

발간등록번호

11-1543000-000204-01

천연물 유래 고부가가치 체중조절 건강
기능식품 소재 개발

The development of natural health food for
controlling the body weight

천연물 유래 고부가가치 체중조절 건강 기능식품 소재 개발 (제1세부과제)
The development of natural health food for controlling the body weight

기능식품 소재의 CB1 수용체 작용기전 연구 (제1협동과제)
The mechanistic study of functional food on the cannabinoid receptor CB1

(주) 유니젠

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 과제번호 110103-3 “천연물 유래 고부가가치 체중조절 건강 기능식품 소재 개발” 의 보고서로 제출합니다.

2013 년 9 월 30 일

주관연구기관명 : (주) 유 니 젠

주관연구책임자 : 현 유 진

세부연구책임자 : 현 유 진

연 구 원 : 이 강 우

연 구 원 : 이 영 철

연 구 원 : 김 태 우

연 구 원 : 김 현 진

연 구 원 : 남 정 범

연 구 원 : 김 미 란

연 구 원 : 오 미 선

연 구 원 : 이 보 수

연 구 원 : 황 지 혜

연 구 원 : 차 경 섭

연 구 원 : 박 미 혜

연 구 원 : 한 재 우

연 구 원 : 손 희 승

연 구 원 : 장 천

협동연구기관명 : 경북대학교

협동연구책임자 : 이 만 휘

요 약 문

I. 제 목

천연물 유래 고부가가치 체중조절 건강 기능식품 소재 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

체중 조절에 있어서 단일기전에 의한 효능을 주장하는 리모나반트 그리고 시브트라민 등의 약품들이 심각한 부작용에 의하여 시장에서 퇴출되고 있는 바, 복합기전에 의하여 체중조절 효능을 나타내는 건강기능식품 소재를 개발 하고자 1)지방축적 억제 및 지방 배출/연소 촉진 물질, 2)장내 지방 흡수 억제 물질 그리고 3)식욕억제 물질 등을 천연물에서 도출하고 이들의 합제연구를 통해 효과적이고 안전한 소재를 개발하고자 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

<1차년도 : 전임상 후보 물질 도출>

- , 작용 기전 연구 : 3T3 L1 preadipocyte 및 캐너비노이드수용체 연구 등을 이용한 기전 연구
- , 유효 성분 에 대한 연구 : LC/MS 등을 이용한 유효성분 추적 연구
- , 표준 추출물 개발 : 생산 공정 개발 및 전임상 시험을 위한 표준 추출물의 개발
- , In vivo 효능 평가 : 후보물질에 대한 비만 질환동물에서의 효능 평가
- , 안전성 스크리닝 : 설치류 실험 동물을 이용한 후보물질의 안전성 스크리닝
- , 원물 소싱 : 후보물질에 대한 대량 생산 및 제품화를 위한 원물 소싱

<2차년도 : 전임상 연구>

- , 작용 기전 연구 : 3T3 L1 preadipocyte 및 캐너비노이드수용체 연구 등을 이용한 기전 연구
- , 안전성 시험 : 전임상 물질에 대한 안전성 자료 확보 및 장기 반복독성시험 개시
- , 생산 공정 개발 : 제품생산을 위한 대량 생산 공정 개발
- , 분석법 개발 : 제품의 표준화 및 품질관리를 위한 분석법 개발 및 확립
- , 안정성 시험 : 제품의 유통기한설정을 위한 가속 및 장기보존 시험
- , 원물 소싱 : 대량 생산 및 제품화를 위한 원물 소싱
- , 원물의 분광학적 패턴 연구 : LC/MS 등을 이용한 원물의 분광학적 패턴 연구

<3차년도 : 전임상 완료 및 임상 연구 수행>

- , 작용 기전 연구 : 3T3 L1 preadipocyte 및 캐너비노이드수용체 연구 등을 이용한 기전 연구
- , 장기 반복독성시험 완료 : 전임상 물질에 대한 안전성 자료 확보

- , 임상시험 준비 : 임상시험수행을 위한 protocol 작성 및 CRO 선정, 임상시험물질 생산
- , 임상 시험 수행 : IRB 통과 및 임상시험 수행
- , 인허가진행/마케팅 자료 : 식약청 건강기능식품 개별인정자료 준비, 기술마케팅 자료 작성(Techpack, Brochure, Presentation file 등) 진행
- , 시제품 제작 : 생산 scale 표준화 확립, 제형연구, 임상시험용 시제품 준비

IV. 연구개발결과

본 연구 개발 결과 복합기능을 가지는 천연물 유래 고기능성 건강기능식품 소재를 총 3종 (UP601, UP602 및 UP603)을 개발완료하고 시생산을 완료하였음. 또한, 현재 비만 소재를 요청한 주요 고객사인 Univera 및 Basic Research사의 요청으로 상업화를 위하여 UP601과 UP603에 대하여 미국 마이애미에서 12 주 이중맹검 임상시험을 진행 중에 있음.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구 개발 결과 2 건의 해외 특허 출원, 3 건의 논문을 국외에 게재하였으며 국내외 총 7 회 이상의 연구결과를 학회에서 발표하였음. 또한 본 연구 개발 결과 최종 건강기능식품 후보 소재로 개발된 UP601, UP602 및 UP603 에 대한 기술실시를 완료하여 상업화준비를 하고 있으며, 현재 진행 중인 임상시험에서 원하는 효능 결과 및 안전성 결과를 확보 한다면, 비만 소재를 요청한 주요 고객사인 미국의 Univera 및 Basic Research사에 판매가 가능하며, 유니젠의 원료를 구매하고 있는 Schiff, GNC 그리고 Bayer CHC등에서도 관심을 가지고 있는 바, 임상시험 결과를 바탕으로 공격적인 마케팅이 가능하여 시장 확대를 통한 매출 증대가 예상 됨.

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

The development of natural health food for controlling the body weight

II. Object and necessity of research

Nowadays, the anti-obesity drugs with single mechanism of action, such as rimonabant and sibutramine, have been withdrawn from the market because of their severe side effects. In order to develop functional food ingredients with multi mechanisms of action for weight control, Unigen discovered several final products by combination with each material 1) which can reduce lipid accumulation and induce lipid lypolysis, 2) which can inhibit intestinal lipid absorption and 3) which have appetite suppressing effect, from natural plants. These also are proved to show safety by several toxicity studies.

III. Contents and research Scope

<1st year : Selection of candidate materials for preclinical study>

- , Study for mechanism of action : Mechanism study using 3T3-L1 preadipocyte and Cannabinoid receptor evaluation systems.
- , Study for active ingredients : Determination of active ingredients using LC/MS
- , In vivo efficacy evaluation : Efficacy evaluation of candidate materials in high fat diet induced obese animal models
- , Safety screening : Safety screening of candidate materials using rodent animals.
- , Raw material sourcing : Raw material sourcing for pilot production and process development of pilot production.

<2nd year : Preclinical study>

- , Study for mechanism of action : Mechanism study using 3T3-L1 preadipocyte and Cannabinoid receptor evaluation system.
- , Safety study : Securing of safety data and starting long-term repeated oral toxicity studies with preclinical candidates.
- , Process development for pilot production
- , Development of analysis method : Development and validation of analysis method for standardization and quality control(QC).
- , Stability study : Accelerated and long-term storage tests for setting the shelf life of

product.

- , Raw material sourcing : Raw material sourcing for pilot production and process development for pilot production
- , Spectroscopic pattern study of raw materials by using LC/MS

<3rd year : Completion of preclinical trials and Performance of human clinical study>

- , Study for mechanism of action : Mechanism study using 3T3-L1 preadipocyte and cannabinoid receptor evaluation system.
- , Completion of long-term repeated oral toxicity studies : Securing the safety data of preclinical candidates
- , Preparation of human clinical study : Preparation of protocol and selection of CRO to perform the human clinical study. Production of clinical materials.
- , Performance of human clinical study : IRB approval and start the human clinical study.
- , Approval process and preparation of document for product launch: Document preparation for KFDA approval of health functional food or Document preparation for product launch (Techpack, Brochure, Presentation file, etc.).
- , Manufacturing materials in production scale : Process development and Establishment of standardization for production scale. Formulation study. Pilot production for clinical study.

IV. Research results

Three final products of functional food that showed the multi mechanism of action for weight control were developed and pilot production of those were completed. Unigen's major customers, Univera and Basic Research Co. which had interested in dietary supplement for weight management, requested human clinical trials of UP601 and UP603 for commercialization. Double-blind human clinical trials(12-week) with these materials are in progress in Miami, USA.

V. Achievement and the utilizing plan of the research

As results of this project, two patent applications(US and PCT) were completed. Three research papers were published in abroad and also the research data were presented at domestic and international symposiums more than 8 times. Unigen has completed the development of three final products, UP601, UP602 and UP603, as final products for functional food in this project and has been preparing the commercialization for product launch. After completion of human clinical study which is ongoing, it will be possible to sell final products to Unigen's major customers, Univera, Basic Research Co. and etc.

which have plans to launch the weight management products. Also, an increase in revenue is expected through the market extension with aggressive marketing strategies based on the clinical outcomes, considering Schiff, GNC and Bayer CHC Co., which are the global sales network of Unigen and have been showing interests on Unigen's new weight control products.

CONTENTS

(영 문 목 차)

SUMMARY (Korean)	3
SUMMARY (English)	5
CONTENTS (English)	8
Contents (Korean)	11
Chapter 1. Summary of the research project	14
Paragraph 1. Objective of research	14
Paragraph 2. Necessity of research	14
Paragraph 3. Research goal and range by year	17
Chapter 2. Current status of the technology concerned in domestic and abroad research	20
Paragraph 1. Current status of health functional food in domestic research	20
Paragraph 2. Current status of market and technology in abroad research	21
Chapter 3. Contents and results of the research	24
Paragraph 1. Development of materials for functional food - Primary screening	24
1. Materials and methods	24
A. Pancreatic lipase inhibitor screening	25
B. 3T3-L1 adipocyte differentiation	25
C. Lipid accumulation test	25
D. CB1 receptor screening	26
E. In vivo screening at DIO mice	27
2. Results and Discussion	27
A. Pancreatic lipase inhibitor screening	27
B. Screening of inhibition effects on differentiation and lipid accumulation	28
C. CB1 receptor screening	31
D. In vivo screening at DIO mice	35
Paragraph 2. Development of materials for functional food - In vitro study	38
1. Materials and methods	38
A. Cytotoxicity	38
B. DPPH free radical scavenging activity	38
C. Inhibitory effect on forskolin-induced cAMP production	39
D. 3T3-L1 adipocyte differentiation	39
E. Lipid accumulation test	39

F. Intracellular triglyceride contents	39
G. Lipolysis assay	40
2. Results and Discussion	40
A. Cytotoxicity	40
B. Inhibition effects of candidate materials on differentiation and lipid accumulation ...	40
C. Inhibition effects of preclinical materials on differentiation and lipid accumulation ..	42
D. In vitro study for clinical materials	42
Paragraph 3. Development of material for functional food - In vivo study	47
1. Efficacy evaluation in Diet-induced obese model (DIO model)	47
A. Materials and methods	47
B. Results and discussions	49
2. Acute feed intake test using SD rat model	91
A. Materials and methods	91
B. Results and discussions	91
Paragraph 4. Development of material for functional food - Safety study	101
1. Materials and methods	101
A. Toxicity screening test using mice	101
B. Single dose toxicity test in rats	101
C. 14 days repeated oral dose toxicity test in rats	101
D. 28 days repeated oral dose toxicity test in rats	102
E. 90 days repeated oral dose toxicity test in rats	102
2. Results and discussions	102
A. Toxicity screening test using mice	102
B. Single dose toxicity test in rats	102
C. 14 days repeated oral dose toxicity test in rats	102
D. 28 days repeated oral dose toxicity test in rats	103
E. 90 days repeated oral dose toxicity test in rats	103
Paragraph 5. Development of material for functional food - Clinical study	104
1. Materials and methods	104
A. Selection of CRO : Aspireirb	104
B. Summary of clinical study	104
2. Results and discussions	108
Paragraph 6. Development of material for functional food - Product development study	115
1. Analysis of active ingredients in preclinical candidate materials	115
A. Materials and methods	115
B. Results and discussions	115

2. Development of analysis method for QC of standard extract for preclinical and clinical materials	120
A. Materials and methods	120
B. Results and discussions	121
3. Study of product development for preclinical and clinical materials	141
A. Materials and methods	141
B. Results and discussions	142
4. Stability test of final materials	152
A. Materials and methods	152
B. Results and discussions	153
5. Raw material sourcing for preclinical and clinical materials	156
A. Materials and methods	156
B. Results and discussions	156
 Chapter 4. Achievement of the research and its contribution	 171
 Chapter 5. The utilizing plan of the research	 174
 Chapter 6. Technology information got from abroad for the research	 177
 Chapter 7. References	 185

목 차

요 약 문	3
SUMMARY	5
CONTENTS (영어 목차)	8
목 차	11
제 1 장 연구개발과제의 개요	14
제 1 절 연구개발의 목적	14
제 2 절 연구개발의 필요성	14
제 3 절 연차별 연구 개발 범위	17
제 2 장 국내외 기술개발 현황	20
제 1 절 국내 건강기능식품 동향	20
제 2 절 세계시장 및 기술 동향	21
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	24
제 1 절 기능식품 소재 개발 - Primary screening	24
1. 재료 및 방법	24
가. Lipase 활성 저해 스크리닝	25
나. 3T3-L1 preadipocyte의 분화 유도	25
다. Lipid accumulation 측정	25
라. CB1 수용체를 이용한 스크리닝	26
마. DIO mice를 이용한 in vivo 스크리닝	27
2. 결과 및 고찰	27
가. Lipase 활성 저해 스크리닝	27
나. 후보소재의 지방 분화 및 지방 축적 억제능 평가	28
다. CB1 수용체를 이용한 스크리닝	31
라. DIO mice를 이용한 효능 스크리닝	35
제 2 절 기능식품 소재 개발 - In vitro 연구	38
1. 재료 및 방법	38
가. 세포독성 시험	38
나. DPPH 라디칼 소거능	38
다. Forskolin-유도 cAMP 생성에 미치는 억제효과 규명	39
라. 3T3-L1 preadipocyte의 분화 유도	39
마. Lipid accumulation 측정	39
바. Intracellular Triglyceride 함량 측정	39

