CTG-GTC-AAC-TCC-AGC-3'	4
PPAR γ	Forward	5'-CGG-TTT-CAG-AAG-CTC-TGC-TC-3'	5
	Reverse	5'-GCC-ACC-TCT-TTG-CTC-TGC-TC-3'	6
SREBP1	Forward	5'-CTC-AGG-TCA-TGT-TGG-AAA-CC-3'	7
	Reverse	5'-AGA-CAG-GGA-GTT-CTC-AGA-TG-3'	8
FAS	Forward	5'-TGC-TCC-CAG-CTG-CAG-GC-3'	9
	Reverse	5'-AGA-CAG-GGA-GTT-CTC-AGA-TG-3'	10
Leptin	Forward	5'-CCG-CCA-AGC-AGA-GGG-TCA-C-3'	11
	Reverse	5'-GCA-TTC-AGG-GCT-AAC-ATC-CAA-CT-3'	12

[63]

[64] 그 결과, 1 kDa의 저분자 폴리감마글루탐산을 농도별로 처리하면 PPAR γ 와 C/EBP α 의 mRNA발현이 농도가 증가함에 따라 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 특히, 1 mg/mL로 처리하였을 때 PPAR γ 와 C/EBP α 의 mRNA발현이 각각 58%, 38% 감소하여, Oil-Red O 염색을 통한 세포관찰 결과와 일치하였다. 반면에, 500 kDa의 고분자 폴리감마글루탐산을 농도별로 처리하면 C/EBP α 의 mRNA발현은 농도 의존적으로 감소하는 양상을 보였지만 PPAR γ 의 발현은

농도와 관계없이 약간 감소하였으나 대조구에 비해 발현차이가 크지 않았다. 또한 1 kDa와는 다르게 500 kDa에서만 PPAR γ ligand 생성에 관여하는 전사인자인 SREBP1c의 발현이 농도 비의존적으로 저하됨을 확인하였다.

- [65] PPAR γ 는 지방대사를 조절하는 leptin 및 지방합성에 관여하는 fatty acid synthase(FAS)의 발현을 조절하는데, leptin은 지방세포에서 생성하고 혈관으로 분비되어 시상하부의 포만 중추를 자극하는 식욕조절인자로서 발열반응과 활동량을 증가시키고 체지방량을 감소시키는 생리적 작용을 가지고 있다고 보고되고 있다(Baile, Della-Fera & Martin, 2000). McDougald, Hwang, Fan & Lane (1995)에 따르면, 3T3-L1 지방세포는 분화과정 중 leptin을 생산하여 세포 중으로 분비하므로 세포 배양액에 증가된 leptin의 함량은 지방세포의 분화와 양의 상관관계를 갖는다고 보고하였다. 본 실험에서 500 kDa 처리구에서 농도의존적으로 leptin mRNA 발현이 현저하게 감소하였는데, 1 mg/mL의 농도에서 약63%의 높은 저해율을 보였다. 또한 500 kDa 0.5, 1 mg/mL에서 FAS의 mRNA 발현이 대조구에 비교하여 유의적으로 감소하였다.

- [66] 고분자의 폴리감마글루탐산은 저분자에서 효과를 나타내었던 전사인자뿐만 아니라 그 외의 지방대사 관련 인자들의 mRNA 발현을 감소하였다. 이러한 전사인자들의 발현 양상은 다음의 지방세포 내 TG축적 결과와 일치하여, 폴리감마글루탐산에 의한 전사인자들의 발현 조절이 관여하는 것으로 확인되었다.

[67]

- [68] 2-4: 중성지방 축적 저해 효과

- [69] 3T3-L1 지방세포내 TG 축적에 미치는 영향을 알아보기 위하여 TG 함량을 측정한 결과 대조군에서 TG 함량은 158 nmol/mg protein으로 나타났다. Ca 형태 폴리감마글루탐산의 첨가 농도에 따른 TG 함량은 전체적으로 1 kDa보다 500 kDa가 낮았다. 특히, 500 kDa에서 0.5 mg/mL 농도는 81 nmol/mg protein과 1 mg/mL 농도는 95 nmol/mg protein 으로 대조구와 비교하여 세포내 중성지방의 축적을 유의적으로 저해하였다. 다만, 0.25 mg/mL에서의 지방축적은 분자량과 관계없이 전혀 효과가 없는 것으로 보아 농도 비의존적으로 TG 축적이 저해됨을 알 수 있었다.

[70]

- [71] 실시예 3: 랫드 모델에서의 폴리감마글루탐산의 중성지방 개선 기능

[72]

- [73] 생리적 섭취 수준 즉, 일상적 섭취 수준에서 γ PGA의 중성지방 개선 효과를 확인하기 위하여, 동물에 고과당 식이를 이용하여 고중성지방혈증을 유발한 후 γ PGA 및 염 형태의 γ PGA를 식이 무게의 0.1% 수준(0.2g/kg 몸무게) 수준에서 섭취케 한 후 체중증가, 식이 섭취량, 체내 지질대사, 혈당, 지방세포 조직학적 형태 및 지방합성 효소 유전자 발현에 미치는 영향을 분석하였다.

