



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0142284
(43) 공개일자 2022년10월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/7034 (2006.01) A23L 33/125 (2016.01)

A61K 31/7024 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/7034 (2013.01)

A23L 33/125 (2020.05)

(21) 출원번호 10-2021-0048798

(22) 출원일자 2021년04월14일

심사청구일자 2021년04월14일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자

김유리

서울특별시 양천구 목동동로12길 60, 103동 1405호(신정동, 목동현대아파트)

권민서

경기도 용인시 수지구 만현로 127, 807동 1403호(상현동, 만현마을8단지두산위브아파트)

김양

서울특별시 관악구 관악로 1, 서울대학교 203동 409호(신림동)

(74) 대리인

유미특허법인

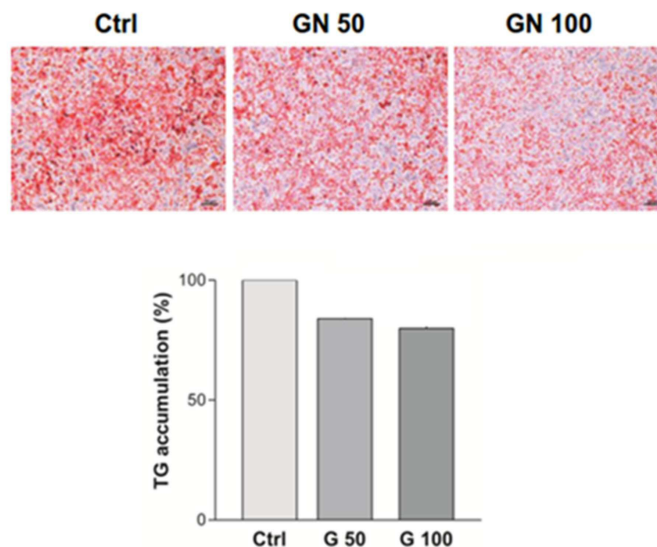
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체를 포함하는 비만 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체를 유효성분으로 포함하고 체중, 체지방 및/또는 혈당 감소 효과가 있는 비만 예방, 개선 및/또는 치료용 약학적 및/또는 식품 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 31/7024 (2013.01)
A61P 3/04 (2018.01)
A61P 3/10 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/328 (2013.01)
A23V 2200/332 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545021394
과제번호	119020032HD040
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	맞춤형혁신식품및천연안심소재기술개발(R&D)
연구과제명	신규감미물질의 단맛수용체의 활성분석을 통한 관능검사와의 상관관계 분석 및 향당
노, 향염증 효능 규명	
기 여 율	1/3
과제수행기관명	이화여자대학교교산학협력단
연구기간	2020.01.01~2021.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545020222
과제번호	119020031SB050
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	미래형혁신식품기술개발사업
연구과제명	국내산 감귤류 및 바이오전환기술을 이용한 신규 고감미료 NHDC당전이체 생합성 및
정제기술	
기 여 율	1/3
과제수행기관명	서울대학교
연구기간	2019.05.20~2022.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711051059
과제번호	2017R1A2B4011593
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(미래부)
연구과제명	다양한 dihydrochalcone 유도체의 구조를 활용한 단맛 수용체의 감지기작 및 상대당
도와의 상관성 규명	
기 여 율	1/3
과제수행기관명	서울대학교
연구기간	2017.03.01~2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하는, 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 체중, 체지방 또는 혈당 감소 효과가 있는, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, Cd36, Lpl, Srebp1c, Fas, PPAR γ 및 C/EBP α 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 암호화 유전자 수준 감소 효과가 있는, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, Acs11, Cpt1 α , Ucp1, Pgc1 α , 및 Prdm16으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 암호화 유전자 수준 증가 효과가 있는, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT 및 p-mTOR/mTOR로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 암호화 유전자 수준 감소 효과가 있는, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, p-AMPK/AMPK 또는 이의 암호화 유전자 수준 증가 효과가 있는, 약학적 조성물.

청구항 7

네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하는, 비만 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, Cd36, Lpl, Srebp1c, Fas, PPAR γ 및 C/EBP α 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 암호화 유전자 수준 감소 효과가 있는, 식품 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, Acs11, Cpt1 α , Ucp1, Pgc1 α , 및 Prdm16으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 암호화 유전자 수준 증가 효과가 있는, 식품 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서, p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT 및 p-mTOR/mTOR로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 암호화 유전자 수준 감소 효과가 있는, 식품 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서, p-AMPK/AMPK 또는 이의 암호화 유전자 수준 증가 효과가 있는, 식품 조성물.

청구항 12

네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하는, 체중, 체지방 또는 혈당 감소용 식

품 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, Cd36, Lpl, Srebp1c, Fas, PPAR γ 및 C/EBP α 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 암호화 유전자 수준 감소 효과가 있는, 식품 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, Acs11, Cpt1 α , Ucp1, Pgc1 α , 및 Prdm16으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 암호화 유전자 수준 증가 효과가 있는, 식품 조성물.

청구항 15

제12항에 있어서, p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT 및 p-mTOR/mTOR로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 암호화 유전자 수준 감소 효과가 있는, 식품 조성물.

청구항 16

제12항에 있어서, p-AMPK/AMPK 또는 이의 암호화 유전자 수준 증가 효과가 있는, 식품 조성물.

청구항 17

네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하는, 체중, 체지방 또는 혈당 감소용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체인 NHDC-O-glycoside (1-(4-((2-O-[6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl])-(4-O- α -D-glucopyranosyl)]- β -D-glucopyranosyl)oxy)-2,6-dihydroxyphenyl)-3-[3-hydroxy-4-methoxyphenyl]-1-propanone) (GNHDC)를 유효성분으로 포함하는 비만 예방, 개선 및/또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세계 보건기구 (WHO)는 전세계적으로 1975년부터 2016년까지 비만이 약 3배 증가했다고 보고했다. 이러한 이유로 WHO는 비만에 관한 WHO 협의회에서 21 세기에 세계적 유행병으로 비만을 제안했다. 비만이 되는 것은 당뇨병, 심혈관 질환 및 암을 포함하는 대사 장애와 관련이 있다. 지방 생성 또는 지방 생성을 포함한 여러 지방 축적 관련 메커니즘이 있고, 반대로 β - 산화와 갈색 지방화는 지방 축적의 억제 메커니즘이다.

[0003] 설탕 소비는 1960년대 중반 이후 급격히 증가했는데, 이는 설탕이 첨가된 음료의 섭취가 주요 원인 중 하나이다. WHO는 설탕 섭취량을 총 에너지 섭취량의 10% 미만으로 낮출 것을 강력히 권장했다. 이전 연구에 따르면 설탕 섭취가 증가하면 어린이와 성인의 비만 유병률이 높아질 수 있다. 설탕 소비를 줄이기 위한 해결책으로 대체 감미료가 제안됐다. 감미료는 bulk sweeteners와 intense sweeteners로 분류되고, 이는 칼로리 함량에 따라 나뉜다. bulk sweeteners는 칼로리를 생성하는 반면 intense sweeteners는 칼로리를 전혀 생성하지 않거나 최소한만 생성한다. 또한, intense sweeteners는 자당보다 상대적 단맛이 더 높다. 따라서 설탕 대신 대체 감미료를 사용하여 비만이나 제2형 당뇨병을 예방할 수 있을 것으로 기대된다. 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 (neohesperidin dihydrochalcone, NHDC)은 intense sweeteners 중 하나이다. 이는 플라바논 (flavanone)이 모체인 네오헤스페리딘 (neohesperidin)에서 추출 및 가공된다.

[0004] 플라바논 글리코사이드 (glycoside)는 주로 오렌지 껍질에서 발견되며 디하이드로칼콘 형태는 수소화를 통해 합성된다. NHDC는 비터 오렌지 (bitter orange), citrus aurantium의 반천연 화합물로 높은 용해도와 안정성을 가지고 있다. NHDC의 상대적 단맛은 자당 용액보다 250 ~ 2000배 더 높다. 또한, NHDC는 다른 화합물의 쓴 맛을 없애는데 사용될 수 있다. 이 기능성 대체 감미료는 항산화 작용을 하는 것으로 보고됐다.

[0005] 글리코사이드는 당이 아닌 분자에 글리코사이드 결합으로 연결된 하나 이상의 당을 가진 화합물이다. 결합 위치에 따라 O-, C-, N- 및 S- 글리코사이드의 네 가지 유형이 있다. 글리코사이드는 항비만 또는 항당뇨 효과를 발휘하는 것으로 알려져있다. NHDC와 그 글리코사이드가 지방 조직과 그 메커니즘에 미치는 영향은 아직 확인되지

않았다. NHDC와 GNHDC 모두의 항비만 효과와 그 분자 메커니즘을 생체 내 및 시험관 내에서 조사했다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 상기와 같은 배경하에서, 본 발명자들은 NHDC 및 GNHDC의 항비만 효과에 대한 연구를 거듭하였다. 그 결과, NHDC 및 GNHDC의 항비만 효과를 관련 마커 확인을 통해 확인하여, 본 발명을 완성하였다.
- [0008] 일 예는 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하는, 비만 예방 및/또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0009] 다른 예는 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하는, 체중, 체지방 및/또는 혈당 감소용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0010] 다른 예는 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하는, 비만 예방 및/또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0011] 다른 예는 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하는, 체중, 체지방 및/또는 혈당 감소용 식품 조성물을 제공한다.