가. Lipolysis 유도 효과 측정	40
2. 결과 및 고찰	40
가. 세포독성 시험	40
나. 전임상 후보 물질의 지방 분화 및 지방 축적 억제능 시험	40
다. 전임상 물질의 지방분화 및 지방 축적 억제능 시험	42
라. 임상시험 물질의 in vitro 기전연구	42
제 3 절 기능식품 소재개발 - In vivo 연구	47
1. DIO 모델에서의 효능 연구	47
가. 재료 및 방법	47
나. 결과 및 고찰	49
2. SD rat 을 이용한 Acute feed intake 시험	91
가. 재료 및 방법	91
나. 결과 및 고찰	91
제 4 절 기능식품 소재 개발 - 안전성 연구	101
1. 재료 및 방법	101
가. 마우스를 이용한 독성 스크리닝 실험	101
나. 랫드를 이용한 단회 독성 시험	101
다. 랫드를 이용한 14일 반복 경구 독성 시험	101
라. 랫드를 이용한 28일 반복 경구 독성 시험	102
마. 랫드를 이용한 GLP 90일 반복독성시험	102
2. 결과 및 고찰	102
가. 마우스를 이용한 독성 스크리닝 실험	102
나. 랫드를 이용한 단회 독성 시험	102
다. 랫드를 이용한 14일 반복 경구 독성 시험	102
라. 랫드를 이용한 28일 반복 경구 독성 시험	103
마. 랫드를 이용한 GLP 90일 반복독성시험	103
제 5 절 기능식품 소재 개발 - 임상시험	104
1. 재료 및 방법	104
가. CRO 선정 : Aspireirb	104
나. 임상시험 개요	104
2. 결과 및 고찰	108
제 6 절 기능식품 소재 개발 - 소재의 제품화에 관한 연구	115
1. 전임상 후보 물질에 대한 유효성분 분석	115
가. 재료 및 방법	115
나. 결과 및 고찰	115
2. 전임상 및 임상시험 소재에 대한 표준추출물 및 품질관리를 위한 분석법 개발	120

가. 재료 및 방법	120
나. 결과 및 고찰	121
3. 전임상 및 임상시험 물질의 제품화 연구	141
가. 재료 및 방법	141
나. 결과 및 고찰	142
4. 최종 생산 물질의 안정성 시험	152
가. 재료 및 방법	152
나. 결과 및 고찰	153
5. 전임상 및 임상시험 물질의 원물 소싱	156
가. 재료 및 방법	156
나. 결과 및 고찰	156
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	171
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	174
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	177
제 7 장 참고문헌	185

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 과제는 현재 전세계적으로 심각한 보건 문제를 야기하고 있는 비만을 개선하기 위한 인체에 안전하면서 효능을 나타내는 건강기능식품 소재를 개발하는 것을 목적으로 함. 2009년과 2012년 비만치료제로 사용되던 리모나반트 및 시부트라민이 안전성을 문제로 시장에서 퇴출당한 이후 비만관련 치료제 시장은 위축되었으나, 인체에 안전한 것으로 알려져 있는 각종 천연물을 이용한 소재 개발 연구가 각광을 받고 그와 관련된 시장이 매년 성장세에 있음. 이에 따라 본 연구에서는 복합기전을 가지는 기능식품 소재개발을 위하여 1)지방축적 억제 및 지방배출/연소 촉진 물질, 2)장내 지방 흡수 억제 물질 그리고 3)식욕억제 물질 등을 천연물에서 도출하고 이들의 합제연구를 통해 효과적이고 안전한 소재를 개발하고자 함.

본 연구과제에서는 천연물소재 유래의 건강기능식품 개발 연구를 추진하는데 있어서 작용기전 및 전임상, 임상연구를 바탕으로 안전하고 과학적 근거에 기반을 둔 제품을 생산하고자 하며, 제품생산에 있어서 국내 자생식물 활용 및 소재의 작물화를 통하여 국내 농가의 소득증대 및 이에 따른 고부가가치 창출을 유도하고자 함과 동시에 국내외에 위치하고 있는 본사의 지사 및 유통망을 통하여 국내 및 국외에 판매하고자 함.

제 2 절 연구개발의 필요성

현대인의 식단이 과거에 비해 고열량식의 양상을 띠게 되고 운동량은 상대적으로 감소됨에 따라 전 세계적으로 비만 인구는 증가하는 추세임. 한국을 비롯한 아시아권 국가들의 경우에는 미국을 비롯한 서방 국가들에 비해서는 비만 인구가 상대적으로 적고 비만 인구 증가율도 다소 낮기는 하지만, 하기 OECD 보고서에서 발표한 비만 인구 추이 그래프를 참조하면 아시아권 국가들 역시 비만 인구가 증가하는 추세를 확인할 수 있음.

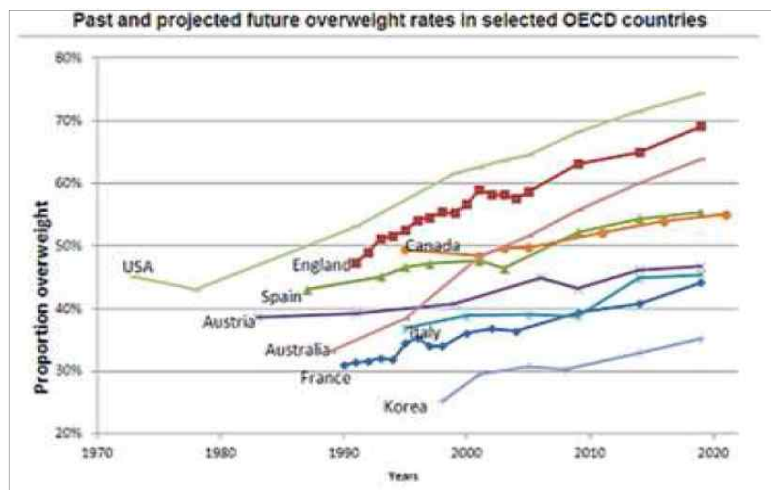


Figure 1-1. Increase of obese population (Projection, ODCE report)

전 세계적으로 비만인구가 증가하고 있고 2000년도에 이르러 세계국제 보건 기구(WHO) 는 이미 비만은 비전염성 질병으로 규정하고 전 세계적으로 이에 대한 위험성을 경고하고 이에 대항하는 수많은 캠페인 등을 벌여오고 있음. 또한 최근 영국왕립의학회는 비만을 낮추기 위해 설탕이 들어간 음료수 가격을 인상하는 정책안을 제시함. 이와 더불어 영국 의사 22만 명이 비만퇴치 10개안을 발표하는 등 비만에 대항하는 움직임이 적극적으로 나타나고 있음. 이에 지난 6월 미국 의사협회(AMA) 연례 대표자 회의에서 비만을 질병으로 인정하였음

우리나라의 경우 체질량 지수가 $25\text{kg}/\text{m}^2$ 이상의 비만 인구율이 2010년 OECD 회원국의 과체중과 비만인구 비율 56.7%의 절반 수준이기는 하지만 1995년 국민 건강 영양조사 당시 13.9%였던 것이 2010년 30.2%로 매우 빠른 속도로 급증하고 있는 실정임.

비만은 다양한 질병, 특히 관상동맥질환, 고혈압, 제2형 당뇨병, 수면무호흡증, 대장암, 유방암, 난소암등의 질환과 골관절염등과 같은 다양한 질환의 발생빈도가 증가한다고 알려져 있음 (Haslam DW, James WP (2005). "Obesity". Lancet 366 (9492): 1197-209. doi:10.1016/S0140-6736(05)67483-1). 이러한 다양한 질환과 관련이 있는 비만으로 인한 질병발생은 국민의료비지출의 상승을 야기 시킴. 2007년 1인당 건강보험 부담액이45만 6천원에서 2011년에는 67만원으로 약 47% 증가하였음. 또한 요양급여액을 보면 1인당 50만 2천원을 지출 하던 2007년에 비해 2011년에는 70만 4천원으로 약 40%정도 증가하게 나타났음 (2012년 보건 복지통계연보).

비만과 관련한 건강보조식품의 시장규모는 '2008년 Nutritional Business journal (NBJ supplement report, 2008)' 에 따르면 스포츠/에너지/체중저하와 관련된 dietary supplement 시장은 2007년 대비 6% 성장률을 기록한 70억달러 (\$7.0 billion US dollar)를 기록했으며, 2010년에는 \$22.7 billion dollar를 기록해 3배 이상의 증가율을 나타내었다. 그중 7%에 해당하는 \$1.58 billion dollar가 체중저하와 관련된 제품의 판매액을 기록하였음.

'2012년 국내 건강기능식품 생산실적 분석결과 보고서' 를 보면, 지난해 가장 높은 성장세를 보인 제품은 체지방 감소제품으로 2011년 78억에서 올해 235억원으로 201.2% 성장세를 나타내었음.

의약품시장의 주요 브랜드로서는 Xenical (Orlistat, Hoffman), Alli (orlistat, Galxosmithkine), Reductil (Sibutramine, Abbott), Sanorex (mazindol, Sandoz) 그리고 Acomplia (rimonabant, Sanofi-Aventis)가 있으며 이들이 차지하고 있는 시장규모는 2008년 5억 1370만 달러를 기록하였음. 그러나 2009년 안전성 문제로 Acomplia 가 EMEA(European Medicines Agency)에서 판매금지 처분된 이후 2012년 리덕틸이 심혈관계 부작용을 이후로 시장에서 물러나면서 비만 관련 치료제 시장에서는 상업성과 더불어 안전성 문제가 크게 대두됨. 현재 비만치료제로서는 Orlistat 만이 상업성과 동시에 안전성을 확보하고 있는 상황임.

2013년 FDA에서 승인된 비만치료제인 Qsymia (phentermine/topiramate) 와 Locaserin 의 경우도 그 승인과정에서 심혈관 관련 부작용 등에 관하여 대규모 시판 후 연구 결과를 요청 받

있었음. 향후 시장의 판도는 급변할 것으로 예상되는 바 이에 따른 신제품에 대한 효능 및 안전성에 대한 요구가 급증할 것으로 보임.

제 3 절 연차별 연구 개발 범위

연구 범위	연구수행방법	구체적인 내용
전임상 예상 후보물질에 대한 in vitro 기전연구	캐너비노이드수용체를 이용한 기전연구	-, 세포주를 이용한 CB-1 발현모델을 확립. -, 세포주를 이용한 CRE Luc activity 발현모델 확립. -, cAMP 생성 억제에 대한 길항여부 확인. -, CRE Luc activity에 대한 길항여부 확인.
	3T3-L1 preadipocyte를 이용한 연구	-, 3T3-L1 preadipocyte를 이용한 지방세포 분화 및 지방축적모델을 확립함. -, 3T3 L1 preadipocyte를 이용하여 후보소재의 viability 및 세포독성을 확인함. -, 3T3 L1 predi adipocyte을 분화 유도 시 후보소재에 의한 지방세포 분화 및 지방 축적정도를 측정함.
1차년도 전임상 예상 후보물질에 대한 In vivo 효능 평가	DIO mice 를 이용한 효능평가	-, 60% 고지방 식이로 유도된 비만모델 동물에 후보물질을 경구 투여하여 체중조절효과 및 그와 관련된 biomarker를 확인.
	DIO rat을 이용한 효능 평가	-, 45% 고지방 식이로 유도된 비만 rat 에 후보물질을 투여하여 효능을 평가.
	In 랫드를 이용한 독성 스크리닝	-, 암-수 랫드를 이용하여 시험물질을 단회 투여하고, 투여 후 14 일 동안 일반증상, 체중 변화, 부검 시 육안소견을 관찰하여 개략의 치사량을 구하기 위해 실시함. 이 실험에서의 투여용량은 실험동물에게 가능한 최대용량을 투여함.
	마우스를 이용한 독성 스크리닝	-, 후보물질을 실험동물에 투여하는 전 기간 동안 임상증상을 관찰하고 투여 종료 후 혈액에서 독성관련 지표를 관찰함으로써 안전성 스크리닝을 수행함.
전임상 예상 후보물질에 대한 유효성 분석 및 제품화를 위한 연구	LC/MS를 활용한 유효성분에 대한 연구	-, LC/MS를 활용하여 화합물의 분자량을 확인하고 화학적 구조를 동정하여 후보물질의 유효성분에 대한 연구진행.
	표준추출물 공정 개발	-, 지표 성분 및 추출물의 이화학적 성질을 바탕으로 Lab-scale 의 표준 추출물 공정을 개발.
	후보소재의 제품화를 위한 원물 확보	-, 상업화 진행시 경제적이고 안정적인 원물 공급을 위하여 계절별 지역별로 원물소싱을 진행하여 제품화를 위한 원물 선정을 실시함.