[74]

[75] 3-1: 실험동물의 사육 및 식이

[76] 본 발명에서 실험동물은 (주)중앙동물로부터 이유된 8주령의 Sprague-Dawley 수컷 쥐 40마리를 사용했다. 실험실 환경조건은 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대 습도 $65 \pm 5\%$ 와 낮과 밤 주기는 12시간(오후 9시에 불이 켜짐)으로 하였으며, 각각 개별적인 금속 케이지에서 사육했다. 새로운 환경에 적응이 끝난 후, 실험동물은 대조군(NC) 10마리와 고과당섭취군(HC) 30마리로 무작위 실험군을 나누어 대조군은 정상식이를 4주간 공급하고, 고과당섭취군은 4주간의 고과당식(식이 무게의 63% 과당 함유)이 섭취로 고중성지방혈증으로 유도했다. 고과당섭취군의 유도확인을 마친 후 각 10마리씩 3그룹으로 무작위로 실험군을 나누어, 저농도 γ -PGA (150mg/kg bw)군과 고농도 γ -PGA (300mg/kg bw)군에게는 γ -PGA를 4주간 경구투여 하였다. 4주간의 실험식이 투여가 끝난 후, 혈청의 지질 대사 및 간의 지질 대사 분석을 하였다.

[77]

[78] 3-2: 혈장내 중성지방, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤

[79] 고과당식이 후 γ PGA를 4주간 섭취시킨 실험군에서는 총콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 수치가 유의적으로 감소하였으며, HDL-콜레스테롤은 증가한 것으로 나타났다. 고과당식을 통한 고중성지방혈증 실험동물의 중성지방 수준이 평균 300mg/dl 이상으로 유도된 것을 확인한 후 4주간 γ PGA를 섭취한 결과, 고과당식으로 인하여 증가된 중성지방 수치가 γ PGA 섭취를 통하여 정상 수준인 200mg/dl 이하로 낮아진 것으로 나타났다.

[80]

[81] 표 2

[Table 2]

	실험군			
	NC	HC	HLP	HHP
TC(mg/dl)	76.5 ± 4.8^a	103.2 ± 3.7^c	84.0 ± 2.3^{ab}	88.2 ± 2.9^b
LDL-C(mg/dl)	38.7 ± 2.8^{ab}	46.9 ± 4.6^b	30.5 ± 2.6^a	34.2 ± 2.2^a
HDL-C(mg/dl)	33.8 ± 6.3^a	41.8 ± 5.0^b	42.0 ± 3.5^b	45.3 ± 6.9^b
FFA(uM/ml)	441.2 ± 45.1^{ab}	490.4 ± 42.3^b	318.7 ± 40.5^a	390.9 ± 34.2^{ab}

1) NC: 정상식이군, HC: 고과당식이군, HLP: 고과당식이+ 150 mg PGA/kg bw , HHP: 고과당식이+ , 300mg PGA/kg bw.

2) Values are expressed as the mean $\pm$ SEM, n=10 rats per group.

[82]

[83] 3-3: 간내 포도당-6-인산탈수소효소 mRNA 유전자 발현

[84] 포도당-6-인산탈수소효소의 mRNA를 실시간 RT-PCR로 측정한 결과, γ PGA의 섭취시 포도당-6-인산탈수소효소 유전자의 발현을 유의하게 억제하였으며, 이는 고과당식으로 인하여 간조직내 증가된 G6PDH 효소의 활성이 γ PGA 섭취를 통하여 감소한 것으로 나타났다.

[85]

[86] 실시예 4: 폴리감마글루탐산의 중성지방 개선 인체시험

[87]

[88] 폴리감마글루탐산의 중성지방 개선 기능성을 인체에서 확인하기 위해 인체시험을 실시하였다. 피험자는 대조군과 실험군으로 나뉘어 총 8주간 위약 또는 시험원료를 섭취하였다. 본 연구에 참여한 대조군의 경우 제품군과 동일하게 복용 전, 복용 4주 후, 복용 8주 후에 혈액검사를 받고 전문의와 영양사와의 상담을 통해 혈중 지질이 개선될 수 있도록 식사요법 및 생활습관을 상담하였다. 섭취는 일일 1회 점심 식사 2시간 직전에 섭취하였으며, 시험은 이중 맹검법으로 실시하였다. 임상시험을 실시하는 서울 백병원 산하의 임상영양연구소에 연구원 겸 영양사가 일정한 간격(1회/주)을 두고 전화 및 직접 상담을 통해 피험자의 복용 여부를 확인하고 기타 발생하는 문제점이나 부작용 등을 검사하고, 식사상담 및 제품에 대한 지식 등을 전달하며, 규칙적으로 모니터링 하였다. 임상시험은 8주간 진행되며 복용 전, 복용 4주 후, 그리고 마지막으로 복용 후 8주가 되면 임상시험의 복용기간을 종료하였다. 복용이 종료되는 날의 다음날 또는 그 다음날에 연구기관인 서울 백병원 비만센터에 소집하게 되며, 복용에 따른 여러 평가지표를 측정, 조사하여 최종적인 평가를 종료하였다.

[89] 피험자 선정기준은 연령 만 19세 이상 65세 이하 남녀로 혈중 콜레스테롤 수치가 200~260mg/dl로 기준을 정하였으며, SAS 또는 SPSS PC program 이용, 결과는 평균 표준편차로 표시하였으며, 임상 전후의 자료 비교는 Paired t-test, 실험군들과 대조군간의 비교는 t t-test, ANOVA, Multiple range test에 의해 유의성 검증($P < 0.05$)하였으며, 인자들간의 상관관계는 Pearson's correlation method를 사용하였다.