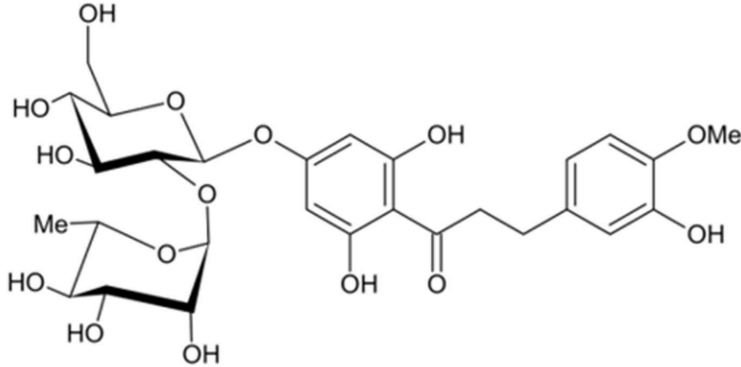
과제의 해결 수단

- [0012] 본 명세서는 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)의 항비만 효과를 관련 마커 확인을 통해 확인하여, 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)의 비만 예방, 비만 치료, 체중 감소, 체지방 감소 및/또는 혈당 감소 용도를 제공한다.
- [0013] 이에, 일 예는 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하고 Cd36, Lpl, Srebp1c, Fas, PPAR γ 및 C/EBP α 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 암호화 유전자 수준 감소 효과가 있는 조성물을 제공한다.
- [0014] 다른 예는 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하고 Acs11, Cpt1 α , Ucp1, Pgc1 α , 및 Prdm16으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 암호화 유전자 수준 증가 효과가 있는 조성물을 제공한다.
- [0015] 다른 예는 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하고 p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT 및 p-mTOR/mTOR로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 암호화 유전자 수준 감소 효과가 있는 조성물을 제공한다.
- [0016] 다른 예는 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하고 p-AMPK/AMPK 또는 이의 암호화 유전자 수준 증가 효과가 있는 조성물을 제공한다.
- [0017] 상기 조성물은 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하는 비만 예방, 개선 및/또는 치료용 조성물일 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 상기 조성물은 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하고 체중, 체지방 및/또는 혈당 감소 효과가 있을 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 상기 조성물은 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하는 체중, 체지방 및/또는 혈당 감소용 조성물일 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 상기 조성물은 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물 및/또는 식품 조성물 (예컨대, 건강기능식품)일 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 이하, 본 출원을 보다 상세히 설명한다.

[0024] 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)

[0025] 본 명세서에서 "NHDC"는 “네오헤스페리딘 디하이드로칼콘” 또는 “(1-(4-((2-O-[6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl]- β -D-glucopyranosyl)oxy)-2,6-dihydroxyphenyl)-3-[3-hydroxy-4-methoxyphenyl]-1-propanone)”을 의미하며, 하기 화학식 1의 화학식으로 나타낼 수 있다.

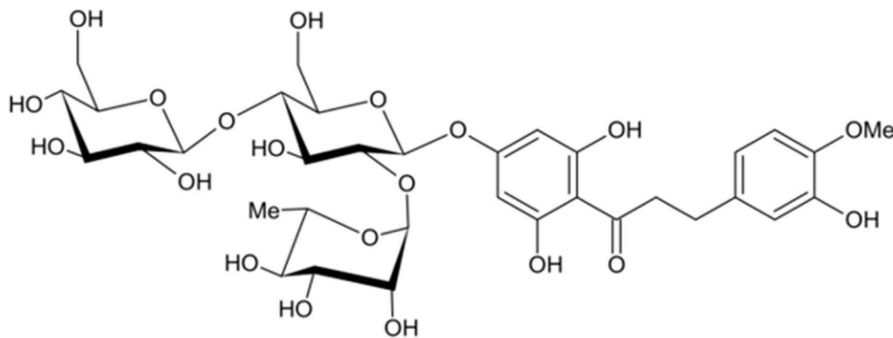
[0026] [화학식 1]



[0027]

[0028] 본 명세서에서 “GNHDC”는 “네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체” 또는 “(1-(4-((2-O-[6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl]-(4-O- α -D-glucopyranosyl]- β -D-glucopyranosyl)oxy)-2,6-dihydroxyphenyl)-3-[3-hydroxy-4-methoxyphenyl]-1-propanone)”을 의미하며, 하기 화학식 2의 화학식으로 나타낼 수 있다.

[0029] [화학식 2]



[0030]

[0031] 본 명세서는 GNHDC를 유효성분으로 포함하는 비만 예방, 비만 개선용, 비만 치료용, 체중 감소용, 체지방 감소용 및/또는 혈당 감소용 약학적 및/또는 식품 조성물을 제공한다.

[0032] 상기 조성물은 GNHDC를 0.001 내지 100,000 μ M, 0.01 내지 100,000 μ M, 0.1 내지 100,000 μ M, 1 내지 100,000 μ M, 5 내지 100,000 μ M, 10 내지 100,000 μ M, 15 내지 100,000 μ M, 20 내지 100,000 μ M, 25 내지 100,000 μ M, 30 내지 100,000 μ M, 35 내지 100,000 μ M, 40 내지 100,000 μ M, 45 내지 100,000 μ M, 0.001 내지 50,000 μ M, 0.01 내지 50,000 μ M, 0.1 내지 50,000 μ M, 1 내지 50,000 μ M, 5 내지 50,000 μ M, 10 내지 50,000 μ M, 15 내지 50,000 μ M, 20 내지 50,000 μ M, 25 내지 50,000 μ M, 30 내지 50,000 μ M, 35 내지 50,000 μ M, 40 내지 50,000 μ M, 45 내지 50,000 μ M, 0.001 내지 10,000 μ M, 0.01 내지 10,000 μ M, 0.1 내지 10,000 μ M, 1 내지 10,000 μ M, 5 내지 10,000 μ M, 10 내지 10,000 μ M, 15 내지 10,000 μ M, 20 내지 10,000 μ M, 25 내지 10,000 μ M, 30 내지 10,000 μ M, 35 내지 10,000 μ M, 40 내지 10,000 μ M, 45 내지 10,000 μ M, 0.001 내지 5,000 μ M, 0.01 내지 5,000 μ M, 0.1 내지 5,000 μ M, 1 내지 5,000 μ M, 5 내지 5,000 μ M, 10 내지 5,000 μ M, 15 내지 5,000 μ M, 20 내지 5,000 μ M, 25 내지 5,000 μ M, 30 내지 5,000 μ M, 35 내지 5,000 μ M, 40 내지 5,000 μ M, 45 내지 5,000 μ M, 0.001 내지 1,000 μ M, 0.01 내지 1,000 μ M, 0.1 내지 1,000 μ M, 1 내지 1,000 μ M, 5 내지 1,000 μ M, 10 내지 1,000 μ M, 15 내지 1,000 μ M, 20 내지 1,000 μ M, 25 내지 1,000 μ M, 30 내지 1,000 μ M, 35 내지 1,000 μ M, 40 내지 1,000 μ M, 45 내지 1,000 μ M, 0.001 내지 500 μ M, 0.01 내지 500 μ M, 0.1 내지 500 μ M, 1 내지 500 μ M, 5 내지 500 μ M, 10 내지 500 μ M, 15 내지 500 μ M, 20 내지 500 μ M, 25 내지 500 μ M, 30 내지 500 μ M, 35 내지 500 μ M, 40 내지 500 μ M, 45 내지 500 μ M, 0.001 내지 300 μ M, 0.01 내지 300 μ M, 0.1 내지 300 μ M, 1 내지 300 μ M, 5 내지 300 μ M, 10 내지 300 μ M, 15 내지 300 μ M, 20 내지 300 μ M, 25 내지 300 μ M, 30 내지 300 μ M,

35 내지 300 μM , 40 내지 300 μM , 45 내지 300 μM , 0.001 내지 100 μM , 0.01 내지 100 μM , 0.1 내지 100 μM , 1 내지 100 μM , 5 내지 100 μM , 10 내지 100 μM , 15 내지 100 μM , 20 내지 100 μM , 25 내지 100 μM , 30 내지 100 μM , 35 내지 100 μM , 40 내지 100 μM , 45 내지 100 μM , 0.001 내지 80 μM , 0.01 내지 80 μM , 0.1 내지 80 μM , 1 내지 80 μM , 5 내지 80 μM , 10 내지 80 μM , 15 내지 80 μM , 20 내지 80 μM , 25 내지 80 μM , 30 내지 80 μM , 35 내지 80 μM , 40 내지 80 μM , 45 내지 80 μM , 0.001 내지 60 μM , 0.01 내지 60 μM , 0.1 내지 60 μM , 1 내지 60 μM , 5 내지 60 μM , 10 내지 60 μM , 15 내지 60 μM , 20 내지 60 μM , 25 내지 60 μM , 30 내지 60 μM , 35 내지 60 μM , 40 내지 60 μM , 45 내지 60 μM , 0.001 내지 55 μM , 0.01 내지 55 μM , 0.1 내지 55 μM , 1 내지 55 μM , 5 내지 55 μM , 10 내지 55 μM , 15 내지 55 μM , 20 내지 55 μM , 25 내지 55 μM , 30 내지 55 μM , 35 내지 55 μM , 40 내지 55 μM 또는 45 내지 55 μM 의 농도로 포함할 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 의약 용도

[0035] 일 예는 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하는, 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0036] 다른 예는 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체를 유효성분으로 포함하고 체중, 체지방 또는 혈당 감소 효과가 있는, 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0037] 다른 예는 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하는, 체중, 체지방 또는 혈당 감소용 약학적 조성물을 제공한다.

[0038] 다른 예는 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체를 유효성분으로 포함하고 Cd36, Lpl, Srebp1c, Fas, PPAR γ 및 C/EBP α 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 암호화 유전자 수준 감소 효과가 있는, 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0039] 다른 예는 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체를 유효성분으로 포함하고 Acs11, Cpt1 α , Ucp1, Pgc1 α , 및 Prdm16으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 암호화 유전자 수준 증가 효과가 있는, 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0040] 다른 예는 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체를 유효성분으로 포함하고 p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT 및 p-mTOR/mTOR로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 암호화 유전자 수준 감소 효과가 있는, 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0041] 다른 예는 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체를 유효성분으로 포함하고 p-AMPK/AMPK 및/또는 이의 암호화 유전자 수준 증가 효과가 있는, 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0042] 상기 단백질 또는 이의 암호화 유전자 수준 감소 또는 증가는 상기 약학적 조성물의 비투여군 (투여 전, 또는 비투여된 동종의 다른 대상)과 비교하여 판단할 수 있다

[0043] 상기 단백질 또는 이의 암호화 유전자 수준의 정량은 Quantitative real-time PCR, 면역조직화학검사법, 웨스턴 블랏, ELISA, mRNA 마이크로 어레이 등의 통상적인 정량 방법에 의하여 수행될 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044] 일 예에서, 상기 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 Cd36, Lpl, Srebp1c, Fas, PPAR γ , C/EBP α , p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT 및 p-mTOR/mTOR로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 암호화 유전자 수준이 비만으로 판단되지 않은 개체보다 높은 대상에 투여하기 위한 것을 수 있다. 다른 예에서, 상기 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 Acs11, Cpt1 α , Ucp1, Pgc1 α , Prdm16 및 p-AMPK/AMPK로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 암호화 유전자 수준이 비만으로 판단되지 않은 개체보다 낮은 대상에 투여하기 위한 것일 수 있다. 이 때, 상기 비만으로 판단되지 않은 개체는 체질량지수 (BMI; 체중을 신장의 제곱으로 나눈 값; kg/m^2)가 약 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 이상인 개체를 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 상기 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체는 앞서 설명한 바와 같다.