	연구 범위	연구수행방법	구체적인 내용
2 차 년 도	전임상 후보물질에 대한 in vitro 기전연구	캐너비노이드수용체를 이용한 기전연구	<ul style="list-style-type: none"> - , 전임상 소재의 cAMP 생성 억제에 대한 길항정도를 측정함. - , 전임상 소재의 CRE Luc activity에 대한 길항정도를 측정함. - , CB1 수용체 활성화에 의한 Ca²⁺ signaling 억제작용에 대한 길항작용을 측정함.
		3T3 L1 preadipocyte를 이용한 연구	- , 3T3 L1 preadipocyte 분화 유도 시 전임상 후보물질에 의한 지방세포 분화 및 지방 축적정도를 측정함.
	전임상 후보물질에 대한 in vivo 효능 평가	DIO mice를 이용한 임상시험자료 확보를 위한 in vivo 효능 확인 평가	- , 60% 고지방 식이로 유도된 비만모델 동물에 전임상 후보물질을 경구 투여하여 체중조절효과 및 그와 관련된 biomarker를 확인함.
		DIO rat을 이용한 임상시험자료 확보를 위한 in vivo 효능 확인 평가	- , 45% 고지방 식이로 유도된 비만 rat 에 후보물질을 투여하여 효능을 평가함.
		임상시험자료 확보를 위한 안전성 시험	<ul style="list-style-type: none"> - , 14일 반복 독성 시험. - , 28일 반복 독성 시험.
	전임상 후보물질에 대한 유효성분 분석 및 제품화를 위한 연구	대량생산 및 제품화를 위한 생산 공정 개발	- , 확립된 표준 추출물 제조법을 바탕으로 대량 생산 및 제품화를 위한 생산 공정을 개발.
		표준 추출물 및 품질 관리를 위한 분석법 개발	- , 표준 추출물 및 품질 관리를 위한 분석법을 개발하고 확립함.
		소재의 장기보관 및 가속조건에서 안정성 시험	- , 최종 제품의 저장방법 및 사용기간을 설정하기 위한 안정성시험 진행 중 .
		원물 소싱	- , 대량생산 및 제품화를 위한 원활한 원물 소싱.
	원물의 분광학적 패턴 연구	- , 전임상 물질의 유효 및 지표 성분에 대한 분광학적 연구를 수행함.	

연구 범위	연구수행방법	구체적인 내용	
3차년도	임상시험 진행	CRO 선정 <ul style="list-style-type: none"> -, 전문 CRO 를 선정하여 원활함 임상시험이 진행될 수 있도록 함. 	
	임상 시험 프로토콜 작성 및 임상시험 진행	<ul style="list-style-type: none"> -, 임상시험 프로토콜을 작성하여 임상시험 목표 및 측정할 biomarker 등에 대한 기준을 명확히 함. -, 임상시험을 위하여 IRB 에 시험계획서를 제출. -, 임상시험 사이트에서 시험대상자를 모집하여 임상시험을 진행. 	
	임상 시험 물질의 기전 연구 및 효능 확인, in vivo 효능 평가	임상시험자료 확보를 위한 in vivo 효능 확인 평가	-, 60% 고지방 식이로 유도된 비만모델 동물에 임상 시험물질을 경구 투여하여 체중조절효과 및 관련된 biomarker를 확인함.
		임상시험자료 확보를 위한 안전성 시험	-, 임상 시료 물질에 대한 안전성 시험.
	제품화 연구	소재의 장기보관 및 가속조건에서 안정성 시험	-, 최종 제품의 저장방법 및 사용기간을 설정하기 위한 안정성시험 결과 확보.
		원물소싱	-, 대량생산 및 제품화를 위한 원활한 원물 확보 및 2차 원물 수집지 확보.
		표준 추출물 및 품질 관리를 위한 분석법 개발	<ul style="list-style-type: none"> -, 개발된 분석법을 사용한 임상 시료 분석 실시 -, 생산 및 QC에 적합한 분석법 확정.
		상업화 연구	<ul style="list-style-type: none"> -, 시제품 제작. -, 마케팅을 위한 techpack 등 마케팅 자료 준비 중.
	임상시시험 물질에 대한 in vitro 연구	CB1 & CB2 signaling 특성분석, in vivo 연구	-, 임상 소재의 cAMP 생성 억제에 대한 길항정도를 측정함.
		3T3 L1 preadipocyte 를 이용한 in vitro 연구	<ul style="list-style-type: none"> -, 임상시험 물질의 지방 분화 및 축적 억제능 시험. -, 임상 시험 물질에 대한 in vitro 기전 연구.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 건강기능식품 동향

2012년도 건강기능식품 생산실적은 전년대비 3% 증가에 그쳤지만 개별인정형 건강기능식품은 성장세를 이어가고 있는 것으로 나타남. 이중 탄수화물이 지방으로 합성되는 것을 억제하여 체지방 감소에 도움을 주는 가르시니아캄보지아 추출물 제품이 전년대비 112.56% 로 가장 급격한 성장세를 보였음.

Table 2-1. Production records of health functional food ingredients (top 10 ranks) (2012. 12. 31, KFDA).

순위	구분	총 생산액					기능성 내용
		2008	2009	2010	2011	2012	
	총생산액(억원)	416	800	1,129	1,435	1,807	
1	헛개나무과병추출분말		145	441	349	502	간건강
2	당귀혼합추출물	22	62	87	140	245	면역기능
3	그린마테추출물		-	6	4	147	체지방감소
4	밀크씨슬추출물			50	138	135	간건강
5	복분자추출분말				31	104	간건강
6	백수오 등 복합추출물			14	40	100	갱년기 여성건강
7	대두배아열수추출물등 복합물	-	-			61	체지방감소
8	히알우론산나트륨	-	3	11	71	41	피부건강
9	AP 콜라겐 효소분해 펩타이드			5	20	29	피부건강
10	초록입홍합추출오일 복합물		36	32	29	28	관절건강
	소계	22	210	614	793	1,364	

상위 5위 제품군 중 지난해 가장 높은 성장세를 보인 제품은 체지방 감소 제품으로 201.2%(78→235억원)이었으며 기능성별로는 간건강, 면역기능 다음으로 체지방 감소 13% 제품이 차지하였고 이는 건강과 몸매 관리를 중시하는 사회적 환경 때문인 것으로 풀이됨.

또한 한국한의학연구원(원장 최승훈) 김진숙 박사팀은 마디풀과(科)에 속하는 다년생 한약재에서 추출한 한약기반 치료물질(물질명: POCUb)을 개발하고 해외 7개국에 특허 출원, 국내 기업에 기술이전하는 성과를 올리는 등 현재 전 세계적으로 비만치료제 시장에서 탁월한 효과를 가진 약이 없고 기존의 비만치료제는 복용에 따른 자살, 우울증 등 심각한 부작용이 확인되어 시장에서 철수하는 상황에서 효능이 우수하고 부작용이 적은 천연 비만치

료(예방)제 후보를 도출한 것으로 국민 보건 향상에 크게 기여하는 등의 천연물을 기반으로 한 비만치료 시장에 제약사 및 연구 기관의 관심이 높음.

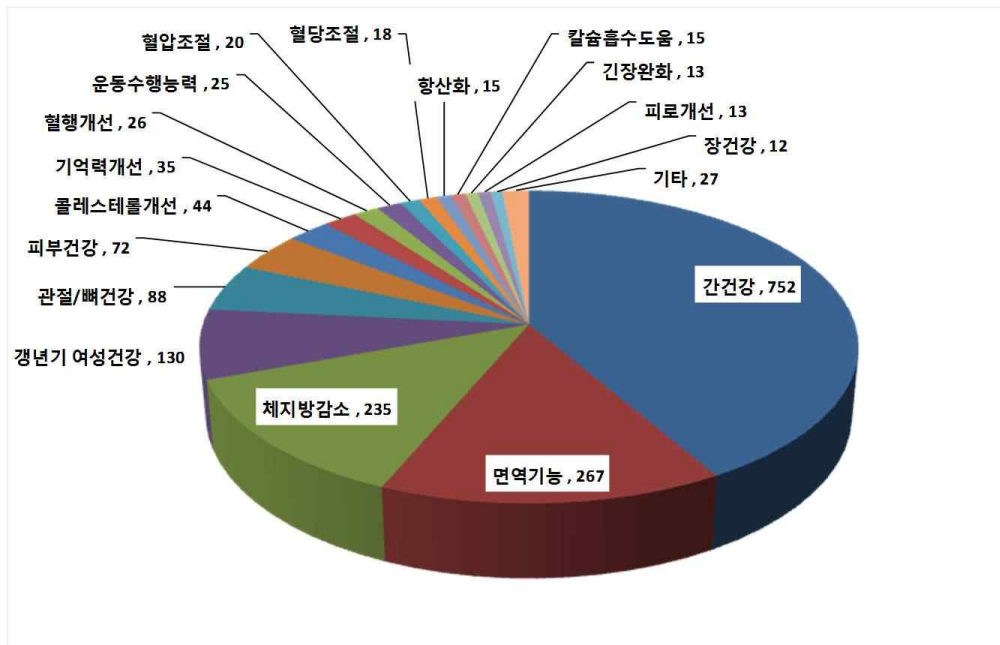


Figure 2-1. Production records of health functional food (functionality category) ('12 years /hundred million won) (2012. 12. 31, KFDA).

제 2 절 . 세계시장 및 기술 동향

호프만 사의 비만치료제인 제니칼은, 1999년 FDA의 안전성 승인을 받았으며 2001년부터 국내 시판이 시작된 리파아제 억제제 계열의 비만치료제임. 제니칼의 경우에는 지방 분해효소인 리파아제의 작용을 억제하여 지방이 소화흡수 되는 것을 방지하고 대변으로 배출되도록 유도함. 시부트라민 계 식욕억제제의 경우에는 우울증 등의 부작용이 심각하여 최근 FDA로부터 판매 승인이 취소된 반면, 올리스타트 계 지방 분해 억제제인 제니칼의 경우에는 지방변 등의 부작용이 다소 발생되기는 하나 심각한 수준은 아니어서 현재에도 FDA 안전성 승인이 유지되어 있는 상태임. 이로써, 현재로서는 제니칼이 FDA에 의해 안전성을 승인받은 유일한 비만치료제라 할 수 있음

특히, 제니칼과 동일한 성분의 1/2 용량 제품인 알리(ALLI)의 경우에는 비만치료제 중 최초로 OTC(일반의약품) 전환에 대하여 FDA 승인을 받아, 의사의 처방 없이도 자유 구매가 가능하게 되었을 정도로 안전성에 대하여 높은 신뢰를 받고 있음.

Table 2-2. Classification standard of obesity treatment technique.

대분류	중분류	소분류	검색개요 (기술범위)
비만치료기술	비만 관련 바이오마커 발굴 기술	유전체학 (genomics)	비만, 바이오마커, 게놈, DNA, RNA, 유전자, SNP, 유전체학, 코딩, 논코딩, 발현, 마이크로어레이, 시퀀싱
		포스트-유전체학 (post-genomics)	비만, 바이오마커, 포스트-유전체학, 단백질체학, 대사체학, 생명정보학, 펩티드, 단백질, 후성학, 메틸레이션, 아세틸레이션, 히스톤, 시크리토믹스, 세포간 상호작용
	비만 예방·관리 기술	예방·관리 대상자	비만, 예방, 방지, 관리, 유아, 청소년, 성인, 노인, 남성, 여성, 당뇨병, 고지혈증, 고콜레스테롤, 대사질환자
		예방·관리 전략	비만, 예방, 방지, 관리, 식습관, 운동, 약물치료, 세포치료, 수술, 위절제, 다이어트, 프로그램, 전략
	비만의 약물 치료 기술	식욕 억제제	비만, 약물치료, 약물병합, 식욕억제, 아드레날린, 노르아드레날린, 세로토닌, 도파민, 히스타민, 부프로프리온
		대사 촉진제	비만, 약물치료, 대사촉진, 에페드린, 카페인, 베타3-아드레노수용체, UCP-2, UCP-3
		소화 억제제	비만, 약물치료, 소화억제, GI펩타이드, 지방흡수억제, 소화효제억제, 리파아제억제, 인산화억제
		호르몬 조절제	비만, 약물치료, 호르몬조절, 뉴로펩타이드, 렙틴, 인슐린, 성호르몬, 안드로겐, 에스트로겐, 수용체
		천연 물질	비만, 약물치료, 천연물질, 칸나비노이드, 마리화나, 생약, 허브, 한약, 전통의학, 약초, 추출물
		기타 약물 치료	비만, 약물치료, 운동모사, 세포분화조절, 약물병합, 약물방출조절, 공동치료
	비만의 세포 치료 기술	지방 세포	비만, 세포치료, 지방세포, 갈색지방, 백색지방, 제거, 이식, 분화조절, 전환
		면역 세포	비만, 세포치료, 면역세포, 좋은 면역세포, 나쁜 면역세포, 제거, 이식, 분화조절, 전환

특허청 비만 치료 기술 특허기술동향조사 보고서 2011. 12

보건복지부 비만치료 특허기술동향조사 보고서에 따르면 특허 출원 및 논문 발표가 활성화된 시기는 1990년대 중반 이후이고 2000년대에 특히 활발한 논문 발표가 수행되었으며 1996년 WHO에서 비만을 질병의 일종으로 규정하고 이의 위험성에 대한 촉구하는 한편 이에 대한 R&D 촉구를 전 세계적으로 시작한 것의 영향력도 상당하였을 것으로 판단됨.

특허 출원은 다국적 제약회사들이 주도적으로 수행하는 만큼 현재 상업적가치가 높은 비만의 약물 치료기술에 집중적인 출원이 이루어진 반면, 논문 발표는 미국 소재의 의과대학들이 주도적으로 수행하는 만큼 향후 전망이 밝은 비만의 바이오마커 및 비만의 세포 치료 기술에 집중적인연구가 이루어졌음을 확인할 수 있었음.

또한, 본 자료를 바탕으로 IP R&D의 방향성을 정할 때 이미 선행 기술이 다수 존재하는 비만의 약물 치료 기술에만 치중할 것이 아니라 비만의 바이오마커에 관한 연구 또는 세포 치료 기술에도 투자를 할 경우 향후 원천특허 확보가 가능할 것이라는 결론을 도출함. 예를 들어, 단기적인 상업적 성공을 목적으로 삼을 경우 비만의 약물 치료에 집중 투자하는 것이 바람직할 것이며, 특히 비만의 약물 치료 기술 중에서도 천연물을 이용하는 경우에는 한약재 연구가 해외 각국에 비해 앞서있는 우리나라에서 연구하기에 적합하다는 결론을 내릴 수 있음.