[90]

[91] 표 3

[Table 3]

평가항목 요약표

검 사 항 목	검 사 내 용
기초사항 및 영양소 섭취량 조사	피험자 동의 및 인구학적 조사 병력 및 약물 투여력 조사 인구, 사회학적 특성 조사
이학적 검사	각 방문 시 심혈관계, 폐 및 호흡기계, 위장관/간 및 담도계, 대사/내분비계, 신장/요로계, 생식기계, 근골격계, 피부 및 결합조직, 신경계, 정신계, 기타 신체기관에 대한 피험자의 임상적 상태
신체 측정	신장, 체중, 허리둘레, 엉덩이둘레, BMI
활력징후	혈압, 맥박 등
체성분검사	체지방량, 체지방율, 제지방량
식사지도 및 기초식이조사	24시간 식사내용 기록법을 이용하여 일일 영양소 섭취상태를 파악
생화학검사	- 혈액학적검사 : WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, MCV 등 Routine CBC 검사 - 간기능 검사 : GOP, GPT, protein, albumin, alkaline phosphatase, bilirubin, γ -GTP - 혈청지질 검사 : 총콜레스테롤, 중성지방, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 - 당질대사 검사 : glucose - 신장기능 검사 : BUN, creatinine - 갑상선 기능검사 : TSH - 전해질 검사 : Na, K, Cl, calcium/phosphorus - 통풍 검사 : uric acid - 뇨 검사 : protein, glucose, blood, ketone
심전도	심전도 검사
이상반응 및 순응도평가	임상시험 이상반응을 매방문시 확인하고, 복용량을 확인하여 순응도를 계산한다.

[92]

[93] 4-1: 혈청 지질 검사 결과

[94] 8주 후에 총 콜레스테롤은 PGA 군에서 16.76mg/dl 감소하고, 위약군에서 17.42mg/dl 감소하여 위약군이 더 많이 감소한 것으로 나타났으나 통계적으로 유의하지는 않았다($p=0.937$). 두 군 간의 8주 후에 중성지방을 비교한 결과, PGA 군에서 44.62mg/dl 감소하였고, 위약군에서는 31.37mg/dl 증가하여 두 군 간의 통계적으로 유의한 차이를 나타냈다($p=0.029$). HDL-콜레스테롤은 PGA 군에서 1.67mg/dl 감소하였고, 위약군에서 4.63mg/dl 감소하였으나 군 간의 유의한 차이는 없었다($p=0.260$). LDL-콜레스테롤은 PGA 군에서 17.24mg/dl 감소하고, 위약군에서 19.21mg/dl 감소한 것으로 나타났으나 두 군 간의 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다($p=0.816$).

[95]

[96] 표 4

[Table 4]

혈청지질 검사 결과

		Placebo (n=19)			PGA (n=21)			p-value ¹⁾
Total Cholesterol (mg/dl)	0wk	233.16	±	17.97	228.00	±	14.82	0.326
	4wk	229.05	±	33.97	215.05	±	24.38	0.140
	8wk	215.74	±	26.04	211.24	±	20.98	0.549
	8wk - 0wk	-17.42	±	28.16	-16.76	±	24.03	0.937
	p-value ²⁾	0.015			0.005			
Triglyceride (mg/dl)	0wk	150.11	±	65.43	216.05	±	194.58	0.168
	4wk	135.32	±	50.99	224.10	±	200.55	0.062
	8wk	181.47	±	75.28	171.43	±	92.90	0.711
	8wk - 0wk	31.37	±	80.83	-44.62	±	124.38	0.029
	p-value	0.108			0.116			
HDL-Cholesterol (mg/dl)	0wk	58.11	±	10.29	58.00	±	12.09	0.977
	4wk	57.74	±	9.86	55.76	±	12.28	0.581
	8wk	53.47	±	9.93	56.33	±	11.21	0.400
	8wk - 0wk	-4.63	±	9.19	-1.67	±	7.15	0.260
	p-value	0.041			0.298			
LDL-Cholesterol (mg/dl)	0wk	168.89	±	22.35	161.29	±	17.42	0.235
	4wk	164.26	±	29.32	147.62	±	20.66	0.043
	8wk	149.68	±	21.87	144.05	±	18.38	0.382
	8wk - 0wk	-19.21	±	30.04	-17.24	±	23.05	0.816
	p-value	0.012			0.003			

¹⁾ p-value by t-test²⁾ p-value by paired t-test

[97]

[98] 4-2: 신체계측 및 체성분 분석 결과

[99] 8주 후에 체중변화를 비교한 결과, PGA 군에서 1.57kg 감소되었고, 위약군은 0.39kg 증가하여 PGA 군에서 더 감량이 된 것으로 나타났으며, 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다(p=0.046). 군 간의 8주 후에 BMI를 비교한 결과도 PGA군이 0.60kg/m² 감소하였고, 0.17kg/m² 증가하였으나 두 군 간의 유의한 차이는 없었다(p=0.057). 8주 후에 허리둘레는 PGA 군은 1.04cm 감소하였고, 위약군은 0.05cm 증가하였으나, 군 간의 유의한 차이는 없었으며(p=0.426), 엉덩이둘레는 PGA 군은 0.95cm 감소하였고, 위약군은 0.46cm 감소하여 PGA 군이 더 감소하였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(p=0.595). 두 군 간의 체지방량을 비교한 결과, PGA 군이 1.94kg 감소하였고, 위약군은 0.24kg

감소하여 PGA 군에서 더 감소하였으나, 군 간의 유의한 차이는 나타나지 않았다($p=0.159$). 8주 후에 체지방률을 비교한 결과, PGA 군이 0.03% 감소하였고, 위약군은 0.55% 감소하였으나, 두 군 간의 차이는 통계적으로 유의하지 않았다($p=0.683$). 제지방량은 PGA 군이 0.01kg 감소하였고, 위약군에서는 0.61kg 증가하였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다($p=0.494$).