[0046] 상기 혈당 감소는 혈액 내 포도당 농도의 감소를 의미한다.

[0047] 일 예에서, 비만은 체질량지수 (BMI; 체중을 신장의 제곱으로 나눈 값; kg/m^2)가 약 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 이상인 상태를 의미

할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0048] 본 명세서에서, “치료”는 질병 상태 또는 증상의 개선, 경감 또는 안정화, 부분적 또는 완전한 회복, 생존의 연장, 질환 범위의 감소, 질병 진행의 지연 또는 완화, 기타 다른 이로온 치료 결과 등을 모두 포함하는 의미로 사용된다. “예방”은 특정 질병을 갖지 않는 대상에게 작용하여 상기 특정 질병이 발병하지 않도록 하거나, 그 발병 시기를 늦추거나, 발병 빈도를 낮추는 모든 기작 및/또는 효과를 포함하는 의미로 사용된다.
- [0049] 본 명세서에서 제공되는 약학적 조성물 내의 유효성분으로 사용된 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체의 함량은 사용 형태 및 목적, 사용 대상의 상태, 증상의 종류 및 경증 등에 의하여 적절하게 조절할 수 있으며, 고형분 (추출물에서 용매를 제거한 고형성분) 중량 기준으로 0.001 내지 99.9 중량%, 0.001 내지 90 중량%, 0.001 내지 75 중량%, 0.001 내지 50 중량%, 0.01 내지 99.9 중량%, 0.01 내지 90 중량%, 0.01 내지 75 중량%, 0.01 내지 50 중량%, 0.1 내지 99.9 중량%, 0.1 내지 90 중량%, 0.1 내지 75 중량%, 0.1 내지 50 중량%, 1 내지 99.9 중량%, 1 내지 90 중량%, 1 내지 75 중량%, 1 내지 50 중량%, 5 내지 99.9 중량%, 5 내지 90 중량%, 5 내지 75 중량%, 5 내지 50 중량%, 10 내지 99.9 중량%, 10 내지 90 중량%, 10 내지 75 중량%, 또는 10 내지 50 중량% 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0050] 또한, 상기 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체의 함량은 상기 약학적 조성물을 투여하는 대상의 체중 기준으로 0.001 내지 400 mg/kg (body weight; BW), 1 내지 400 mg/kg, 50 내지 400 mg/kg, 100 내지 400 mg/kg, 0.001 내지 300 mg/kg, 1 내지 300 mg/kg, 50 내지 300 mg/kg, 100 내지 300 mg/kg, 0.001 내지 200 mg/kg, 1 내지 200 mg/kg, 50 내지 200 mg/kg, 100 내지 200 mg/kg, 0.001 내지 100 mg/kg, 1 내지 100 mg/kg 또는 50 내지 100 mg/kg일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0051] 상기 약학적 조성물 또는 유효성분인 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체는 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트, 토끼 등의 설치류, 이외의 개, 고양이, 소, 돼지, 양, 말, 염소 등을 포함하는 포유류, 닭, 오리, 거위 등을 포함하는 조류, 뱀, 도마뱀, 거북, 악어 등을 포함하는 파충류, 양서류, 및 어류 등의 척추동물에서 선택된 투여 대상에 다양한 경로로 투여될 수 있다.
- [0052] 상기 약학적 조성물의 투여 방식은 통상적으로 사용되는 모든 방식일 수 있으며, 예컨대, 경구 투여, 또는 정맥, 근육, 피하, 또는 복강 주사 등의 비경구 투여의 경로로 투여될 수 있다. 일 예에서, 상기 약학적 조성물은 경구 투여를 위한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0053] 상기 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 또는 멸균 주사용액의 형태의 비경구 제형 등으로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0054] 상기 약학적 조성물은 앞서 설명한 유효성분 이외에도, 일반적으로 투여방식과 표준 약제학적 관행 (Standard pharmaceutical practice)을 고려하여 선택된 약제학적 및/또는 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제, 및 희석제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 보조제와 혼합되어 투여될 수 있다. 예컨대, 상기 약제학적 및/또는 생리학적으로 허용되는 담체는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 약제학 분야에서 통상적으로 사용되는 모든 담체일 수 있다.
- [0055] 상기 약제학적 및/또는 생리학적으로 허용되는 희석제 및/또는 부형제는 약학적 조성물의 적절한 제제화에 통상적으로 사용되는 모든 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 윤활제, 계면활성제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0056] 예컨대, 정제, 환제, 산제, 과립제, 또는 캡슐제 등의 경구투여를 위한 고형 제제의 경우, 상기 부형제는 이러한 고형 제제의 제제화를 위한 적어도 1종 이상의 물질, 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트 (Calcium carbonate), 수크로스 (Sucrose), 락토오스 (Lactose), 젤라틴 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 이외에도, 마그네슘 스테아레이트 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 또한, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등의 경구투여를 위한 액상제제의 제제화의 경우, 통상적으로 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 사용될 수 있고, 이외에, 통상적으로 사용되는 여러 가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 및/또는 보존제 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0057] 예컨대, 상기 약학적 조성물은 전분 또는 락토오스를 함유하는 정제 형태로, 또는 적절한 부형제를 함유하는 캡슐 형태로, 또는 맛을 내거나 색을 띄게 하는 화학 약품을 함유하는 엘릭시르 또는 현탁제 형태로 경구, 구강내

또는 허밀 투여될 수 있다. 이러한 액체 제제는 현탁제 (예를 들면, 메틸셀룰로오즈, 위텡솔 (Witepsol)과 같은 반합성 글리세라이드 또는 행인유 (Apricot kernel oil)와 PEG-6 에스테르의 혼합물 또는 PEG-8과 카프릴릭/카프릭 글리세라이드의 혼합물과 같은 글리세라이드 혼합물)와 같은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제와 함께 제형화 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0059] 식품 조성물

[0060] 일 예는 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하는, 식품 조성물을 제공한다.

[0061] 다른 예는 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하고 Cd36, Lpl, Srebp1c, Fas, PPAR γ 및 C/EBP α 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 암호화 유전자 수준 감소 효과가 있는, 식품 조성물을 제공한다.

[0062] 다른 예는 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하고 Acs11, Cpt1 α , Ucp1, Pgc1 α , 및 Prdm16으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 암호화 유전자 수준 증가 효과가 있는, 식품 조성물을 제공한다.

[0063] 다른 예는 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하고 p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT 및 p-mTOR/mTOR로 이루어진 군에서 선택된 1종 또는 이의 암호화 유전자 수준 감소 효과가 있는, 식품 조성물을 제공한다.

[0064] 다른 예는 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 (GNHDC)를 유효성분으로 포함하고 p-AMPK/AMPK 또는 이의 암호화 유전자 수준 증가 효과가 있는, 식품 조성물을 제공한다.

[0065] 상기 단백질 또는 이의 암호화 유전자 수준 감소 또는 증가는 상기 식품 조성물의 비투여군 (투여 전, 또는 비투여된 동종의 다른 대상)과 비교하여 판단할 수 있다

[0066] 상기 단백질 또는 이의 암호화 유전자 수준의 정량은 Quantitative real-time PCR, 면역조직화학검사법, 웨스턴 블랏, ELISA, mRNA 마이크로 어레이 등의 통상적인 정량 방법에 의하여 수행될 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0067] 일 예에서, 상기 식품 조성물은 Cd36, Lpl, Srebp1c, Fas, PPAR γ , C/EBP α , p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT 및 p-mTOR/mTOR로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 암호화 유전자 수준이 비만으로 판단되지 않은 개체보다 높은 대상에 투여하기 위한 것을 수 있다. 다른 예에서, 상기 식품 조성물은 Acs11, Cpt1 α , Ucp1, Pgc1 α , Prdm16 및 p-AMPK/AMPK로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 암호화 유전자 수준이 비만으로 판단되지 않은 개체보다 낮은 대상에 투여하기 위한 것을 수 있다. 이 때, 상기 비만으로 판단되지 않은 개체는 체질량지수 (BMI; 체중을 신장의 제곱으로 나눈 값; kg/m²)가 약 25kg/m² 이상인 개체를 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0068] 상기 식품 조성물은 비만 예방 및/또는 개선용 식품 조성물, 체중, 체지방 또는 혈당 감소용 식품 조성물일 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0069] 본 명세서에서 제공되는 식품 조성물에서, 용어 "식품"은 영양소를 한 가지 이상 함유하고 있는 식용의 천연물 또는 가공품을 의미하며, 통상적인 의미로서, 각종 일반 식품, 건강기능식품, 음료, 식품 첨가제, 음료 첨가제 등으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 의미하기 위하여 사용될 수 있다. 용어 "식품 조성물"은 상기 식품을 제조하기 위한 재료의 조합을 의미할 수 있다. 일 예에서, 상기 식품은 건강기능식품을 의미할 수 있다.

[0070] 상기 식품 조성물 내의 상기 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체의 함량은 식품사용 형태, 목적 등에 의하여 적절하게 조절할 수 있으며, 예컨대, 고형분 중량 기준으로 0.00001 내지 99.9 중량%, 0.0001 내지 99.9 중량%, 0.001 내지 99.9 중량%, 또는 0.001 내지 50 중량%일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0071] 또한, 상기 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체의 함량은 상기 식품 조성물을 투여하는 대상의 체중 기준으로 0.001 내지 400 mg/kg (body weight; BW), 1 내지 400 mg/kg, 50 내지 400 mg/kg, 100 내지 400 mg/kg, 0.001 내지 300 mg/kg, 1 내지 300 mg/kg, 50 내지 300 mg/kg, 100 내지 300 mg/kg, 0.001 내지 200 mg/kg, 1 내지 200 mg/kg, 50 내지 200 mg/kg, 100 내지 200 mg/kg, 0.001 내지 100 mg/kg, 1 내지 100 mg/kg 또는 50 내지 100 mg/kg일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0072] 상기 식품 조성물의 투여 '대상'은 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트, 토끼 등의 설치류, 이외의 개, 고양이, 소, 돼지, 양, 말, 염소 등을 포함하는 포유류, 닭, 오리, 거위 등을 포함하는 조류, 뱀, 도마뱀, 거북, 악어 등을 포함하는 파충류, 양서류, 및 어류 등의 척추동물 중에서 선택된 개체, 상기 개체로부터 분리된 세포, 조직, 또는 세포 배양물 등일 수 있다.