전 세계적으로 비만 인구는 증가하는 추세이며, 이에 따라 이미 최소 1000 억 원 규모에 이르는 비만치료기술의 시장 규모도 지속적으로 확대되는 양상을 보임. 그러나, 현재 시판 중인 비만 치료제들에 대해서는 안전성 논란이 끊임없이 제기되고 있는 실정이며, 현재 안전성이 승인된 비만치료제는 제니칼이 유일함.

이와 같은 상황에 비추어 볼 때, 약물 비만치료제를 비롯한 비만치료기술에 대한 R&D 필요성이 높은 것으로 판단되며, 특허 및 논문 분석 등을 통하여 방향성을 설정한 뒤 유망 분야에 대한 집중적인 R&D가 이루어질 경우 기술분야에서의 국가경쟁력을 높이는 한편 시장의 우위를 점할 수 있을 것으로 예상됨.

또한 국내외의 시장에서의 요구는 날로 높아지고 있으나 안전성이 확립된 효과적인 제품은 아직 출시되지 않은 상황임.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

본 연구에서는 비만 개선/치료 작용기전으로써 1)지방축적 억제 및 지방 배출/연소 촉진, 2)장내 지방 흡수 억제 그리고 3)식욕억제를 대표적인 작용기전으로 선정하고 각 작용기전에 따른 후보물질을 도출하여 복합기전을 가진 소재를 개발하고자 함.

본 과제외 연구개발 수행은 in vitro 효능 및 기전 연구, in vivo에서 마우스 및 랫드를 이용한 효능, 기전 및 안전성에 관한 연구 그리고 각 연구 결과 도출된 후보소재에 관하여 원물 소싱 및 물질에 관한 연구 등으로 전임상 연구를 수행하였음.

전임상 연구결과 도출한 최종 물질에 대한 임상시험을 실시하여 최종 제품개발에 활용하고자 함.

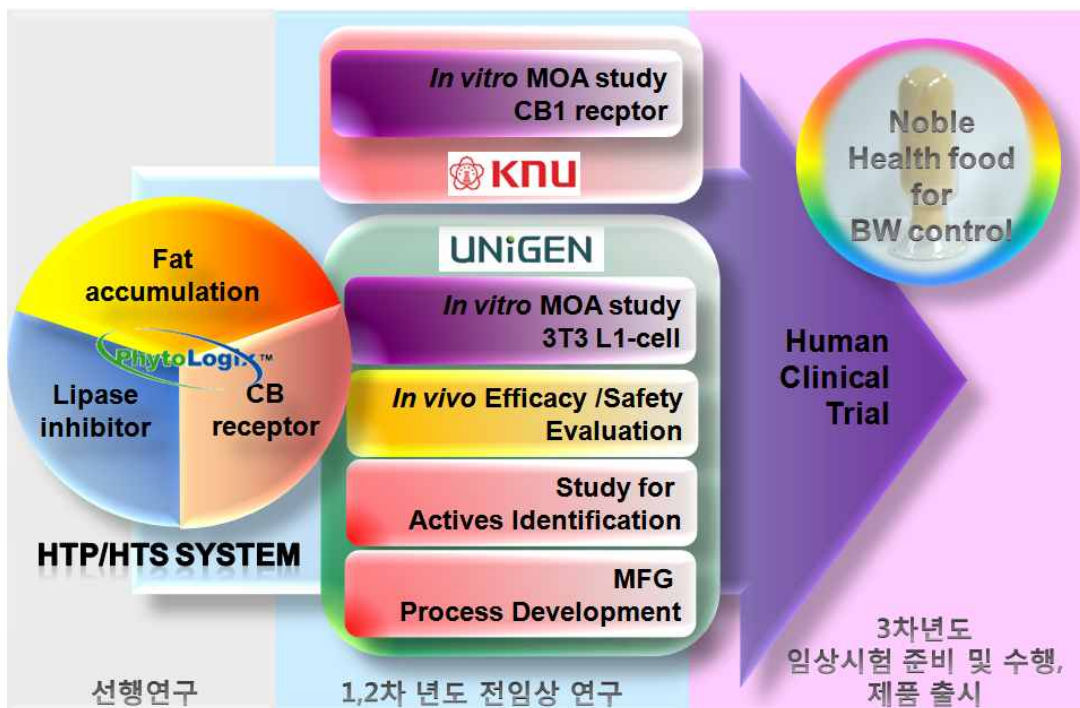


Figure 3-1. Flow chart of development process.

제 1 절 기능식품 소재 개발 - Primary screening

본 연구과제에서는 비만 개선/치료 작용기전으로써 1)지방축적 억제 및 지방 배출/연소 촉진, 2)장내 지방 흡수 억제 그리고 3)식욕억제를 대표적인 작용기전으로 선정하고 각 작용기전에 따른 후보물질을 도출하여 복합기전을 가진 소재를 개발하고자 함. 이에 각각의 작용기전에 따른 스크리닝법을 선정하고 그에 따른 후보물질 도출을 위한 연구를 수행하였음.

1. 재료 및 방법

가. Lipase 활성 저해 스크리닝

Pancreatic lipase의 활성 및 저해능은 triolein으로부터 분리되는 oleic acid를 측정함으로써 결정하였음. 0.1 M NaCl이 첨가된 0.1 M N-tris (hydroxymethyl) methyl -2 - aminoethanesulfonic acid (pH 7.0) 9 ml에, 90 μ mol triolein, 45 mg gum arabic과 9.45 μ mol taurocholic acid를 넣고 초음파로 5분 동안 처리하여 제조한 기질 180 μ l 에 human pancreatic lipase, 1500 U/ml, 15 μ l, 시험물질 5 μ l, 등을 혼합하여 최종반응용액의 부피를 200 μ l되도록 제조하였음. pH 7.0, 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 2%(v/v) methanol이 포함된 chloroform/heptane(1:1) 용액 3 ml을 첨가하여 10분 동안 교반한 후, 원심분리(2,000×g, 10min)하여 수층을 제거하였음. 여기에 copper 반응액 1ml을 첨가하여 다시 10분 동안 교반한 후, 원심분리 하여 추출된 oleic acid와 copper salt가 포함된 유기용매층 1 ml을 취하여 0.05%(w/v) 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole 이포함된 0.1%(w/v) bathocuprione 용액 1 ml을 첨가한 후, 480 nm에서 흡광도를 측정하여 oleic acid를 정량함으로써 효소활성을 측정하였음.

Tannin index 는 Minikit 을 이용하여 제조사에서 제공한 방법으로 측정하였음.

나. 3T3-L1 preadipocyte의 분화 유도

3T3-L1 preadipocyte는 10% bovine calf serum(BCS)와 antibiotics(penicillin 100 units/ml, streptomycin 100 units/ml)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)을 이용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였음. 분화는 24 well plate 혹은 6 well plate 에 세포를 배양 후, 100% confluent하게 되면 2일간 더 배양한 다음(day 0), MDI(0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx), 1 μ M Dexamethasone, 5 μ g/ml insulin)를 포함한 10% fetal bovine serum(FBS)첨가 DMEM배지로 교체하여 유도하고, 2일 후(day 2) 5 μ g/ml insulin이 함유된 10% FBS DMEM으로 2일간 배양하였음. 그 후 지방세포의 완전 분화를 위해 2일에 한번씩(day 4, 6) 10% FBS가 첨가 된 DMEM으로 교체하면서 4일간 더 배양하여 분화 하였고, 전임상시험 물질의 처리는 각 실험의 목적에 맞게, 분화가 유도되는 동안(day 0, 2, 4, 6) 실시하거나, 혹은 분화가 종료되는 시점(day 8)에 실시하였음.

다. Lipid accumulation 측정

3T3-L1 preadipocyte를 24-well plate에 5x10⁴ cells/well로 seeding하여 배양 후 분화하였고, 전임상시험물질은 분화가 유도되는 동안(day 0, 2, 4, 6)에 처리하였음. 분화가 완전히 이루어진 시점에(day 8) 모든 plate의 배지를 제거하고, 3.7 % formaldehyde를 500 μ l 처리하여 실온에서 1시간 동안 고정 하였음. Formaldehyde를 완전히 제거한 다음, 차가운 증류수로 3회 세척 하고, Oil red O working solution으로 10분간 염색하였음. 이 때 사용된 Oil red O working solution은 Oil red O powder 2 g를 100 ml isopropanol에 녹인 뒤, 증류수에 6:4의 비율로 희석한 다음, 여과 하여 사용하였음. 세포를 염색한 다음 Oil red O working solution을 완전히 제거하고 차가운 증류수로 3회 세척 하여 물기를 완전히 제거한 다음, 100% isopropanol로 용출하여 510 nm에서 흡광도를 측정함으로써, 지방축적 억제 효과를 확인하였

음.

라. CB1 수용체를 이용한 스크리닝

(1) Forskolin-유도 cAMP 생성에 미치는 억제효과 규명

(가) HEK293 세포주를 이용한 캐너비노이드 수용체 CB1 발현을 위한 cell culture 및 transient transfection.

HEK293 세포주와 COS-7 세포주는 10% FBS와 항생제가 첨가된 DMEM에 37°C로 조정된 5% CO₂ 배양기에서 배양하였음. Transfection 24시간 전에 10 cm 직경의 배양접시에 분주한 후 calcium phosphate 방법을 사용하였음. 캐너비노이드 수용체 CB1은 2 µg/ml, adenylyl cyclase isozyme V 는 1 µg/ml 및 CRE-Luc plasmids는 1 µg/ml를 사용하였음. 24-48시간 후 cAMP 생성, CRE luciferase activity 및 mitogen-activated protein kinase의 인산화를 측정하였음.

(2) CB1 수용체를 이용한 신호전달작용에 대한 길항작용 점검.

(가) Adenyl cyclase activity 측정

Transfection 24시간 후에 24 well plate에 세포를 분주한 다음, 5 µg/ml의 [2-3H]adenine를 2-3 시간 배양하였음(0.25ml/well). 이 배양액은 10 mM HEPES (pH 7.4), 2 mg/ml fatty acid free-BSA와 phosphodiesterase inhibitor RO-20-1724 (0.1 mM)와 IBMX (0.1 mM)를 함유한 DMEM으로 대체하였음. 캐너비노이드는 20 mg/ml로 fatty acid free-BSA에 용해 후 반응액에 첨가하고 37 °C에서 적절한 adenylyl cyclase stimulator를 첨가 후 10분간 반응시켰음. 반응액은 제거하고 0.1 mM의 cAMP를 함유하는 1ml의 2.5% perchloric acid로 반응을 정지시켰음. 0.9ml의 acidic extract는 100 µl의 3.8M KOH와 0.16M K₂CO₃로 중성화 시킨 후 two-step column procedure를 이용하여 생성된 cAMP의 양을 측정하였고 또한 생성된 절대적인 양의 cAMP를 측정하기 위해 cAMP radioimmunoassay kit를 사용하여 제조사의 사용 지침서에 따라 assay를 실시하였음.

(나) CRE luciferase assay

Transfection 24시간 전에 100 mm plate에 분주한 HEK293 cells (1X10⁶ cells/ml)를 사용하여 CRE-luc 및 TK Renilla-Luc과 CB2 plasmids를 calcium phosphate 방법을 사용하여 transfection 를 실시 하였음. Transfection 24시간 후 24 well plate에 세포들을 분주한 다음 luciferase assay system (Promega Co.)를 사용하여 지침서에 따라 luciferase activity를 측정하였음.

(다) CB1 수용체의 MAPK signaling 작용에 대한 길항작용 점검

적절한 cDNAs로 transfection된 COS-7 세포주는 PBS로 두 차례 세정 후 폴리스먼을 이용하여 세포를 긁어모아 10분간 4°C에서 원심분리를 하였음. 세포 pellet은 Laemmli sample buffer (100 μ l/plate)를 첨가하고 ultra sound sonification한 후 사용시까지 -20°C에 보관하였음. 20 시료 (30 μ g)는 100°C에서 5분간 끓인 후 1.5 mm 두께의 10% polyacrylamide gel를 사용하여 전기영동 한 다음 단백질은 nitrocellulose membrane에 blotting후 적절한 절차에 따라 1, 2차 항체를 처리하며 PBS로 세정을 한 후, enhanced chemiluminescence technique를 사용하여 peroxidase activity에 의한 특이적인 밴드를 관찰하였음.

마. DIO mice를 이용한 in vivo 스크리닝

5주령 수컷 C57BL/6J 마우스를 도입하여 일주일간 순화/적응기간을 거친 후 체중에 따라 무작위 배열을 통해 군분리를 함. 도입한 동물 중 10 수의 마우스는 실험 시작부터 종료 시 까지 일반 실험동물 사료를 급여하여 정상대조군으로써 활용하였음. 나머지 마우스에는 60% 고지방 식이를 8주 이상 급여하여 비만을 유도하였음. 비만유도가 완료된 마우스는 다시 체중을 바탕으로 무작위배열을 통해 군분리를 한 후 후보 물질 등을 경구 투여하여 체중 조절 효과를 스크리닝 하였음.

2. 결과 및 고찰

가. Lipase 활성 저해 스크리닝

본사에서 보유하고 있는 총 10,723개의 천연 추출물 라이브러리를 이용하여 Lipase inhibition assay를 한 결과 80% 이상 저해 활성을 갖는 추출물을 1,125개 선별하였음. Lipase 저해활성을 나타낸 추출물 1,125개로부터 Tannin index screening을 통하여 탄닌 성분으로 인한 Lipase 활성 결과에 영향을 미칠 수 있는 소재 제거 (Tannin index < 0.1) \Rightarrow 168 개 선별하였음. 선별된 168개의 소재의 문헌조사를 통하여 특허, 독성, 안전성, 후보소재 경제성 등을 고려하여 47개의 후보소재를 선별하였음.