[100]

[101] 표 5

[Table 5]

신체계측 및 체성분 분석 결과

		Placebo (n=19)			PGA (n=21)			p-value ¹⁾
체중 (kg)	0wk	64.07	±	13.54	67.04	±	11.71	0.462
	4wk	64.27	±	13.12	65.92	±	11.60	0.675
	8wk	64.47	±	13.15	65.47	±	11.75	0.800
	8wk - 0wk	0.39	±	3.31	-1.57	±	2.70	0.046
	p-value ²⁾	0.610			0.015			
BMI (kg/m ²)	0wk	24.94	±	3.25	25.74	±	2.88	0.414
	4wk	25.03	±	3.15	25.31	±	2.95	0.775
	8wk	25.11	±	3.16	25.13	±	3.01	0.981
	8wk - 0wk	0.17	±	1.40	-0.60	±	1.09	0.057
	p-value	0.597			0.020			
허리둘레 (cm)	0wk	84.90	±	8.41	87.62	±	7.37	0.282
	4wk	84.95	±	8.09	85.21	±	7.69	0.915
	8wk	84.95	±	8.28	86.59	±	8.24	0.535
	8wk - 0wk	0.05	±	3.88	-1.04	±	4.57	0.426
	p-value	0.958			0.310			
체지방량 (kg)	0wk	20.33	±	5.46	22.95	±	5.71	0.147
	4wk	20.91	±	5.89	24.81	±	9.28	0.125
	8wk	20.09	±	5.71	21.01	±	4.39	0.569
	8wk - 0wk	-0.24	±	2.95	-1.94	±	4.32	0.159
	p-value	0.731			0.053			
체지방률 (%)	0wk	31.85	±	5.94	32.45	±	6.40	0.759
	4wk	33.32	±	6.77	33.12	±	6.51	0.926
	8wk	31.30	±	6.58	32.42	±	6.05	0.578
	8wk - 0wk	-0.55	±	2.98	-0.03	±	4.64	0.683
	p-value	0.433			0.974			
체지방량 (kg)	0wk	41.37	±	10.04	42.50	±	9.53	0.717
	4wk	39.32	±	11.84	41.81	±	9.38	0.462
	8wk	41.97	±	10.03	42.49	±	11.00	0.878
	8wk - 0wk	0.61	±	1.32	-0.01	±	3.67	0.494
	p-value	0.061			0.991			

¹⁾ p-value by t-test²⁾ p-value by paired t-test

[102]

[103] 4-3: 생화학적 검사 결과

[104] 8주 후에 생화학적 검사 결과, Glucose는 PGA 군에서 3.18mg/dl 증가하였고, 위약군은 1.81mg/dl 감소하였으며, 통계적으로 유의한 차이가 나타났다(p=0.014). 그 외의 생화학적 검사 결과, PGA 군과 위약군의 모든

항목에서 유의한 차이는 나타나지 않았고, 모두 정상범위 내에 있었다. 임상시험 전후의 군 내 비교 결과, PGA 군에서는 Glucose와 Cl이 통계적으로 유의한 변화가 나타났고($p=0.042$, $p=0.027$), 위약군에서는 Creatinine이 통계적으로 유의한 변화가 나타났다($p=0.002$).

[105]

[106] 표 6

[Table 6]

생화학적 검사 결과

		Placebo (n=21)			PGA (n=22)			p-value ¹⁾
Glucose (mg/dl)	0wk	96.10	±	9.13	95.55	±	8.64	0.840
	4wk	95.38	±	7.97	97.50	±	8.24	0.397
	8wk	94.29	±	8.77	98.73	±	9.41	0.117
	8wk-0wk	-1.81	±	5.76	3.18	±	6.88	0.014
	p-value ²⁾	0.165			0.042			
Protein (g/dl)	0wk	7.60	±	0.45	7.62	±	0.36	0.885
	4wk	7.55	±	0.35	7.62	±	0.41	0.574
	8wk	7.48	±	0.35	7.57	±	0.40	0.447
	8wk-0wk	-0.12	±	0.33	-0.05	±	0.28	0.469
	p-value	0.118			0.418			
ALP (IU/L)	0wk	67.90	±	15.90	67.05	±	13.45	0.849
	4wk	68.33	±	11.78	68.95	±	14.24	0.877
	8wk	66.57	±	12.99	67.27	±	12.70	0.859
	8wk-0wk	-1.33	±	6.78	0.23	±	8.88	0.522
	p-value	0.378			0.906			
Na (mmol/L)	0wk	141.35	±	1.46	141.33	±	1.68	0.973
	4wk	141.15	±	1.76	141.50	±	1.54	0.495
	8wk	140.67	±	1.80	141.18	±	1.74	0.345
	8wk-0wk	-0.50	±	2.44	-0.10	±	1.89	0.555
	p-value	0.371			0.820			
Cl (mmol/L)	0wk	105.25	±	1.83	104.33	±	1.91	0.125
	4wk	105.80	±	1.96	105.27	±	1.93	0.386
	8wk	106.05	±	1.77	105.27	±	1.86	0.170
	8wk-0wk	0.95	±	2.37	0.86	±	1.65	0.885
	p-value	0.089			0.027			

¹⁾ p-value by t-test²⁾ p-value by paired t-test

[107]

[108] 이상으로, 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 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.