발명의 효과

[0074] 본 명세서에서 제공하는 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체인 NHDC-O-glycoside (1-(4-((2-O-[6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl])-(4-O- α -D-glucopyranosyl)]- β -D-glucopyranosyl)oxy)-2,6-dihydroxyphenyl)-3-[3-hydroxy-4-methoxyphenyl]-1-propanone) (GNHDC)를 유효성분으로 포함하는 조성물은 체중, 체지방 및/또는 혈당 감소 효과를 가져, 비만 예방, 치료 및/또는 개선 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

[0075] 도 1은 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 (1-(4-((2-O-[6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl)]- β -D-glucopyranosyl)oxy)-2,6-dihydroxyphenyl)-3-[3-hydroxy-4-methoxyphenyl]-1-propanone) (NHDC) 및 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체인 NHDC-O-glycoside (1-(4-((2-O-[6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl])-(4-O- α -D-glucopyranosyl)]- β -D-glucopyranosyl)oxy)-2,6-dihydroxyphenyl)-3-[3-hydroxy-4-methoxyphenyl]-1-propanone) (GNHDC)의 구조를 보여주는 화학식이다.

도 2는 NHDC 및 GNHDC의 마우스의 공복 혈당에 대한 효과를 보여주는 그래프이다. Ctrl은 NHDC 및 GNHDC가 아닌 인산염 완충 식염수 (phosphate-buffered saline, PBS)를 먹인 대조군을 의미한다.

도 3은 NHDC 및 GNHDC가 마우스 피하 지방 세포에 미치는 효과를 보여주는 사진 및 그래프이다.

도 4는 NHDC 및 GNHDC가 마우스 피하 지방 조직에서 지방산 흡수, lipogenesis, adipogenesis, β -산화 및 갈색 지방화 관련 유전자에 미치는 효과를 quantitative real-time PCR로 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

도 5는 GNHDC가 3T3-L1 세포에서 트리글리세리드 축적에 미치는 효과를 oil red O staining으로 분석한 결과를 보여주는 사진 및 그래프이다.

도 6은 GNHDC가 3T3-L1 세포에서 세포 생존력에 미치는 효과를 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 분석으로 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

도 7 및 8은 GNHDC가 lipogenesis 및 adipogenesis에 미치는 효과를 quantitative real-time PCR로 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

도 9 내지 11은 GNHDC가 PI3K/AKT/mTOR 경로에 미치는 효과를 웨스턴 블랏으로 분석한 결과를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0076] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0078] 실시예 1. 실험물질 및 실험동물 준비

[0079] 실시예 1-1. 실험물질 준비

[0080] U.S. Horticultural Research Laboratory에서 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 ((1-(4-((2-O-[6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl)]- β -D-glucopyranosyl)oxy)-2,6-dihydroxyphenyl)-3-[3-hydroxy-4-methoxyphenyl]-1-propanone), NHDC) 및 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체인 NHDC-O-glycoside (1-(4-((2-O-[6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl])-(4-O- α -D-glucopyranosyl)]- β -D-glucopyranosyl)oxy)-2,6-dihydroxyphenyl)-3-[3-hydroxy-4-methoxyphenyl]-1-propanone) (GNHDC)를 제공받았고, 상기 NHDC 및 GNHDC의 구조를 도 1에 나타내었다. 체외 연구를 위해 상기 NHDC를 0.2% dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로, 상기 GNHDC를 0.1% 에탄올 (Merck, Darmstadt, Germany)로 30, 50 또는 100 μ M의 농도로 희석하였고, 별도로

체내 연구를 위해 상기 NHDC 및 GNHDC를 인산염 완충 식염수 (phosphate-buffered saline, PBS)에 용해시켰다.

[0082] 실시예 1-2. 실험동물 준비

[0083] Central Lab Animal Inc. (서울, 한국)에서 5주령 수컷 C57BLKS/J db/db 마우스를 구매하고, 상기 마우스를 개별적으로 20 ~ 22℃의 온도, 45 ~ 55%의 습도에서 12시간은 밝은 곳, 12시간은 어두운 곳에 두는 사이클에 따라 준비하였다. 상기 마우스는 상기 조건으로 2주간의 적응 기간을 거친 후, 체중과 공복 혈당 수준을 기준으로 무작위로 다음과 같은 3개의 그룹 (그룹당 9마리의 마우스)으로 나누었다: PBS를 경구 투여한 마우스 (대조군); 상기 실시예 1-1에서 체내 연구를 위해 준비한 NHDC를 마우스 체중 (body weight; b.w.) 1kg당 100mg의 양으로 경구 투여한 마우스 (NHDC); 및 상기 실시예 1-1에서 체내 연구를 위해 준비한 GNHDC를 마우스 체중 1kg당 100mg의 양으로 경구 투여한 마우스 (GNHDC). 상기 마우스에 접종한 모든 시약은 4주동안 주5일 경구 위관 영양제로 제공되었다. 상기 마우스는 modified American Institute of Nutrition (AIN)-93G 식단 (Raonbio, Yongin, Korea)에 따라 급이하고 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험 기간 동안 체중, 음식물 섭취량 및 수분 섭취량을 일주일에 두 번 기록하였다. 공복 혈당 수치는 꼬리 정맥에서 Accu-Check (Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 측정하였다. 상기 마우스를 희생한 후, 전혈을 13,000 rpm, 4℃ 온도에서 15분동안 원심분리 하였다. 피하 지방 조직을 PBS로 행구고 액체 질소에서 냉동시켰다. 모든 샘플은 추가 분석까지 -80℃에서 보관하였다. 연구 절차 및 실험은 이화여자대학교 동물병원 동물 관리위원회 (IACUC 승인번호: 19-052)의 승인을 받았다.

[0085] 실시예 2. 각종 마우스 분석 방법

[0086] 실시예 2-1. 경구 포도당 내성 검사

[0087] 상기 실시예 1-2에서 2주간의 적응기간을 거친 PBS, NHDC 및 GNHDC를 각각 경구 투여한 3개의 마우스 그룹 각각의 마우스를 밤새 단식시키고, 마우스 체중 1kg당 1g의 포도당 용액을 경구로 제공하여 경구 포도당 내성 테스트 (oral glucose tolerance test, OGTT)를 수행하였다. 공복 혈당 수치는 꼬리 정맥에서 Accu-Check (Roche)를 사용하여 0, 30, 60, 90 및 120분에 모니터링 하였고, OGTT의 곡선 아래의 면적 (area under the curve, AUC)을 OGTT 곡선에서 계산하였다.

[0089] 실시예 2-2. 마우스 내 생화학적 수치 분석

[0090] 전체 콜레스테롤 수치를 측정하기 위해, 상기 실시예 1-2에서 PBS로 행군 피하 지방 조직을 이용하여 시판용 키트 (아산 제약, 서울, 한국)로 측정하였다.

[0091] 상기 실시예 1-2에서 PBS로 행군 피하 지방 조직을 이용하여 마우스 내 아디포넥틴 수치는 효소 결합 면역 흡착 분석 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 키트 (Crystal Chem, Elk Grove Village, IL, USA)로 측정하였고, 비-에스테르화 지방산 (non-esterified fatty acid, NEFA) 수치를 효소 비색법 분석 (enzymatic colorimetric method assay) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)을 통해 측정하였고, 인슐린 수치도 ELISA 키트 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)를 사용하여 측정하였다.

[0093] 실시예 2-3. 마우스 내 조직학적 분석

[0094] 상기 실시예 1-2에서 PBS로 행군 피하 지방 조직을 10% 포르말린으로 고정하고 파라핀에 포매시킨 후, 자일렌으로 파라핀을 제거하고 재수화한 후 헤마톡실린 및 에오신 (Hematoxylin and eosin, H&E) 염색을 수행하였다. 염색된 부분을 현미경 (Nikon, 도쿄, 일본)으로 관찰하고 촬영한 후, 피하 지방 조직의 지방 세포 영역을 ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA)를 사용하여 정량화하였다.

[0096] 실시예 2-4. Quantitative real-time PCR

[0097] Trizol 시약 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 샘플을 추출하고, RNA 농도와 품질을 Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)으로 확인하였고, cDNA를 RevertAid reverse transcriptase (Thermo

Scientific)를 42℃에서 1시간 사용하고 72℃에서 3분동안 사용하여 준비하였다. 제조업체의 프로토콜에 따라 Rotor-Gene® Q (Qiagen, Hilden, Germany) 및 2X SYBR Green PCR master mix (Qiagen)를 사용하여 Quantitative real-time PCR을 수행하였다. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)를 in vivo 및 in vitro 상 모두에서의 연구를 위한 대조군으로 사용하였다. 상기 PCR에서 사용된 Acs11 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 1), Cd36, C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein, alpha), Cpt1α (carnitine palmitoyltransferase 1a), Fas (fatty acid synthase), Lpl (lipoprotein lipase), Pgc1α (peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha), PPARγ (peroxisome proliferator activated receptor gamma), Prdm16 (PR domain containing 16), Srebp1c (sterol regulatory element binding transcription factor 1), Ucp1 (uncoupling protein 1) 및 Gapdh (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)의 프라이머 서열은 표 1에 나타내었다.

표 1

유전자이름	유전자 ID (NCBI)	염기서열 (5' → 3')	서열번호
Acs11 Forward	14081	tgccagagctgattgacattc	1
Acs11 Reverse		ggcataccagaaggtggtgag	2
Cd36 Forward	12491	gtgctctcccttgattctgc	3
Cd36 Reverse		tgagaatgcctccaaacaca	4
C/EBP α (C/EBPalph) Forward	12606	ccaagaagtcggtggacaaga	5
C/EBP α (C/EBPalph) Reverse		cggcatgtgactggtcaact	6
Cpt1α (Cpt1alpha) Forward	12894	aaccagtgccctaacgatg	7
Cpt1α (Cpt1alpha) Reverse		gaactggtggccaatgagat	8
Fas Forward	14104	tgtgagtgggttcagaggcat	9
Fas Reverse		ttctgtagtgccagcaagct	10
Lpl Forward	16956	gagtttgaccgccttcg	11
Lpl Reverse		tcccggttaccgtccatcc	12
Pgc1α (Pgc1alpha) Forward	19017	tcgagctgtacttttgtgga	13
Pgc1α (Pgc1alpha) Reverse		tcatacttgctcttggtgga	14
PPAR γ (PPARgamma) Forward	19016	gagcacttcacaagaaattacc	15
PPAR γ (PPARgamma) Reverse		gaactccatagtgaagcct	16
Prdm16 Forward	70673	agatgaaccaggcatccact	17
Prdm16 Reverse		tctacgtcctctggctttgc	18
Srebp1c Forward	20787	tagagcatatccccagggtg	19
Srebp1c Reverse		ggtacgggccacaagaagta	20
Ucp1 Forward	22227	ccaagccaggatggtgaac	21
Ucp1 Reverse		ccagcgggaagtgatgata	22
Gapdh Forward	14433	aactttggcattgtggaagg	23
Gapdh Reverse		tgtgagggagatgctcagt	24

실시예 2-5. 세포 배양

뮤린 전지방 세포주인 3T3-L1을 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구매하였고, 10% bovine calf serum (Gibco, Grand Island, NY, USA) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (penicillin/streptomycin (P/S)) (Invitrogen)이 보충된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Welgene, Gyeongsan, Korea)에서 37℃ 온도 및 5% CO₂ 환경에서 보관하였다. 상기 세포를 DMEM, 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco), 1% P/S, 500 μM isobutylmethylxanthine (Sigma-Aldrich), 1 μM dexamethasone (Sigma-Aldrich) 및 10 μg/ml 인슐린 (Welgene)에서 2일동안 지방세포로 분화시켰다. 분화 후, 상기 지방세포를 10% FBS, 1% P/S 및 1 μg/ml 인슐린에서 6일동안 배양하였다. 세포에 30, 50 또는 100 μM 농도의 상기 실시예 1-1에서 채취 연구를 위해 준비한 NHDC 또는 GNHDC를 8일동안 처리하였다.