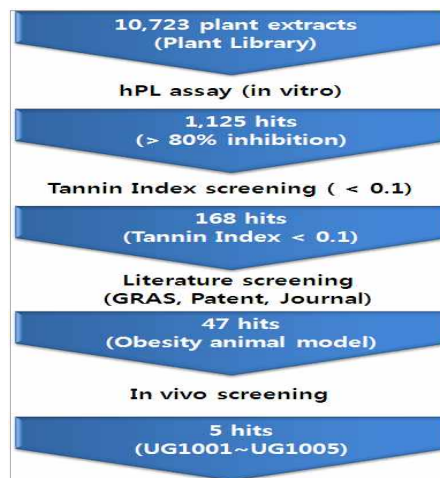


Figure 3-2. Screening process of Lipase inhibitor.

Table 3-1. The result of lipase inhibitor screening.

SAMPLE_ID	Tannin index	Lipase Inhibition	SAMPLE_ID	Tannin index	Lipase Inhibition
P00063	0.04	89.2	P01188	0.02	81.4
UG1001	0.08	93.0	P01196	0.09	79.9
P00283	0.16	90.5	P01211	0.10	89.1
P00287	-0.08	86.6	P01264	0.08	82.4
P00297	0.01	83.8	P01274	0.09	90.0
P00314	0.20	80.3	P01279	0.09	87.0
P00394	0.04	84.4	P01300	0.16	86.4
P00402	0.10	89.2	P01438	0.00	84.1
P00446	0.12	88.6	P01460	0.00	88.7
P00472	0.18	90.7	P01468	0.10	93.1
P00541	0.06	84.8	P01676	0.10	79.7
P00562	0.11	80.1	UG1003	0.13	97.1
P00599	0.18	82.6	P01858	0.13	84.7
UG1002	0.06	113.3	P01932	0.08	80.1
P00726	0.10	89.6	P02024	0.10	80.6
P00746	0.09	83.0	P02089	0.11	88.0
P00823	0.08	83.9	P02100	0.08	82.0
P00859	-0.03	83.9	P02122	0.10	90.4
P00954	0.17	86.5	P02393	0.10	81.2
P01008	0.21	84.7	UG1004	0.07	96.3
P01164	0.03	84.7	P02526	0.11	80.1
P01165	0.01	81.9	UG1005	0.13	95.1
P01167	0.14	88.1	P03421	0.02	80.5
P01183	0.19	83.0	P02397	0.20	86.1

나. 후보소재의 지방 분화 및 지방 축적 억제능 평가

비만세포 모델에서 지방 분화 및 지방 축적 억제능을 확인하였음. 그 결과 아래 테이블에 기술되어 있는 바와 같이 수종의 후보 소재 및 유효 성분이 지방 세포에서 강력한 지방 축적 억제능이 있음을 확인하였음.

Table 3-2. Lipid accumulation effect of plant extract on the 3T3 L1 pre-adipocyte.

UPI_ID	% Inhibition of Lipid accumulation	UPI_ID	% Inhibition of Lipid accumulation	UPI_ID	% Inhibition of Lipid accumulation
C129	14% inh.	P01999	0%	321-6-3	54% inh.
Ce6	57.5% inh.	UG0602	0%	362-74-1	55% inh.
UP302	16.3% inh.	P02232	0%	362-77-4	39% inh.
321-6-1	13.5% inh.	P02232	0%	P00653	63.6% inh.
326-47-13	0.8% inh.	P02602	0%	P9071	72.5% inh.
RN321-10-1	44% inh.	UG 0801	20% inh.	P00653	73.3% inh.
321-15-H	17% inh.	UG0611	45% inh.	P00745	10% inc.
321-15-E	20% inh.	P01135	60% inh.	P01250	19% inc.
321-15-W	47% inh.	P01220	4% inc.	362-103-4	3% inh.
362-152-20	10% inh.	P01239	39% inh.	P01518	6% inc.

Table 3-3. Lipid accumulation effect of plant extract & active compounds on the 3T3 L1 pre-adipocyte.

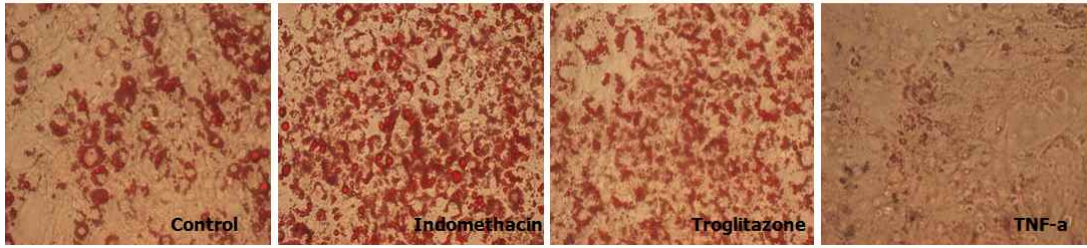
UPI_ID	% Inhibition of Lipid accumulation	UPI_ID	% Inhibition of Lipid accumulation	UPI_ID	% Inhibition of Lipid accumulation
362-152-12	18% inh.	P01333	9% inc.	P01388	15% inc.
362-152-18	15% inc.	P01357	3% inc.	RN321-28-1	81.3% inh.
362-83-5	4% inc.	P01388	6% inc.	RN321-28-2	75.6% inh.
P00380	57% inh.	P01135	38% inh.	RN321-28-3	15.7% inc.
326-48-3	0%	P01220	42% inc.	RN321-28-4	29.9% inc.
362-171-05	14% inh.	P01239	46% inh.	RN321-28-5	56.9% inh.
362-171-08	14% inh.	P01333	42% inc.	RN321-28-6	82.3% inh.
UP438	64% inh.	P01357	31% inc.	RN321-28-7	8.2% inc.
P00380	7% incre.	P01434	52% inh.	RN321-28-8	74.7% inh.
P00462	37% inh.	P01436	74% inh.	UG602-0803	47% inc.

Table 3-4. Lipid accumulation effect of plant extract & active compounds on the 3T3 L1 pre-adipocyte.

UPI_ID	% Inhibition of Lipid accumulation	UPI_ID	% Inhibition of Lipid accumulation	UPI_ID	% Inhibition of Lipid accumulation
RN321-12-2	7.2% inc.	RN327-20-E	82.8% inh.	399-112-3	5% inc.
RN321-12-6	82.7% inh.	RN327-47-5	80.7% inh.	P01630	0%
RN321-6-1	9.0% inc.	RN-327-49-CA25-3	46.7% inh.	399-112-4	10% inc.
RN321-25-2	7.5% inc.	RN-327-49-CA60-3	62.4% inh.	399-112-5	20% inh.
I-625	17% inh.	RN-321-21-1	23% inh.	399-112-6	18% inh.
K-1063	62% inh.	UG602-0803	10% inc.	P03071	4% inh.
P-367-OE	10% inh.	RN-321-13-1	4% inc.	394-15-1	42% inc.
P-367-AE	23% inh.	RN-320-0302	0%	326-47-21	31% inc.
399-111-2	7% inh.	399-109-2	52% inc.	UP266	71% inc.
399-111-3	3% inc.	P02157	7% inc.	UG602-0804	60% inc.

(A)

Exp.3 (D2~D10) ORO (Oil Red O) Staining X400



(B)

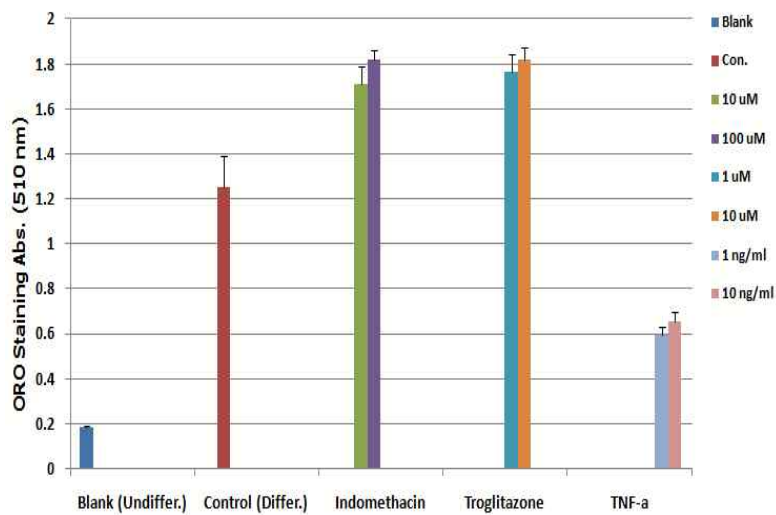
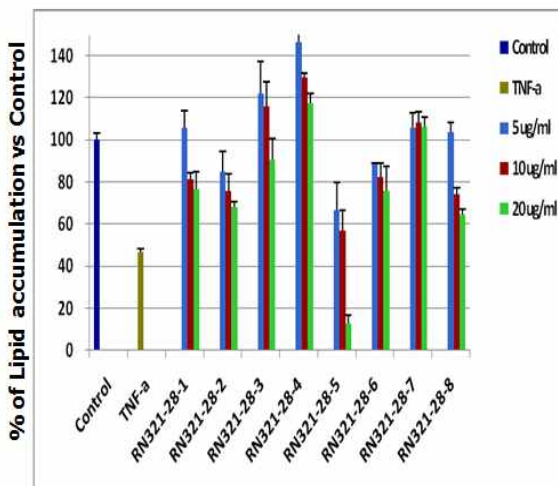


Figure 3-3. Lipid accumulation result from 3T3 preadipocytes.

(A) is the representative photo of differentiated preadipocytes, (B) Absorbance at 510nm.

Lipid Accumulation on the differentiated Cells



Cytotoxicity on the undifferentiated Cells

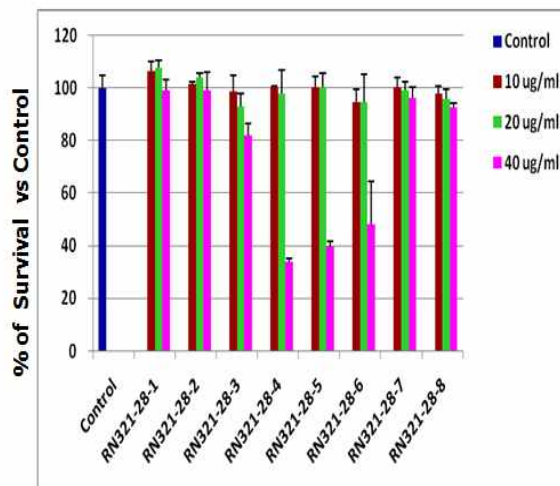


Figure 3-4. Lipid accumulation and cytotoxicity result of hits samples at 3T3 L1 preadipocyte.

다. CB1 수용체를 이용한 스크리닝

(1) cAMP 생성 억제에 대한 길항작용 조사

후보 천연물에서 CB1 수용체 신호전달작용에 대하여 길항작용을 하는 물질을 얻기 위하여 일련의 실험을 수행하였음. 먼저 HEK293세포주에 CB1 및 CRE luciferase 플라스미드를 transfection 후에 forskolin으로 자극하여 생성된 cAMP의 생성을 억제하는 agonist인 CP55940 (5 μ M)을 처리하여 cAMP 생성억제를 확인하여 CB1 cannabinoid signaling이 정상적으로 작동함을 확인하였음. 또한 CB1 수용체 길항제인 rimonabant를 함께 처리하는 경우 CP55940에 의하여 억제되었던 cAMP의 생성이 reverse됨을 확인하였음. 아래 그림에서와 같이 사용된 농도 10 μ g/ml에서 길항작용을 나타내는 후보물질은 3-1, 3-2, 21-12, 97-01, 149-15, 171-08, C129, P01999, P01194, P00380이었음. 그러므로 우리는 cAMP 생성에 대해 길항작용을 나타내는 물질들이 cre luciferase activity에 대해서도 동일하게 길항작용을 나타내는지 확인하였음.

스크리닝한 후보 물질들 중 win55212-2와 forskolin에 의해 활성화된 CB1 수용체의 cAMP를 증가시키는 물질들은 rimonabant와 같이 CB1에 대한 억제 효과가 있다고 판단됨. CB1 수용체에 대한 길항제는 지방 축적과 과다 식욕을 예방함으로써 비만 억제 효과를 가진다고 알려져 있으므로, 이들 물질들은 임상적인 가치를 가진다고 판단됨.