[109]

산업상 이용가능성

[110] 본 발명에 따른 폴리감마글루탐산 함유 조성물은 혈중 중성지방 및 지방세포의 크기를 감소시키고, 독성 및 부작용이 거의 없어 예방 목적으로 장기복용이 가능하여, 중성지방 개선용 식음료로 섭취시 내장비만 및 동맥경화 등을 미리 예방하거나 개선할 수 있어 비만질환 및 혈관질환에 대한 치료 및 예방에 유용하다.

[111]

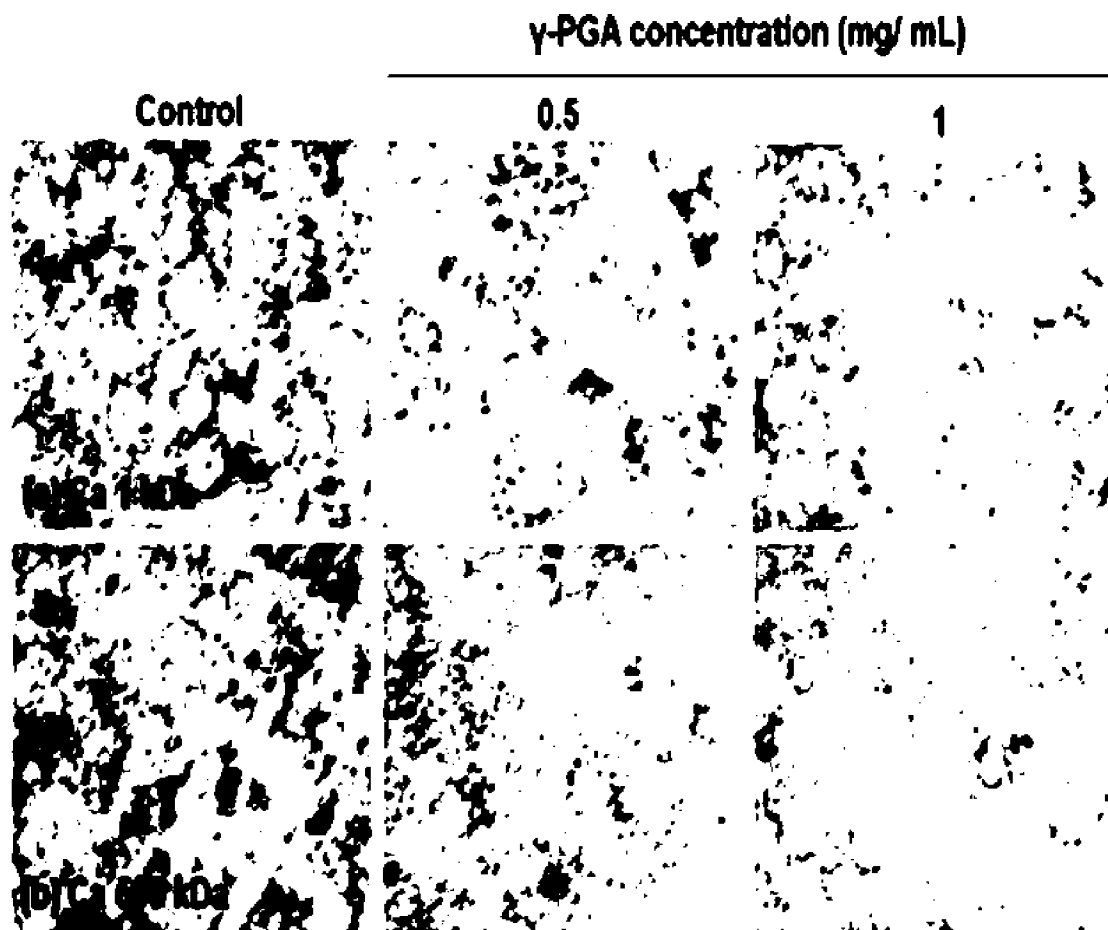
서열목록 Free Text

[112] 전자파일 첨부하였음.