실시예 2-6. Oil red O staining

트리글리세라이드 축적을 oil red O staining (Sigma-Aldrich)으로 측정하였다. 구체적으로, 상기 실시예 2-5에서 분화된 지방세포를 PBS로 행구고 10% 포름알데히드로 고정하였다. 60% 이소프로필 알코올로 세척한 후 상

기 고정한 지방세포를 oil red O staining 용액으로 염색하였다. 상기 oil red O staining 용액을 증류수로 씻어내고 슬라이드를 건조하였다. 상기 염색된 지방세포의 방울을 염색 용액이 100% 이소프로필 알코올에 용해되기 전에 Eclipse TS100 (Nikon)에 의해 촬영하였고, 정량화를 위해, 500nm에서 마이크로플레이트 리더 (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도를 기록하였다.

[0105] 실시예 2-7. 세포 생존력 분석

[0106] 세포 생존력을 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich) 분석으로 측정하였다. 구체적으로, 3T3-L1 세포를 96-웰 플레이트에 뿌리고 50 μ M 농도의 상기 실시예 1-1에서 채외 연구를 위해 준비한 NHDC 또는 GNHDC로 8일동안 처리하였다. 상기 NHDC 또는 GNHDC를 처리한 세포에서 배양액을 제거하고 37°C, 5% CO₂의 조건에서 500 μ g/ml MTT 용액이 함유된 배양액으로 3시간동안 처리하였다. 그 후, 560nm에서 마이크로플레이트 리더 (Molecular Device)를 사용하여 흡광도를 기록하였다.

[0108] 실시예 2-8. 웨스턴 블랏

[0109] 분화된 지방세포의 단백질 농도를 Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 Bradford 단백질 분석으로 측정하였고, 상기 단백질 샘플을 sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 사용하여 전기영동으로 변성 및 분리하였다. 그 후, 상기 단백질 샘플을 폴리비닐리덴 플로라이드 막 (polyvinylidene fluoride membranes) (Millipore, Billerica, MA, USA)으로 옮기고, Tween 20 (TBS-T)을 포함하는 Tris 완충 식염수에서 5% bovine serum albumin 또는 탈지유로 차단하였다. 상기 막은 4°C에서 상기 단백질에 대한 다음의 1차 항체와 함께 밤새 배양하였다: phosphoinositide 3 kinase (PI3K), phospho-phosphoinositide 3 kinase (p-PI3K), protein kinase B (AKT), phospho-protein kinase B (p-AKT), mammalian target of rapamycin (mTOR), phospho-mammalian target of rapamycin (p-mTOR), AMP-activated protein kinase (AMPK) 및 phospho-AMP-activated protein kinase (p-AMPK) (상기 항체 모두 Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA에서 입수) 및 β -actin (Abcam, Cambridge, UK). 상기 막을 TBS-T로 세척하고 2차 항체와 함께 1시간동안 배양하였다. 상기 검출된 단백질 밴드를 enhanced chemiluminescence (ECL) 시약 (Animal Genetics Inc., 수원, 한국)으로 검출하였다.

[0111] 실시예 2-9. 통계분석

[0112] 상기 실시예 2-1 내지 2-8의 분석결과를 평균 $\pm$ 평균의 표준오차 (standard error, SEM)로 표시하였고, Newman-Keuls' s 사후 테스트 또는 unpaired Student' s t-test를 사용하여 일원 분산 분석 (one-way ANOVA)으로 분석하였다. 상기 실험들은 적어도 세 번 수행되었다. P value가 0.05 미만인 경우 유의적인 결과로 간주하였다. GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) 소프트웨어는 데이터의 유의성을 평가하기 위해 사용되었다.

[0114] 실시예 3. NHDC 및 GNHDC가 마우스에 미치는 효과 분석 결과

[0115] 실시예 3-1. NHDC 및 GNHDC의 마우스 내 체중, 조직중량, 지질 프로파일 및 사이토카인에 미치는 효과

[0116] 상기 실시예 1-2에서 4주동안 주5일 경구 위관 영양제로 PBS, NHDC 또는 GNHDC를 제공받은 3개의 마우스 그룹의 각 마우스 및 상기 실시예 1-2와 실질적으로 동일한 방법으로 준비한 상기 마우스의 피하 지방 조직에 대하여 하기 표 2의 측정 대상을 측정하여, 각 그룹별로 얻어진 결과의 평균값을 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

측정대상	대조군	NHDC	GNHDC
최종 체중 (g)	37.75 $\pm$ 1.02 ^a	35.23 $\pm$ 0.64 ^a	35.32 $\pm$ 1.26 ^a
증체량 (g)	9.80 $\pm$ 0.67 ^a	8.01 $\pm$ 0.69 ^a	6.95 $\pm$ 0.79 ^b
1일 섭취량 (g/day)	6.25 $\pm$ 0.20 ^a	5.90 $\pm$ 0.20 ^a	6.00 $\pm$ 0.27 ^a

1일 섭취 수분량 (ml/day)	18.31 ± 1.47 ^a	14.68 ± 1.65 ^a	14.92 ± 1.68 ^a
피하 지방 조직 (g)	2.46 ± 0.47 ^a	1.27 ± 0.16 ^b	1.49 ± 0.19 ^b
전체 지방 조직 (g)	5.66 ± 0.49 ^a	4.42 ± 0.20 ^b	4.57 ± 0.24 ^b
전체 콜레스테롤 (mg/dl)	159.39 ± 3.60 ^a	158.81 ± 2.57 ^a	146.17 ± 4.03 ^b
NEFA (mEq/l)	0.73 ± 0.04 ^a	0.63 ± 0.02 ^a	0.61 ± 0.04 ^b
아디포넥틴 (ng/dl)	0.54 ± 0.02 ^{ab}	0.50 ± 0.02 ^a	0.62 ± 0.04 ^b
인슐린 (ng/dl)	1.77 ± 0.28 ^a	2.95 ± 0.36 ^b	1.42 ± 0.24 ^a

[0118] 구체적으로, 4주동안 시약을 제공한 각 그룹의 최종 체중을 측정하였고, 처음 (0주차) 체중 대비 최종 체중에서의 증가량 (최종 체중 - 처음 체중)을 통해 각 그룹별 증체량, 1일 섭취량, 1일 섭취 수분량을 측정하였고, 상기 마우스 피하 지방 조직의 무게를 측정하였고, 신장 지방, 내장 지방, 부고환 지방 및 피하 지방 무게를 합한 전체 지방 조직의 무게를 측정하였다.

[0119] 전체 콜레스테롤 수치는 상기 실시예 2-2와 실질적으로 동일한 방법으로 상기 체중 시판용 키트를 사용하여 각 그룹별로 측정하였고, NEFA, 아디포넥틴 및 인슐린 수치는 상기 실시예 2-2와 실질적으로 동일한 방법으로 키트를 이용하여 각 그룹별로 측정하였고, 피하 지방 조직 수치는 상기 실시예 2-3과 실질적으로 동일한 방법으로 정량화하여 각 그룹별로 측정하였다. 상기 측정된 수치는 상기 실시예 2-9와 실질적으로 동일한 방법으로 분석 결과를 표현 및 통계분석을 진행하였다.

[0120] 최종 체중은 NHDC를 먹인 그룹 (NHDC 그룹), GNHDC를 먹인 그룹 (GNHDC 그룹)에서 모두 감소하는 경향이 있었다. GNHDC 그룹의 체중 증가는 PBS를 먹인 그룹 (대조군 그룹)에 비해 29.1% (P<0.05) 유의하게 감소하였다.

[0121] 전체 콜레스테롤은 GNHDC 그룹에서 대조군 그룹에 비해 8.3% (P<0.05) 유의하게 감소하였다. NEFA는 대조군 그룹에 비해 GNHDC 그룹에서 16.3% (P<0.05) 유의하게 감소하였다. 또한, GNHDC 그룹에서는 아디포넥틴 (adiponectin)이 증가하는 경향이 있었고, 인슐린은 NHDC 그룹에서 유의하게 증가하였고 (P<0.01), 대조군 그룹에 비해 GNHDC 그룹에서 약간 감소하였다. 인슐린은 대표적인 동화호르몬으로 지방 축적을 유도하기 때문에 인슐린 레벨의 감소는 항비만 효과에 도움이 될 수 있다. 상기 체중 감소, 지방 무게 감소, NEFA의 감소, 아디포넥틴의 증가 및 인슐린의 감소 결과를 통해 항비만 효과를 확인하였다.

[0123] 실시예 3-2. NHDC 및 GNHDC가 마우스의 공복 혈당 수준 및 OGTT에 미치는 효과

[0124] 마우스에서 고혈당증에 대한 NHDC 및 GNHDC의 효과를 평가하기 위해 상기 실시예 2-1과 실질적으로 동일한 방법으로 공복 혈당 수준을 모니터링 하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 2주간의 적응기간 후에 PBS를 먹인 그룹 (대조군)에 비해 공복 혈당 수치는 GNHDC를 먹인 그룹에서 35.5% (P<0.01) 유의하게 감소하였다.