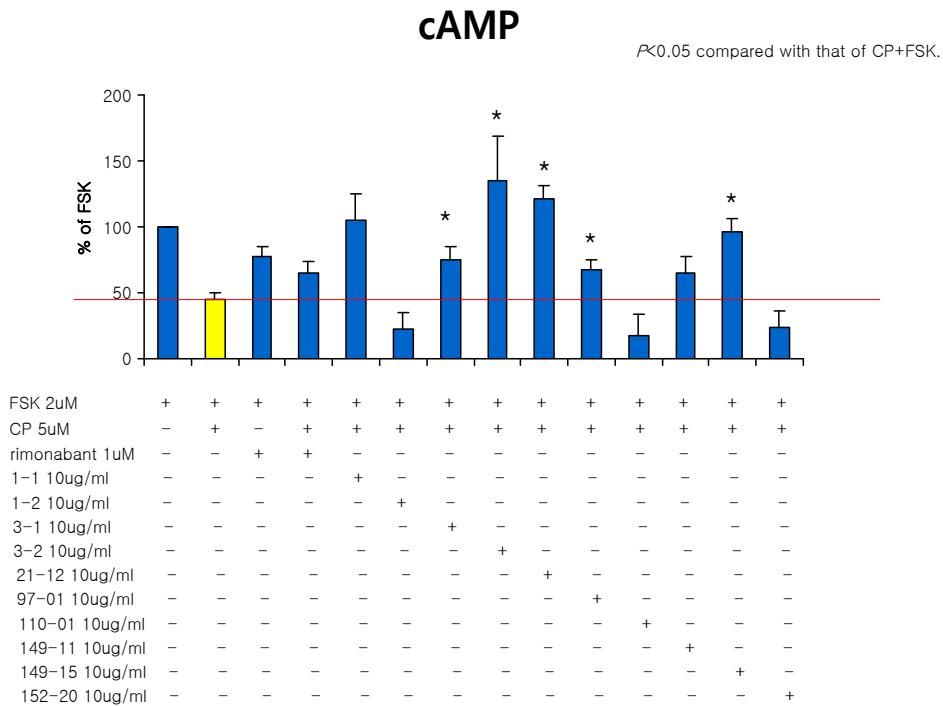


Figure 3-5 (A). Inhibition effects of forskolin-induced cAMP production.

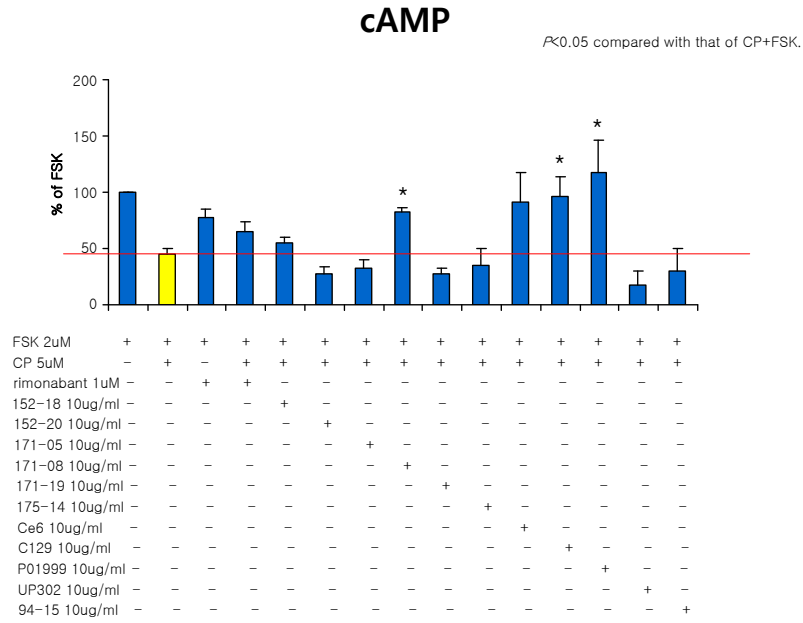


Figure 3-5 (B). Inhibition effects of forskolin-induced cAMP production.

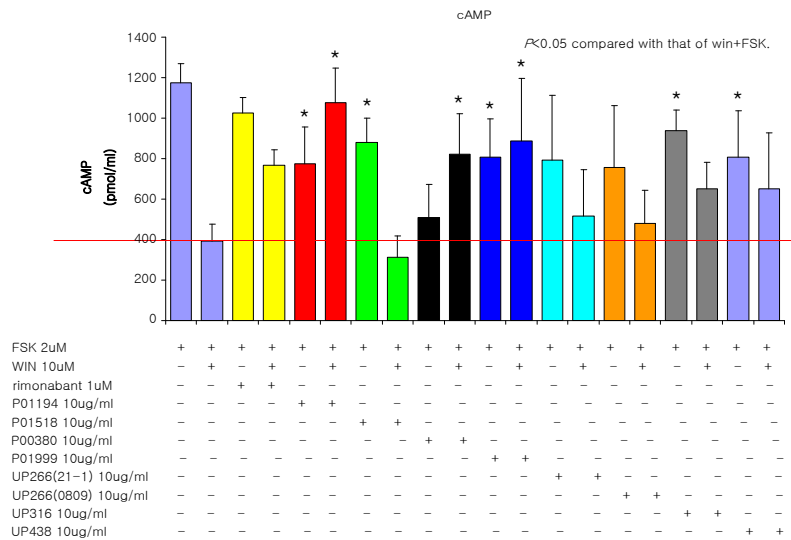


Figure 3-5 (C). Inhibition effects of forskolin-induced cAMP production. HEK293 세포주를 transfection 후 24 well plate에 분주하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였음. 익일 IBMX 0.1mM 처리 후 30분 배양, sample과 rimonabant 처리 후 15분간 배양, win55212-2 처리 후 15분 배양, 그리고 forskolin 처리 후 15분간 배양하였음. Ice-cold PBS로 세척 후 0.1M hydrochloride로 cell lysis 하였음. cell lysate를 12000rpm에서 20분간 원심 분리 후 상층액을 cAMP EIA kit로 제조사의 지시에 따라 assay를 실시하였음.

(2) CRE Luc activity에 대한 길항작용 조사

후보물질이 cAMP 생성에 미치는 길항작용을 나타내는지 확인한 후 이들 작용을 이중 검증하기 위하여 CRE transcriptional activity에 미치는 CB1 agonist인 WIN55212-2의 억제작용을 길항작용을 나타내는지 확인하였음. 아래 그림에서와 같이 1-1, 31-, 3-2, 21-12, 149-15, ce6, C129, P01999, 및 P00380 이 WIN55212-2의 CB1 수용체 유도 CRE luciferase activity 억제작용에 대해 길항작용을 나타내었음.

cAMP responsive element (CRE)는 cAMP에 의해 자극되는 전사인자로서, cAMP에 의한 만성적인 효과를 나타냄. 따라서 스크리닝한 후보 물질들 중 forskolin에 자극된 cAMP와 CRE의 활성을 증가시키는 물질들은 CB1 수용체에 대한 만성적인 길항 효과를 가진다고 판단됨. 이는 또한 CB1 길항제가 가지는 만성적인 효과에 대한 것으로서, 이러한 효과를 가지는 후보 물질은 비만 치료에 대한 좋은 예후를 가진다고 판단됨.

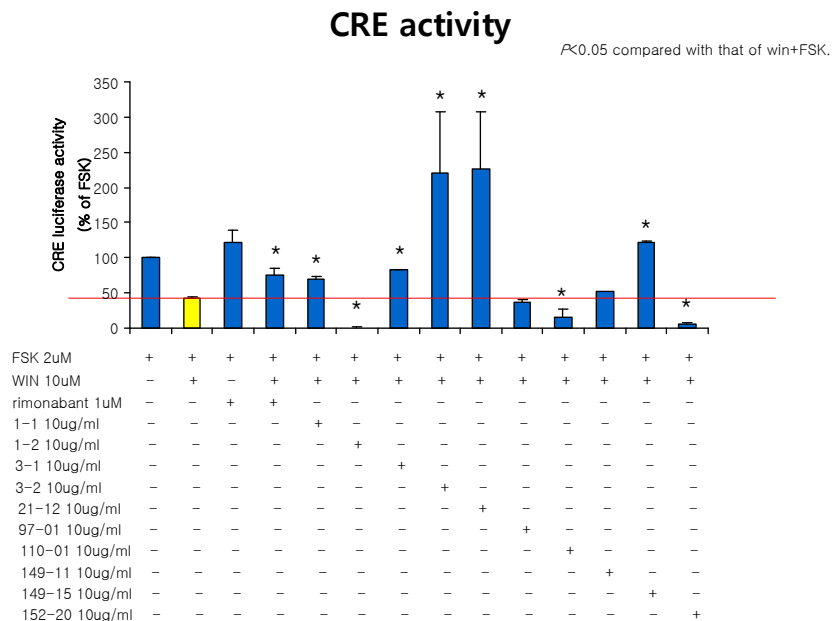


Figure 3-6 (A). Inhibition effects of forskolin-induced CRE activity.

CRE activity

P<0.05 compared with that of win+FSK.

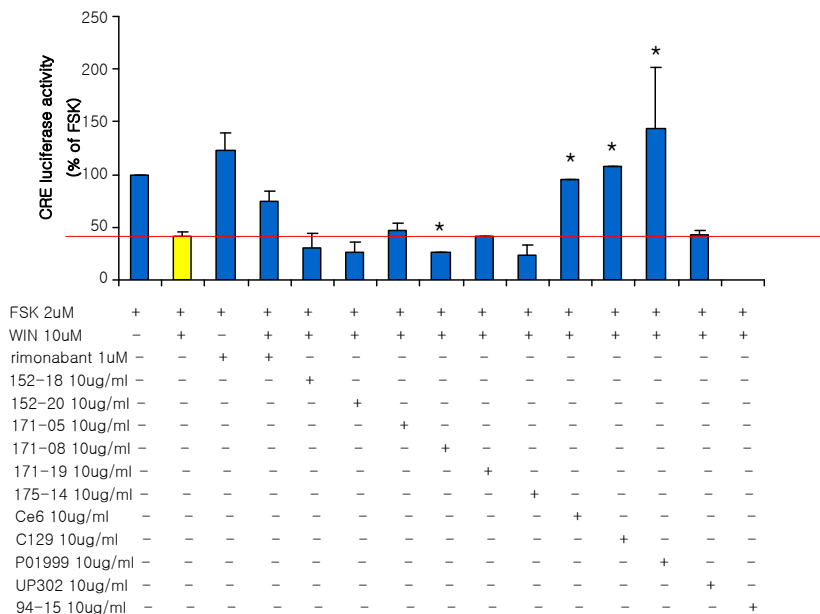


Figure 3-6 (B). Inhibition effects of forskolin-induced CRE activity.

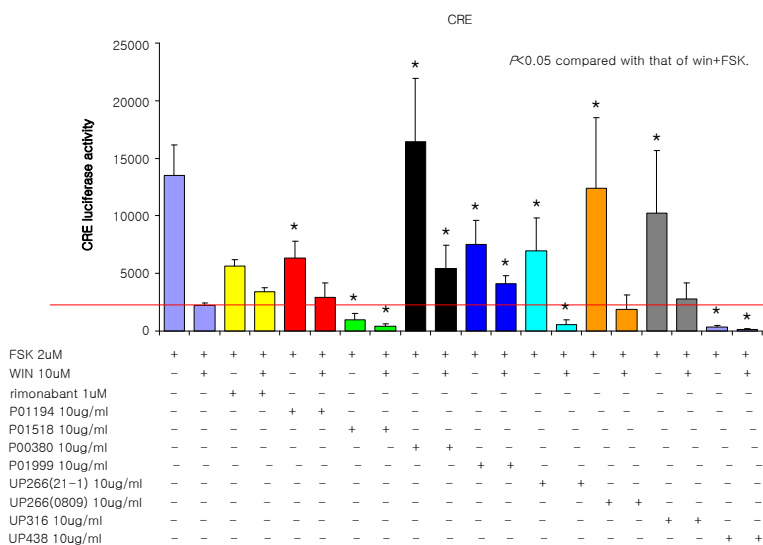


Figure 3-6 (C). Inhibition effects of forskolin-induced CRE activity. HEK293 세포주를 transfection 후 24 well plate에 분주하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였음. 익일 IBMX 0.1mM 처리 후 30분 배양, sample과 rimonabant 처리 후 15분간 배양, win55212-2 처리 후 15분 배양, 그리고 forskolin 처리 후 15분간 배양하였음. Ice-cold PBS로 세척 후 0.1M hydrochloride로 cell lysis 하였음. cell lysate를 12000rpm에서 20분간 원심 분리 후 상층액으로 CRE luciferase assay를 실시하였음.

라. DIO mice를 이용한 효능 스크리닝

5주령 C57BL/6J 수컷 마우스에 8주간 60% 고지방 식이를 투여하여 비만을 유도한 후 기도출된 후보소재 45종을 경구투여 하여 체중감소 효능을 스크리닝 함. 25 종에 대한 스크리닝은 선행연구에서 완료하였으며 1차년도 연구에서는 나머지 소재에 대한 효능 스크리닝을 수행함.

Table 3-5. Sample list of hits.

No.	Code of Hits	No.	Code of Hits	No.	Code of Hits
1	P08348	16	P00478	31	P01999
2	P07533	17	P00448	32	P00453
3	P04402	18	P00431	33	P09071
4	P07439	19	P00440	34	P00328
5	P07384	20	P00400	35	P03854
6	P07342	21	P00404	36	P04183
7	UG0602	22	P01679	37	UP318
8	P00011	23	P02341	38	P00380
9	P03127	24	P02744	39	P1250
10	P00949	25	P09070	40	UG0602-50
11	P00590	26	P01231	41	UP331
12	P00097	27	P01853	42	P1518
13	P02550	28	P00265	43	UP438
14	P03074	29	P00599	44	JF-CLW-EE2010
15	P00287	30	P03217	45	UP404

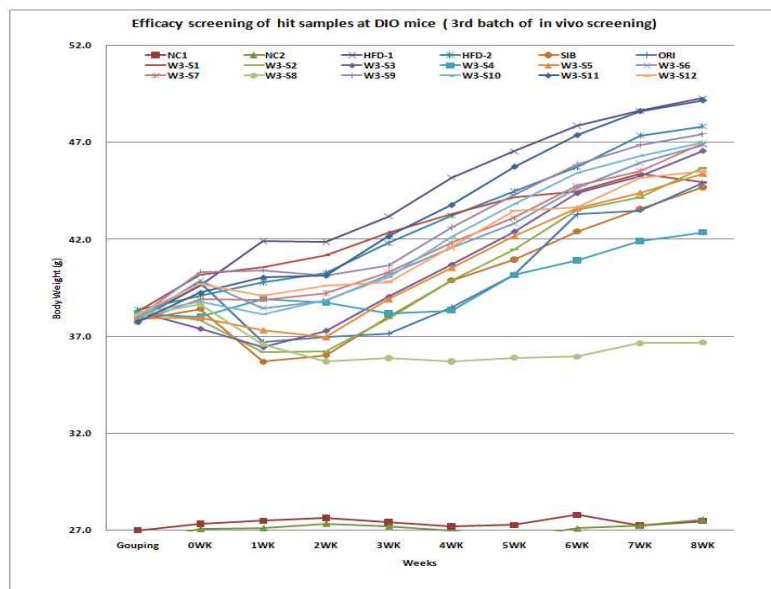


Figure 3-7. Efficacy screening of hit samples at DIO mice; 3rd batch of in vivo screening. NC; Normal diet control group, HD; High fat diet control group, SIB; sibutramine 10mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40mg/kg, bid. All samples treated per oral.