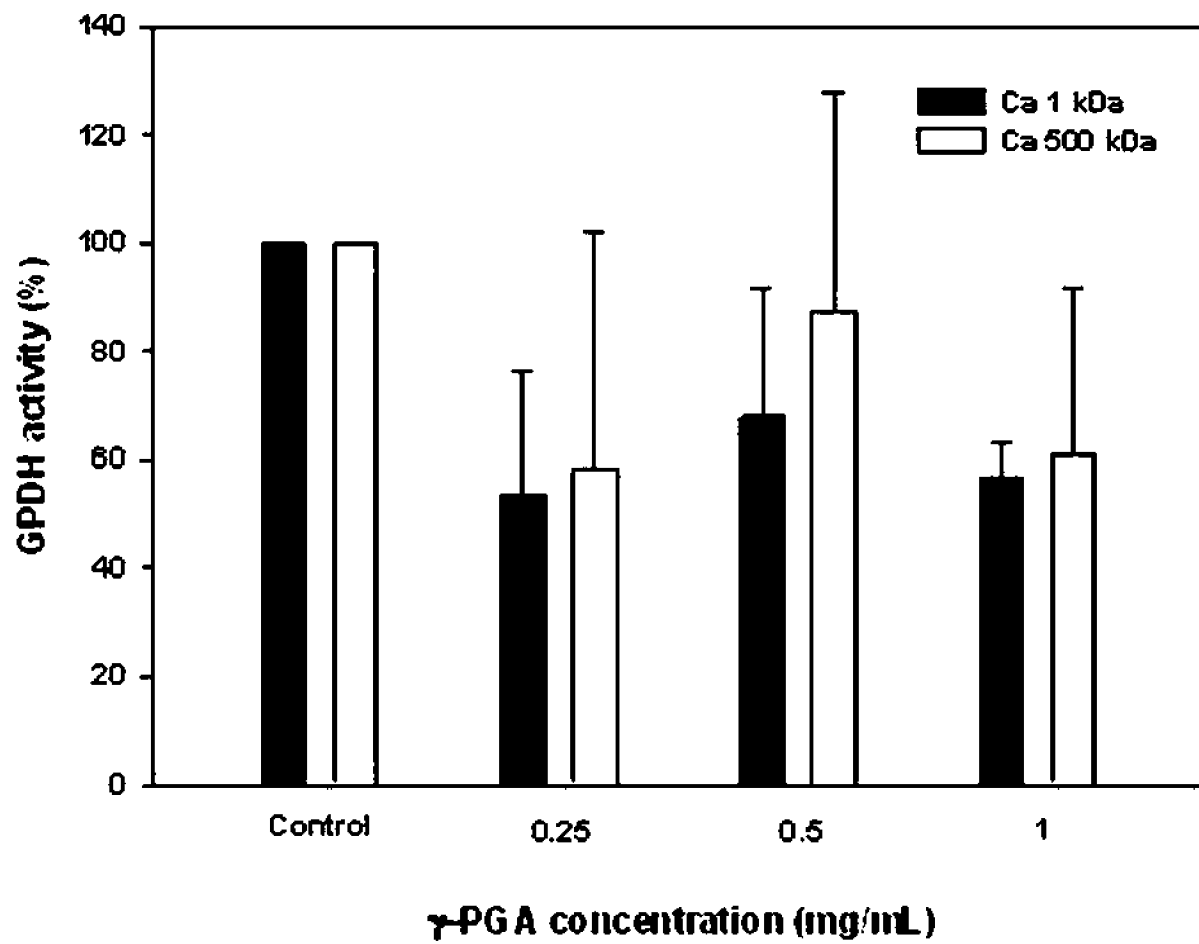
청구범위

- [청구항 1] 분자량 100Da~5,000kDa의 폴리감마글루탐산 또는 그의 염을 유효성분으로 함유하는 혈중 중성지방 개선용 약학조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 염은 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 마그네슘염, 암모늄염 및 아연염으로 구성된 군에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 약학조성물.
- [청구항 3] 분자량 100Da~5,000kDa의 폴리감마글루탐산 또는 그의 염을 유효성분으로 함유하는 혈중 중성지방 개선용 건강기능식품.
- [청구항 4] 제 3항에 있어서, 상기 염은 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 마그네슘염, 암모늄염 및 아연염으로 구성된 군에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 건강기능식품.

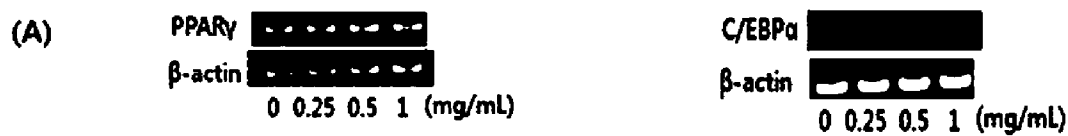
[Fig. 1]



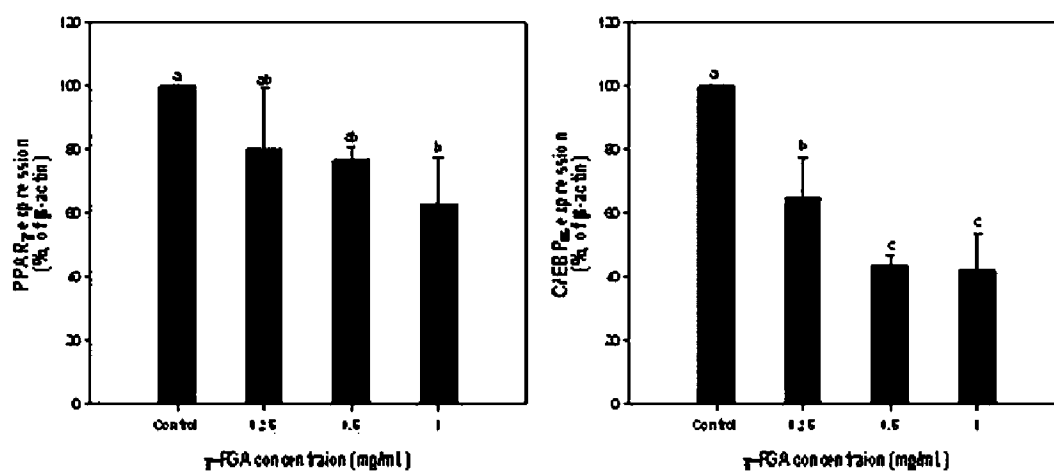
[Fig. 2]