[0126] 실시예 3-3. NHDC 및 GNHDC가 마우스 피하 지방 세포 영역에 미치는 효과

[0127] 상기 실시예 2-3과 실질적으로 동일한 방법으로 상기 실시예 1-2에서 PBS로 행군 피하 지방 조직에 대해 H&E 염색을 수행하고, 지방 세포 영역의 정량화를 통해 면적을 측정하여 지방 조직의 조직학적 변화를 관찰하여 NHDC 및 GNHDC를 먹인 마우스 그룹의 지방 조직에 미치는 효과를 평가하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다. 상기 지방 세포 영역의 크기를 정량화한 결과, PBS를 먹인 대조군 그룹에 비해 GNHDC를 먹인 그룹에서 39.2% (P<0.01) 감소하였다.

[0129] 실시예 3-4. NHDC 및 GNHDC로 인한 마우스 피하 지방 조직에서 지질 대사를 위한 유전자 발현 분석

[0130] 마우스 피하 지방 조직에서 NHDC 및 GNHDC가 지방산 흡수, lipogenesis, adipogenesis, β-산화 및 갈색 지방화 관련 유전자에 미치는 효과를 평가하기 위해 상기 실시예 1-2의 피하 지방 조직을 샘플로 하여 상기 실시예

2-4와 실질적으로 동일한 방법으로 quantitative real-time PCR을 수행하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0131] 지방산 흡수에 대한 Cd36 및 Lpl의 mRNA 발현 수준을 분석하였고, Cd36 및 Lpl의 mRNA 발현은 PBS를 먹인 대조군 그룹에 비해 GNHDC를 먹인 그룹 (GNHDC 그룹)에서 각각 34.6%, 46.8% 하향 조절되었다 (모두 $P<0.05$). 지방 생성 관련 유전자에 대한 Srebp1c 및 Fas를 분석하였고, Srebp1c 및 Fas의 발현은 대조군 그룹에 비해 GNHDC 그룹에서 각각 41.0%, 49.7% 감소하였다 ($P<0.05$).

[0132] β -산화 관련 Acs11 및 Cpt1 α 유전자의 mRNA 발현 수준을 분석하였다. Acs11의 발현은 대조군 그룹과 비교하여 GNHDC 그룹에서 약 1.8배 상향 조절되었다 ($P<0.05$). Cpt1 α 의 발현은 GNHDC 그룹에서 약 1.5배 상향 조절되었다 ($P<0.05$).

[0133] 갈색 지방화와 관련된 Ucp1, Pgc1 α , 및 Prdm16 유전자의 mRNA 발현을 분석하였다. Ucp1의 발현은 대조군 그룹과 비교하여 GNHDC 그룹 ($P<0.01$)에서 상향 조절되었다. Pgc1 α 의 발현은 GNHDC 그룹에서 약 1.6배 상향 조절되었다 ($P<0.01$). Prdm16의 발현은 GNHDC 그룹에서 약 2.4배 상향 조절되었다 ($P<0.01$).

[0135] 실시예 3-5. GNHDC가 3T3-L1 세포의 지질 축적 및 세포 생존력에 미치는 효과 확인

[0136] GNHDC가 트리글리세리드 축적에 미치는 효과를 평가하기 위해 상기 실시예 2-5에서 준비한 체외 연구를 위해 준비한 GNHDC를 처리한 지방세포를 이용하여 상기 실시예 2-6과 실질적으로 동일한 방법으로 oil red O staining을 수행하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다. 대조군으로는 GNHDC를 처리하지 않은 지방세포를 준비하였다. GNHDC를 처리한 그룹은 대조군 그룹에 비해 염색된 지방세포 방울의 양이 감소하였다. 대조군 그룹과 비교하여 50 μ M 농도의 GNHDC를 처리한 그룹에서는 16.0% ($P<0.05$), 100 μ M 농도의 GNHDC를 처리한 그룹에서는 20.0% ($P<0.01$) 감소하였다.

[0137] 세포 생존력을 평가하기 위해 50 μ M GNHDC의 세포 독성을 상기 실시예 2-7과 실질적으로 동일한 방법으로 MTT 분석을 수행하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다. 두 감미료 처리에서 세포 생존력에는 유의한 차이가 없었다. 따라서, 50 μ M GNHDC를 사용하여 추가 시험관 내 실험을 수행하였다.

[0139] 실시예 3-6. GNHDC가 3T3-L1 세포의 lipogenesis, adipogenesis에 미치는 효과 분석

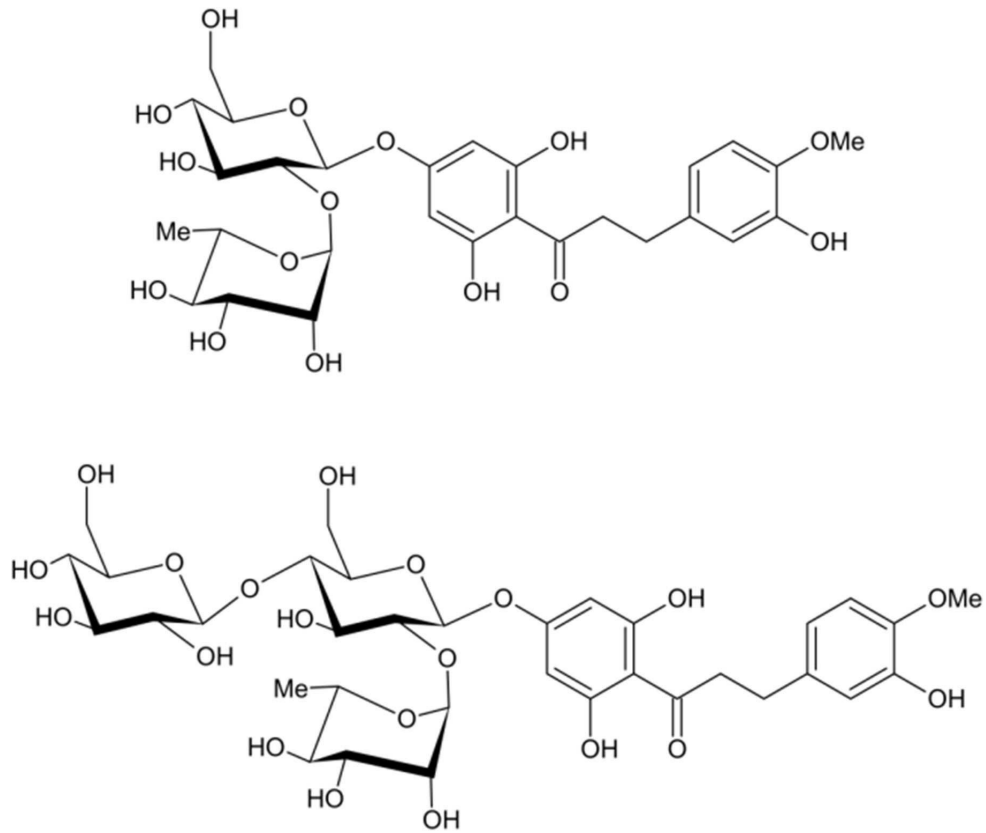
[0140] GNHDC가 lipogenesis 및 adipogenesis에 미치는 효과를 평가하기 위해 상기 실시예 2-5에서 준비한 50 μ M 농도의 상기 실시예 1-1에서 체외 연구를 위해 준비한 GNHDC를 8일동안 처리한 지방세포를 샘플로 하여 상기 실시예 2-4와 실질적으로 동일한 방법으로 quantitative real-time PCR을 수행하였고, 그 결과를 도 7 및 8에 나타내었다. 대조군으로는 GNHDC를 처리하지 않은 지방세포를 준비하였다. Lipogenesis를 위한 Srebp1c 및 Fas (도 7)와 adipogenesis를 위한 PPAR γ 및 C/EBP α 의 mRNA 발현 (도 8)을 분석하였다. Srebp1c의 발현은 대조군 그룹에 비해 GNHDC 처리한 그룹 (GNHDC 그룹)에서 48.5% ($P<0.01$) 감소하였다. Fas 발현은 대조군 그룹에 비해 GNHDC 그룹에서 51.8% ($P<0.01$) 감소하였다. PPAR γ 의 mRNA 발현은 대조군 그룹에 비해 GNHDC 그룹에서 27.9% ($P<0.01$) 감소하였다. C/EBP α 의 mRNA 발현은 대조군 그룹에 비해 GNHDC 그룹에서 44.2% ($P<0.01$) 감소하였다.

[0142] 실시예 3-7. GNHDC의 3T3-L1 세포에서 PI3K/AKT/mTOR 경로 및 AMPK에 미치는 효과 분석

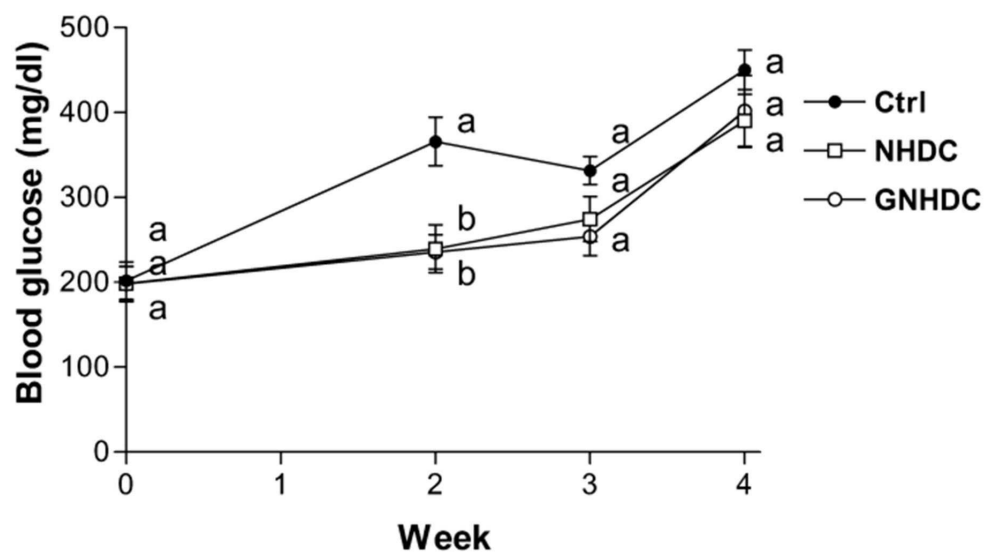
[0143] GNHDC가 PI3K/AKT/mTOR 경로에 미치는 효과를 평가하기 위해 상기 실시예 2-5에서 준비한 50 μ M 농도의 상기 실시예 1-1에서 체외 연구를 위해 준비한 GNHDC를 8일동안 처리한 지방세포의 단백질 농도를 상기 실시예 2-8과 실질적으로 동일한 방법으로 웨스턴 블랏을 수행하여 측정하였고, 그 결과를 도 9 내지 11에 나타내었다. 대조군으로는 GNHDC를 처리하지 않은 지방세포를 준비하였다. PI3K/AKT/mTOR 경로의 활성화는 lipogenesis 및 adipogenesis를 통해 세포 증식과 지질 합성을 증가시킨다. p-PI3K/PI3K의 발현은 대조군 그룹에 비해 GNHDC를 처리한 그룹 (GNHDC 그룹)에서 19.3% ($P<0.01$) 감소하였다 (도 10). p-AKT/AKT의 발현은 대조군 그룹에 비해 GNHDC 그룹에서 46.1% ($P<0.01$) 감소하였다 (도 10). p-mTOR/mTOR 발현은 대조군 그룹에 비해 GNHDC 그룹에서 12.7% ($P<0.01$) 감소하였다 (도 11). AMPK는 상기 신호 전달 경로를 억제하고 mTOR 발현을 억제한다. p-AMPK/AMPK의 발현은 대조군 그룹에 비해 GNHDC 그룹에서 2.5배 ($P<0.01$) 증가하였다.