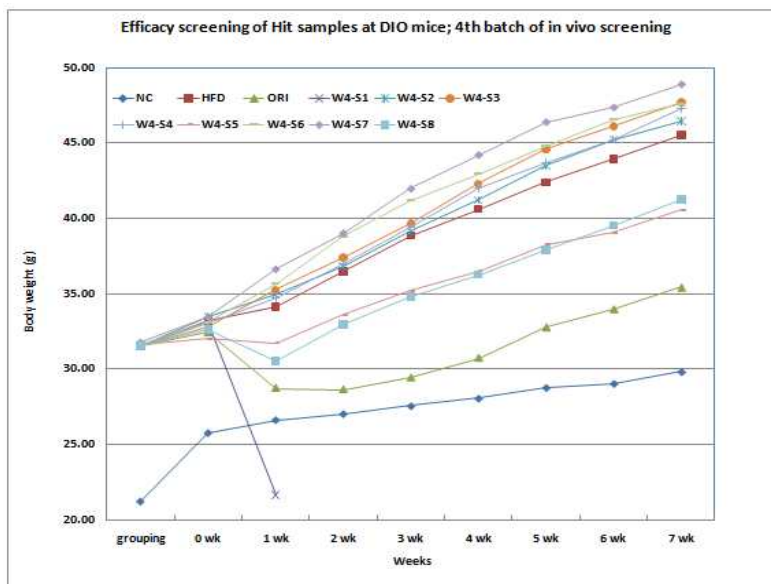


Figure 3-8. Efficacy screening of hit samples at DIO mice; 4th batch of in vivo screening. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; sibutramine 10mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40mg/kg, bid. All samples treated per oral.

기 도출된 후보소재에 대한 in vivo efficacy screening 완료 후 1차로 선발된 8 종의 후보소재의 효능 확인 실험을 수행하였음. 또한 각 후보소재의 유효물질에 대한 평가를 DIO mice 를 이용하여 4 종의 최종 후보소재를 선발하였음.

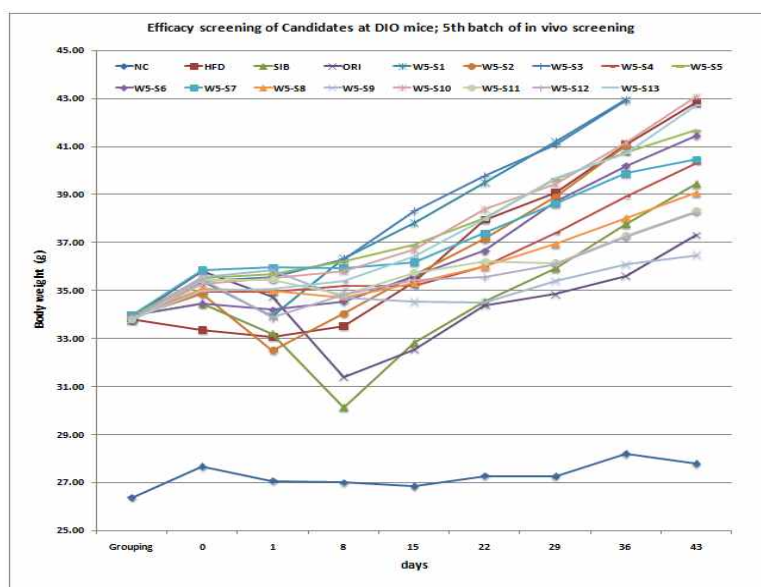


Figure 3-9. Efficacy screening of Candidates at DIO mice; 5th batch of in vivo screening. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; sibutramine 10mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40mg/kg, bid. All samples treated per oral.

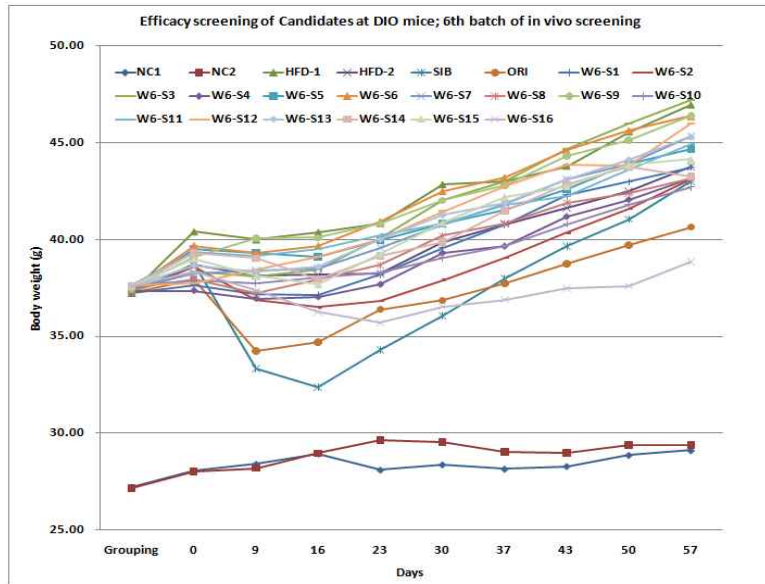


Figure 3-10. Efficacy screening of Candidates at DIO mice; 6th batch of in vivo screening. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; sibutramine 10mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40mg/kg, bid. All samples treated per oral.

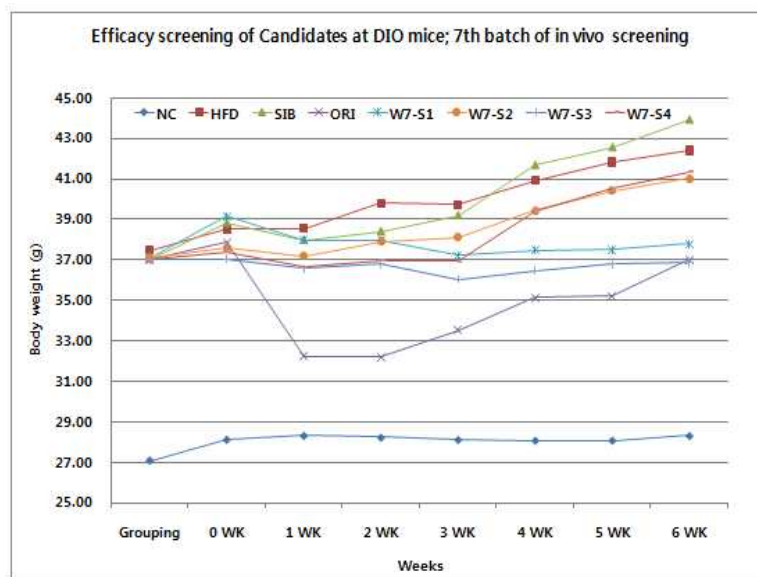


Figure 3-11. Efficacy screening of Candidates at DIO mice; 7th batch of in vivo screening. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; sibutramine 10mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40mg/kg, bid. All samples treated per oral.

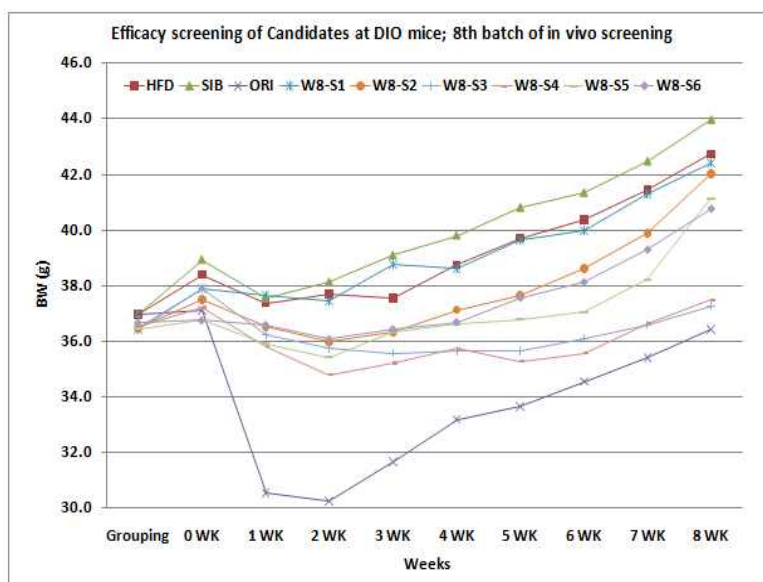


Figure 3-12. Efficacy screening of Candidates at DIO mice; 8th batch of in vivo screening. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; sibutramine 10mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40mg/kg, bid. All samples treated per oral.

제 2 절 기능식품 소재 개발 - In vitro 연구

전임상 및 임상시험 물질의 효능 및 기전을 평가하기 위한 in vitro 실험은 DPPH 라디칼 소거능, 3T3-L1 preadipocyte의 분화 및 지방축적 억제 효과, 세포 내부의 triglyceride 함량 저해 효과, 지방세포의 lipolysis 증가 효과를 측정하는 방법으로 이루어짐. 전임상 후보물질의 기전을 확인하고 이를 통해 도출된 전임상 물질의 in vitro 연구를 통해 최종 임상 시험물질을 선정하는데 참고하였음. 또한 임상시험물질에 대한 in vitro 연구도 지속적으로 수행하여 작용기전에 대한 과학적 접근을 위한 연구를 수행하였음.

1. 재료 및 방법

가. 세포독성 시험

3T3 L1 preadipocyte는 10% BCS와 항생제가 첨가된 DMEM-HG에 37°C, 5%CO₂ 배양기에 배양함. 시료에 의한 세포의 viability 및 Cytotoxicity를 측정하기 위하여 5000 Cells/well로 96 well plat에 분주 한 후, 일정 시간 까지 배양한 다음 MTS Kit 및 LDH kit를 이용하여 지시서에 따라 측정 하여 측정 시료가 지방세포로의 분화 전 단계인 preadipocyte에 미치는 영향을 측정함

나. DPPH 라디칼 소거능

전임상시험 물질의 전자공여능은 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich Co.)

에 대한 수소공여 효과로 측정하였음. DMSO로 희석한 전임상시험 물질 100 μ l에 0.2 mM DPPH 용액을 가해 혼합한 다음, 30분간 반응 시켜, 540 nm에서 흡광도를 측정하였음.

다. Forskolin-유도 cAMP 생성에 미치는 억제효과 규명

HEK293 세포주와 COS-7 세포주는 10% FBS와 항생제가 첨가된 DMEM에 37°C로 조정된 5% CO₂ 배양기에서 배양하였음. Transfection 24시간 전에 10 cm직경의 배양접시에 분주한 후 calcium phosphate 방법을 사용하였음. 캐너비노이드 수용체 CB1은 2 μ g/ml, adenylyl cyclase isozyme V 는 1 μ g/ml 및 CRE-Luc plasmids는 1 μ g/ml를 사용하였음. 24-48시간 후 cAMP 생성, CRE luciferase activity 및 mitogen-activated protein kinase의 인산화를 측정하였음.

라. 3T3-L1 preadipocyte의 분화 유도

3T3-L1 preadipocyte는 10% bovine calf serum(BCS)와 antibiotics(penicillin 100 units/ml, streptomycin 100 units/ml)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)을 이용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였음. 분화는 24 well plate 혹은 6 well plate 에 세포를 배양 후, 100% confluent하게 되면 2일간 더 배양한 다음(day 0), MDI(0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMX), 1 μ M Dexamethasone, 5 μ g/ml insulin)를 포함한 10% fetal bovine serum(FBS)첨가 DMEM배지로 교체하여 유도하고, 2일 후(day 2) 5 μ g/ml insulin이 함유된 10% FBS DMEM으로 2일간 배양하였음. 그 후 지방세포의 완전 분화를 위해 2일에 한번씩(day 4, 6) 10% FBS가 첨가 된 DMEM으로 교체하면서 4일간 더 배양하여 분화 하였고, 전임상시험 물질의 처리는 각 실험의 목적에 맞게, 분화가 유도되는 동안(day 0, 2, 4, 6) 실시하거나, 혹은 분화가 종료되는 시점(day 8)에 실시하였음.

마. Lipid accumulation 측정

3T3-L1 preadipocyte를 24-well plate에 5x10⁴ cells/well로 seeding하여 배양 후 분화하였고, 전임상시험물질은 분화가 유도되는 동안(day 0, 2, 4, 6)에 처리하였음. 분화가 완전히 이루어진 시점에(day 8) 모든 plate의 배지를 제거하고, 3.7 % formaldehyde를 500 μ l 처리하여 실온에서 1시간 동안 고정 하였음. Formaldehyde를 완전히 제거한 다음, 차가운 증류수로 3회 세척 하고, Oil red O working solution으로 10분간 염색하였음. 이 때 사용된 Oil red O working solution은 Oil red O powder 2 g를 100 ml isopropanol에 녹인 뒤, 증류수에 6:4의 비율로 희석한 다음, 여과 하여 사용하였음. 세포를 염색한 다음 Oil red O working solution을 완전히 제거하고 차가운 증류수로 3회 세척 하여 물기를 완전히 제거한 다음, 100% isopropanol로 용출하여 510 nm에서 흡광도를 측정함으로써, 지방축적 억제 효과를 확인하였음.