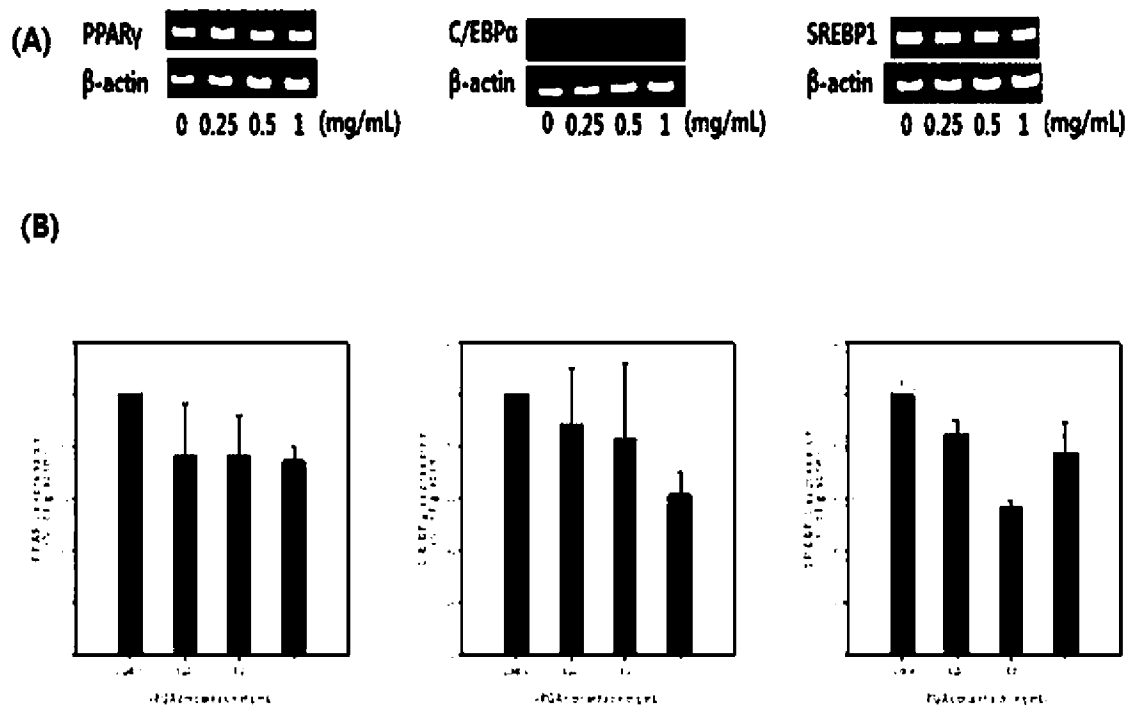
[Fig. 3]



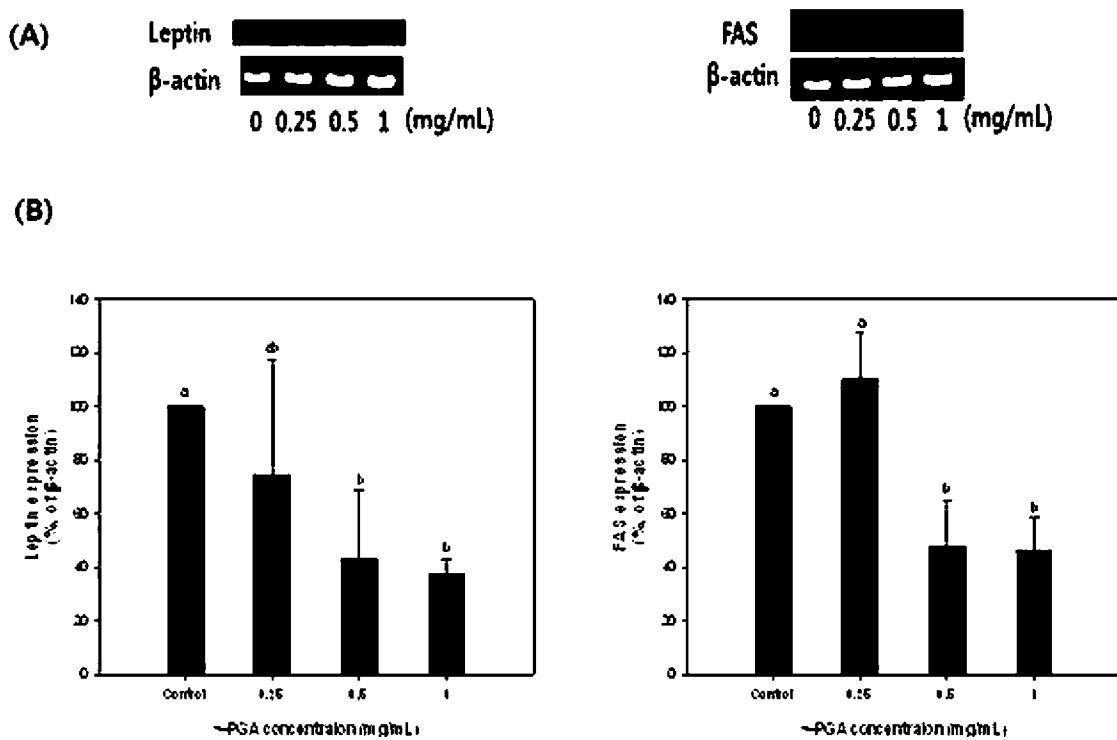
(B)