도면

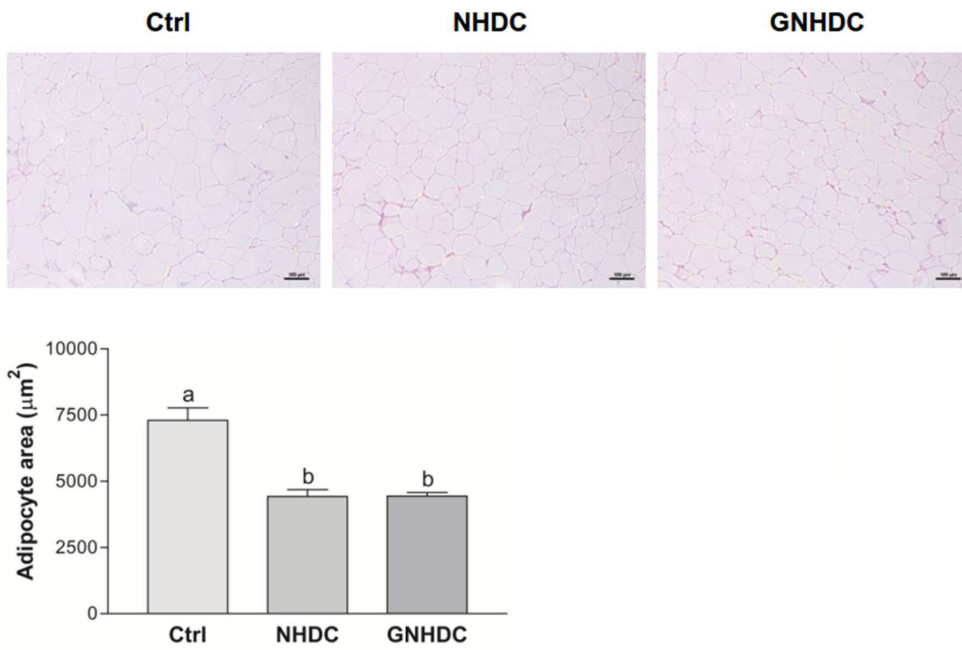
도면1



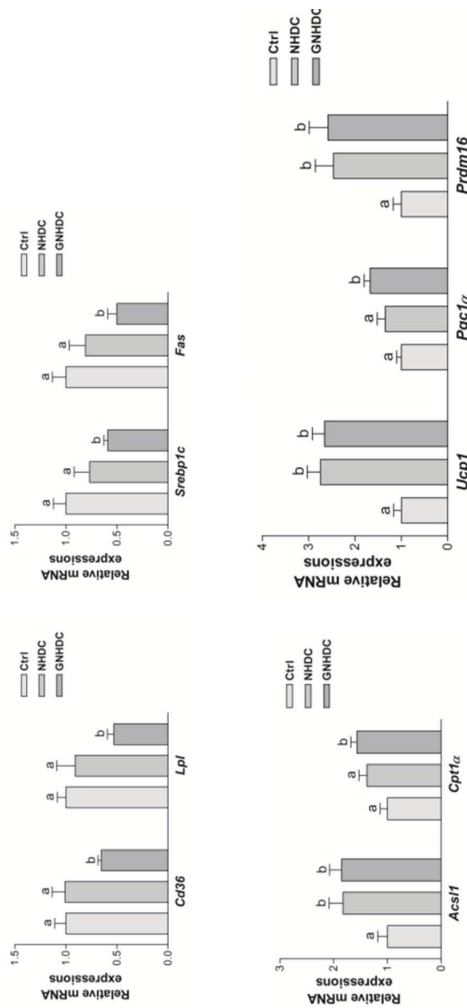
도면2



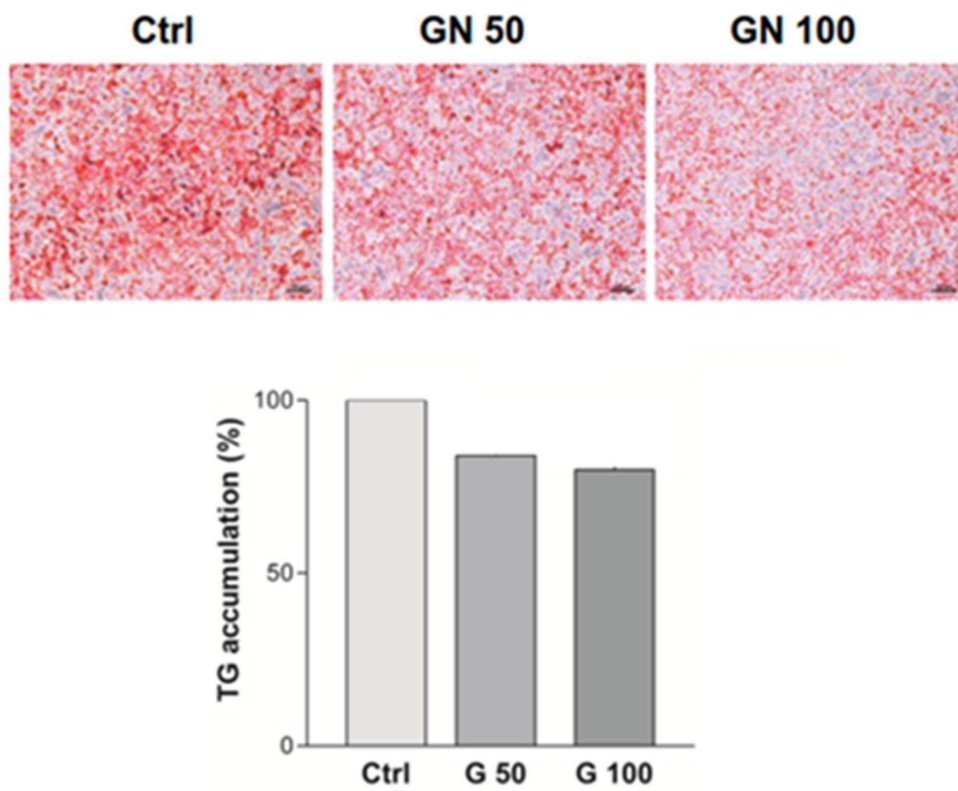
도면3



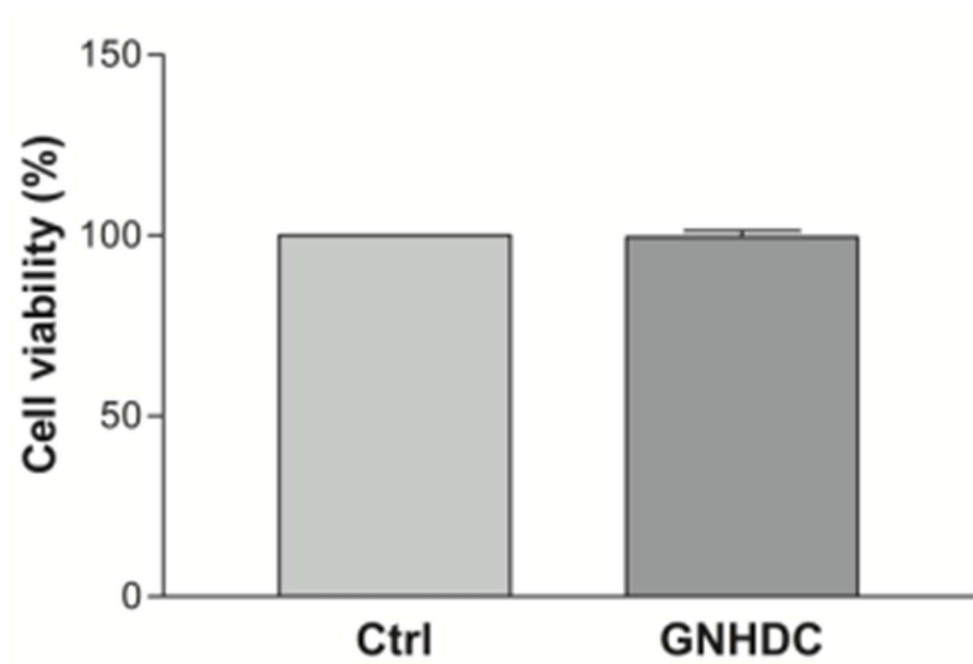
도면4



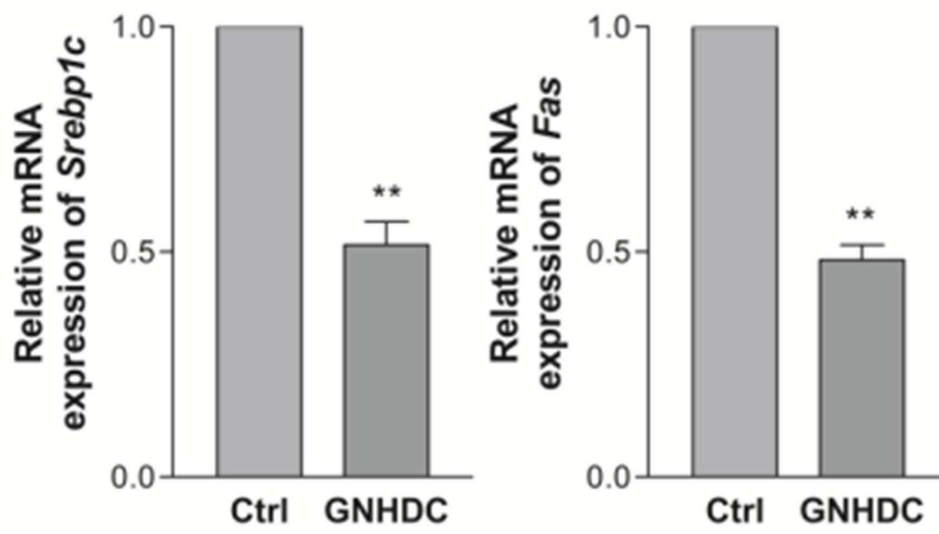
도면5



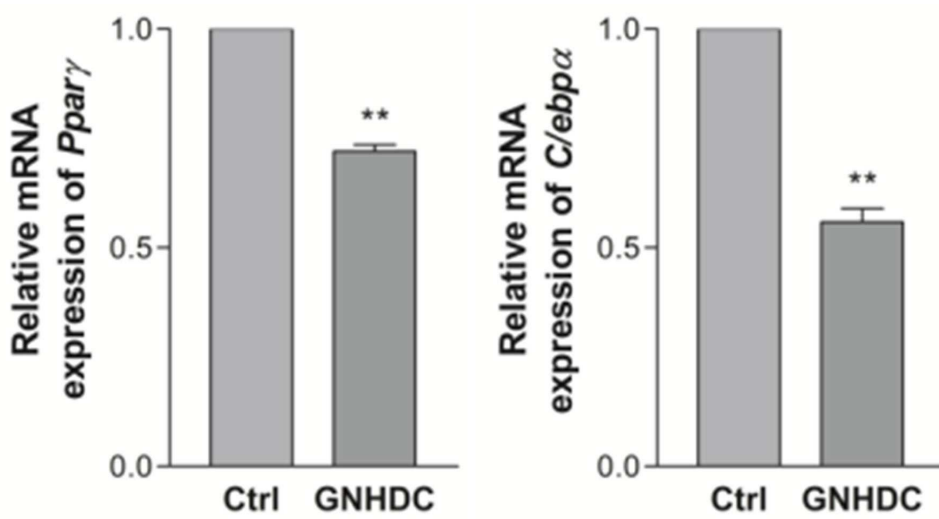
도면6



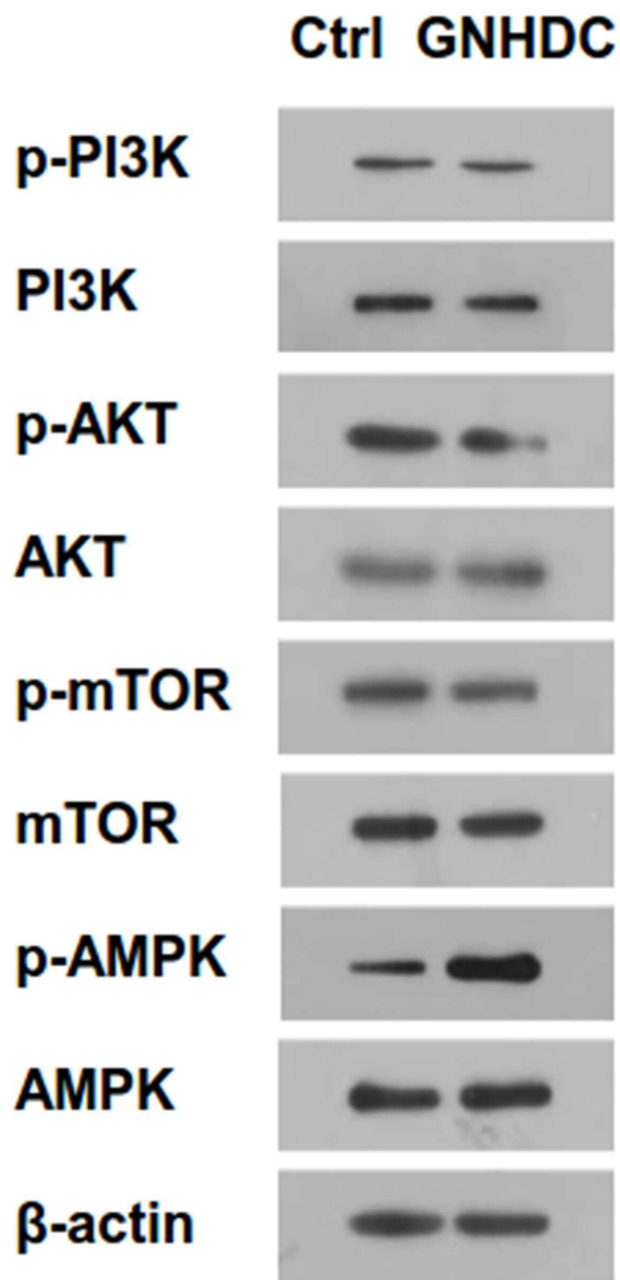
도면7



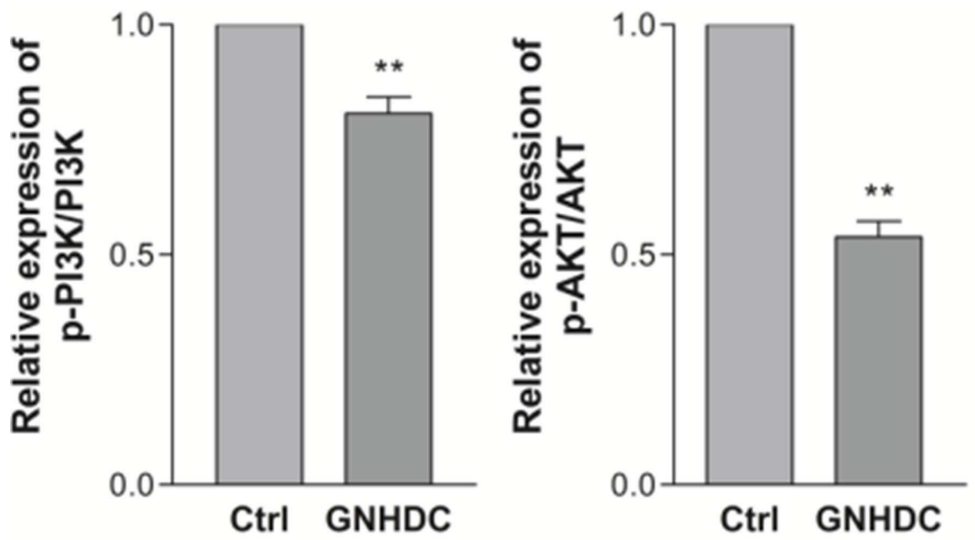
도면8



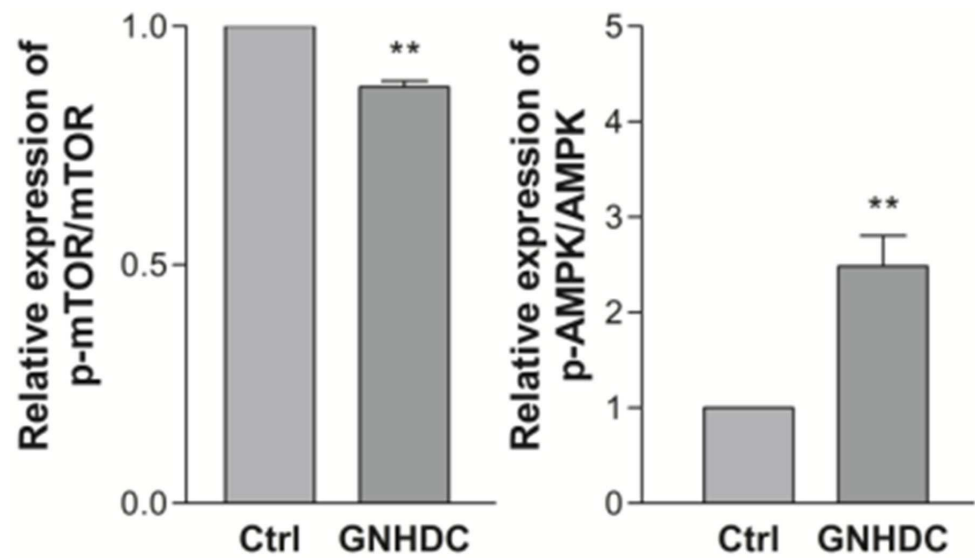
도면9



도면10



도면11



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
Seoul National University R&DB Foundation
- <120> Composition for reducing body weight, body fat, or blood sugar
including neohesperidin dihydrochalcone glycotransferase
- <130> DPP20210288KR
- <160> 24
- <170> koPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Acs11 Forward

<400> 1

tgccagagct gattgacatt c 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Acs11 Reverse

<400> 2

ggcataccag aaggtggtga g 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cd36 Forward

<400> 3

gtgctctccc ttgattctgc 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cd36 Reverse

<400> 4

tgagaatgcc tccaaacaca 20

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C/EBPalph Forward

<400> 5

ccaagaagtc ggtggacaag a 21

<210> 6

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C/EBPalph Reverse
 <400> 6
 cggtcattgt cactggtaa ct 22
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cptlalpha Forward
 <400> 7

 aaccagtcg cttacgatg 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Cptlalpha Reverse
 <400> 8
 gaactggtgg ccaatgagat 20
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fas Forward
 <400> 9
 tgtgagtggt tcagaggcat 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fas Reverse
 <400> 10

ttctgtagtg ccagcaagct	20
<210> 11	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Lpl Forward	
<400> 11	
gagtttgacc gccttccg	18
<210> 12	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Lpl Reverse	
<400> 12	
tcccgttacc gtccatcc	18
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Pgclalpha Forward	
<400> 13	
tcgagctgta cttttgtgga	20
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Pgclalpha Reverse	
<400> 14	
tcatacttgc tcttggtgga	20
<210> 15	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PPARgamma Forward	

<400

> 15

gagcacttca caagaaatta cc 22

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PPARgamma Reverse

<400> 16

gaactccata gtggaagcct 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Prdm16 Forward

<400> 17

agatgaacca ggcattccact 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Prdm16 Reverse

<400> 18

tctacgtcct ctggctttgc 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Srebp1c Forward

<400> 19

tagagcatat cccccaggtg 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Srebp1c Reverse	
<400>	20	
	ggtacgggcc acaagaagta	20
<210>	21	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Ucp1 Forward	
<400>	21	
	ccaagccagg atggtgaac	19
<210>	22	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Ucp1 Reverse	
<400>	22	
	ccagcgggaa ggtgatgata	20
<210>	23	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Gapdh Forward	
<400>	23	
	aactttggca ttgtggaagg	20
<210>	24	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Gapdh Reverse	
<400>	24	
	tgtgaggag atgctcagt	20