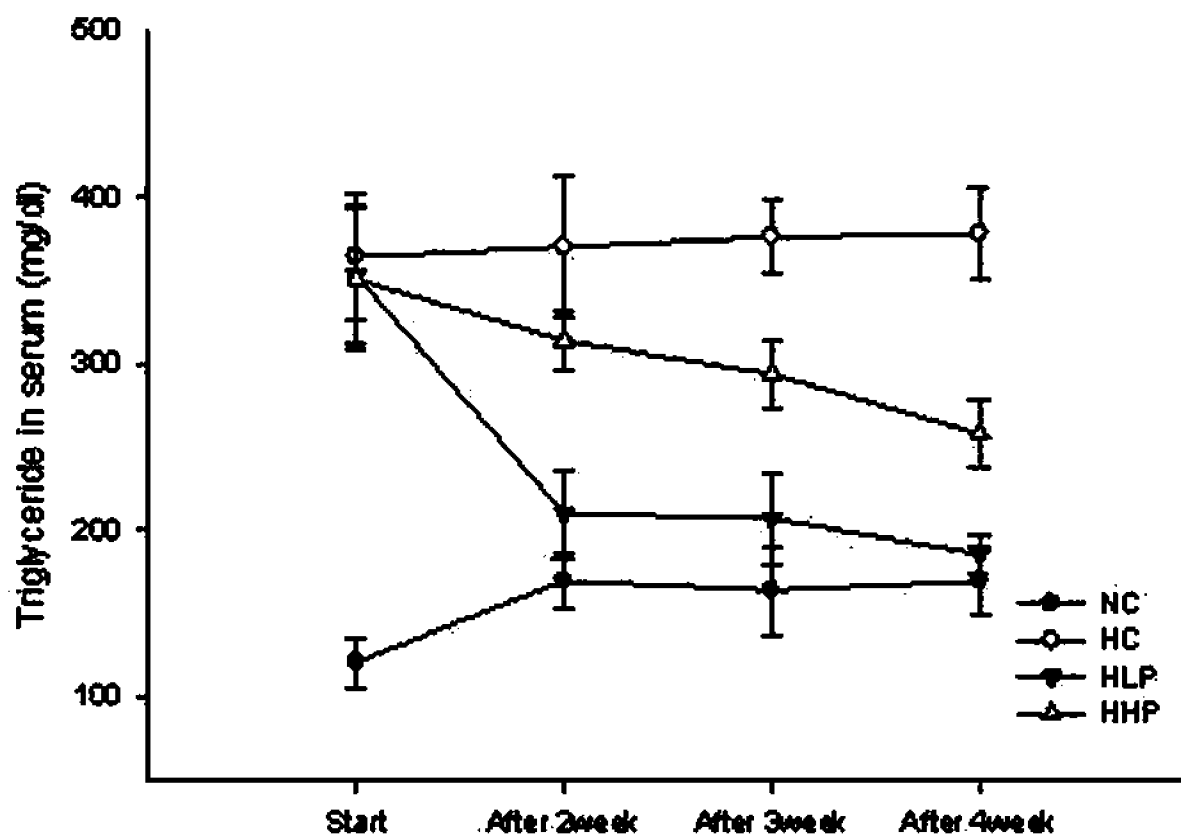
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/008158**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 31/765(2006.01)i, A61K 31/74(2006.01)i, A61K 31/195(2006.01)i, A61P 3/00(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/765; A61P 7/02; A61K 31/74

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: poly-gamma-glutamic acid, neutral fat

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-1054808 B1 (BIOLEADERS CORPORATION et al.) 05 August 2011 See claims 1 to 5, paragraph [0017] on page 5, paragraphs [0063-0065] on page 11.	1-4
A	KR 10-0656560 B1 (BIOLEADERS CORPORATION et al.) 11 December 2006 See claims 1 to 5.	1-4
A	PARK, JIHO et al., J. Microbiol. Biotechnol. 2011, vol. 21, no. 7, pp. 766-775 See abstract, result.	1-4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 APRIL 2013 (29.04.2013)

Date of mailing of the international search report

29 APRIL 2013 (29.04.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2012/008158

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1054808 B1	05.08.2011	NONE	
KR 10-0656560 B1	11.12.2006	JP 2009-522254 A US 2009-0186804 A1 US 2012-0196806 A1 WO 2007-075017 A1	11.06.2009 23.07.2009 02.08.2012 05.07.2007

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/765(2006.01)i, A61K 31/74(2006.01)i, A61K 31/195(2006.01)i, A61P 3/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 31/765; A61P 7/02; A61K 31/74 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 폴리감마글루타믹산, 중성지방		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-1054808 B1 (주식회사 바이오리더스 외 3명) 2011.08.05 청구항 제1항 내지 제5항, 5페이지 단락[0017], 11페이지 단락[0063-65] 참조.	1-4
A	KR 10-0656560 B1 (주식회사 바이오리더스 외 1명) 2006.12.11 청구항 제1항 내지 제5항 참조.	1-4
A	PARK, JIHO et al., J. Microbiol. Biotechnol. 2011, Vol.21, No.7, pp. 766-775 abstract, result 참조.	1-4
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2013년 04월 29일 (29.04.2013)		국제조사보고서 발송일 2013년 04월 29일 (29.04.2013)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 신창훈 전화번호 82-42-481-8406 

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-1054808 B1

2011.08.05

없음

KR 10-0656560 B1

2006.12.11

JP 2009-522254 A

2009.06.11

US 2009-0186804 A1

2009.07.23

US 2012-0196806 A1

2012.08.02

WO 2007-075017 A1

2007.07.05