바. Intracellular Triglyceride 함량 측정

분화된 세포내의 TG를 정량적으로 측정하기 위해, 분화가 유도되는 동안 전임상시험물질을 처리하고, 8일 째에 세포의 pellet을 모아 cell lysis buffer(Cell Signaling, Technology, Inc.)를 사용하여 lysis 하였음. 추출한 단백질은 Protein Assay kit (Bio-Rad, Lab., Inc.)를 사용하여 정량 후 사용하였으며, Triglyceride Colorimetric Assay kit(Cayman, Chem. Inc.)를 사용하여 세포내 TG 함량을 측정하였음.

사. Lipolysis 유도 효과 측정

완전히 분화된 세포에 전임상시험물질을 농도별로 처리한 다음, 48시간 더 배양하여 배지를 취하고, 배지로 방출되는 glycerol의 양을 측정함으로써 lipolysis 유도 효과를 측정 하였음. 배지 내 glycerol 양은 Free glycerol reagent(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 측정 하였음. 시험물질을 처리한 배양액 50 μ l과 free glycerol reagent 150 μ l을 혼합하여, 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응 시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정 하였음.

2. 결과 및 고찰

가. 세포독성 시험

선행 연구 결과에서 도출 된 1차 후보 소재를 이용하여 미분화된 preadipocyte 및 분화된 비만세포를 이용하여 세포 독성실험을 실시하여 세포 독성 농도를 확인 하였으며, 본 실험에서 확인 된 농도는 세포를 이용한 실험에 적용 시 활용하였음.

나. 전임상 후보 물질의 지방 분화 및 지방 축적 억제능 시험

최종 도출된 전임상 후보 물질에 대하여 지방 분화 및 지방 축적 억제능을 실시하였으며, 각 기전별로 도출된 후보소재의 최적의 혼합 비율을 선정하기 위하여 시험을 진행하고 전임상 및 임상시험 물질을 도출하는데 참고로 함.

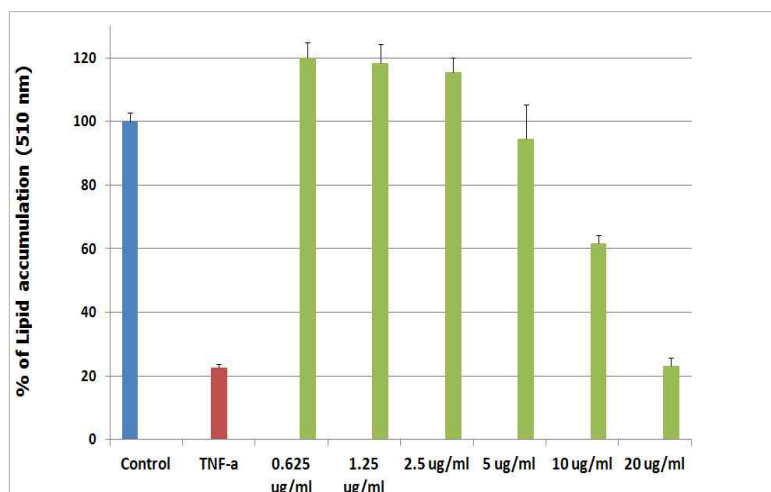


Figure 3-13. Inhibition effects of UP331 on the 3T3 L1 adipocyte.

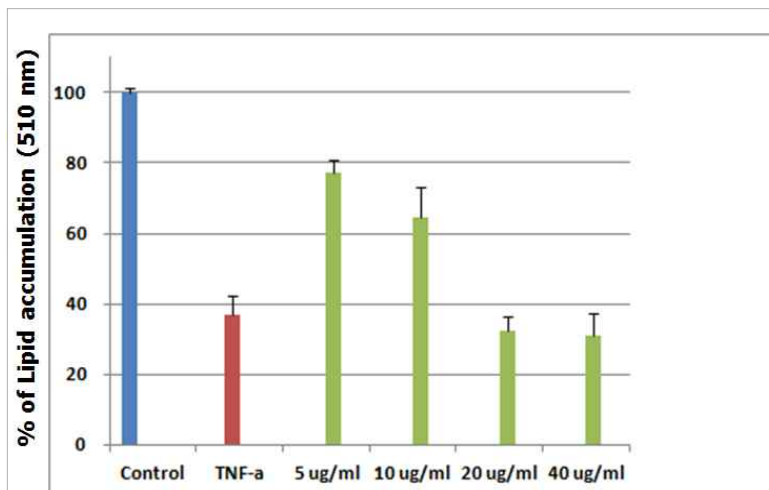


Figure 3-14. Inhibition effects of UP342 on the 3T3 L1 adipocyte.

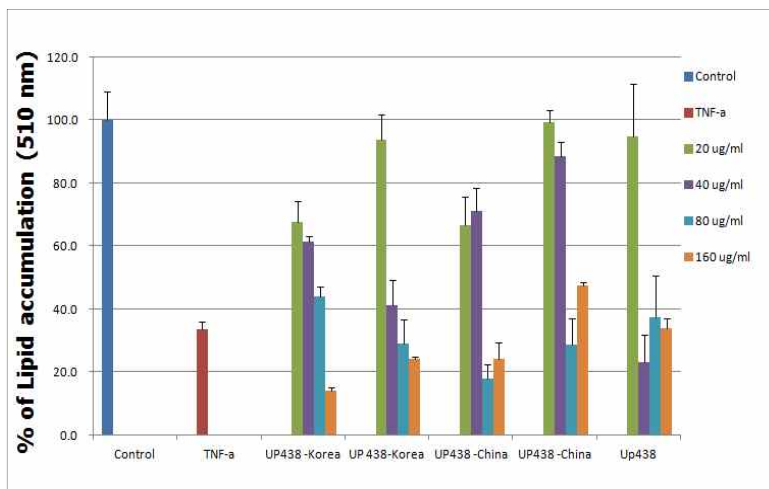


Figure 3-15. Inhibition effects of UP438 on the 3T3 L1 adipocyte.

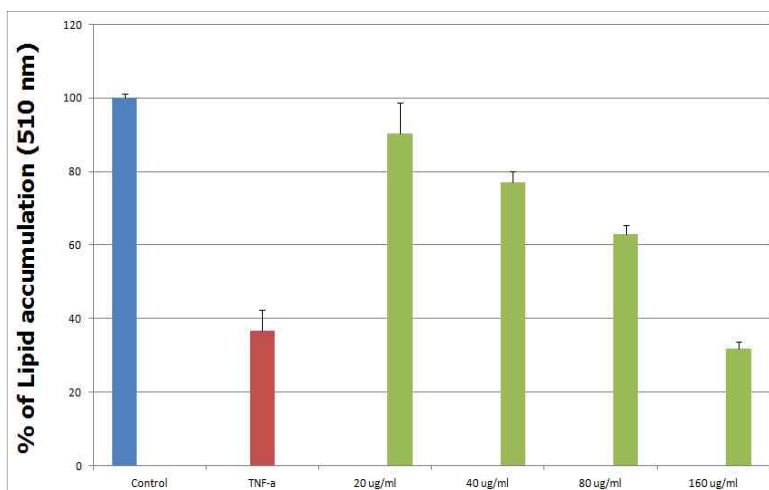


Figure 3-16. Inhibition effects of P9071 on the 3T3 L1 adipocyte.

다. 전임상 물질의 지방분화 및 지방 축적 억제능 시험

최종 도출된 전임상 시료에 대한 지방분화 및 지방 축적 억제능을 시험 한 결과 후보 소재의 지방 축적 억제능이 다른 시료에 비하여 우수한 것으로 나와 최종 임상 선정됨.

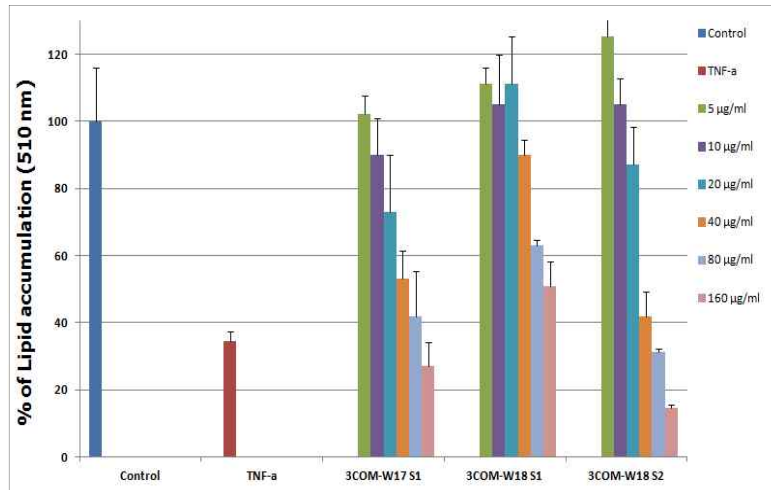


Figure 3-17. Inhibition effects of hit candidates on the 3T3 L1 adipocyte.

라. 임상시험 물질의 in vitro 기전연구

확보된 실험 결과 및 고객사와의 미팅을 통하여 3COM-W17S1과 3COM-W17S5 를 최종임상 시험 후보 소재로 선정하였으며, 이에 따른 각 임상시험물질의 기전 연구를 실시하였음.

(1) 3COM-W17S1

(가) DPPH 라디칼 소거능

3COM-W17S1의 농도별 (20, 40 µg/ml) DPPH 라디칼 소거능을 측정하여 항산화 효과를 검증하였음. 실험결과, 20 µg/ml 농도부터 유의적인 소거능을 나타냈으며, ascorbic acid와 유사한 소거능을 확인 할 수 있었음.

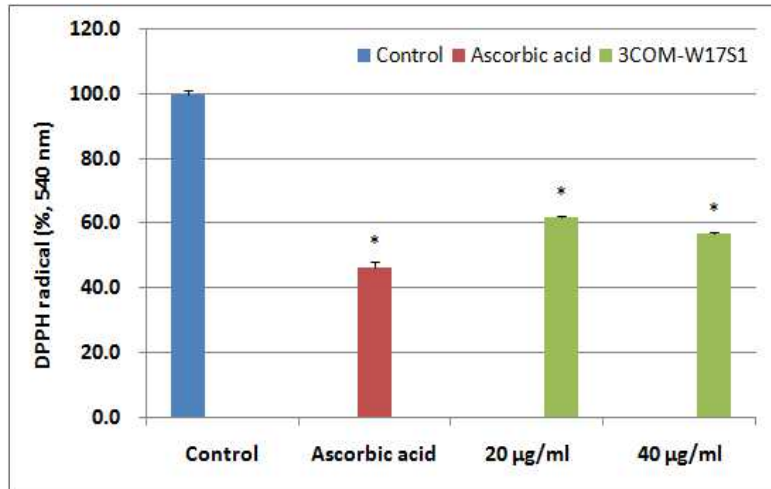


Figure 3-18. DPPH radical scavenging ability of 3COM-W17S1.

(나) Forskolin-유도 cAMP 생성에 미치는 억제효과

Win55212-2와 forskolin에 의해 활성화된 CB1 수용체의 cAMP를 증가시키는 물질들은 rimonabant와 같이 CB1에 대한 억제 효과가 있다고 판단되고, CB1 수용체에 대한 길항제는 지방 축적과 과다 식욕을 예방함으로써 비만 억제 효과를 가진다고 알려져 있는 바, 선정된 후보 소재인 3COM-W17S1의 CB1 수용체 신호전달작용에 대하여 길항작용을 하는지 확인하기 위하여 본 실험을 진행하였음. 그 결과 3COM-W17S1이 Win compound에 의해 억제 되는 cAMP의 양을 증가시킴을 확인하였음.

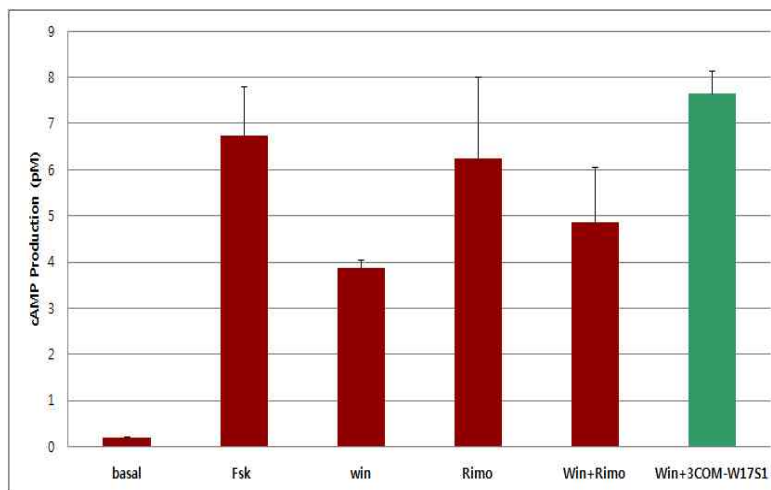


Figure 3-19. cAMP production effect of 3COM-W17S1 on the Forskolin induced model.

(다) Lipolysis 유도 효과

3T3-L1 adipocyte가 분화된 상태에서 지방구들의 lipolysis 활성을 검증하였음. Lipolysis가 유도되면, triglyceride가 분해되어 세포질에서 glycerol과 fatty acid가 생성되고, 계속적으로 lipolysis 가 일어나면 glycerol은 세포외로 방출됨. 분화된 지방세포에 3COM-W17S1을 처리하

여 48시간 후에 배지로 방출된 glycerol 양을 측정한 결과, 시료에 의해 glycerol 방출량이 농도 의존적으로 증가됨을 알 수 있었고, 250 $\mu\text{g/ml}$ 에서 control에 비해 약 1.4배 증가 한 것을 확인하였음.

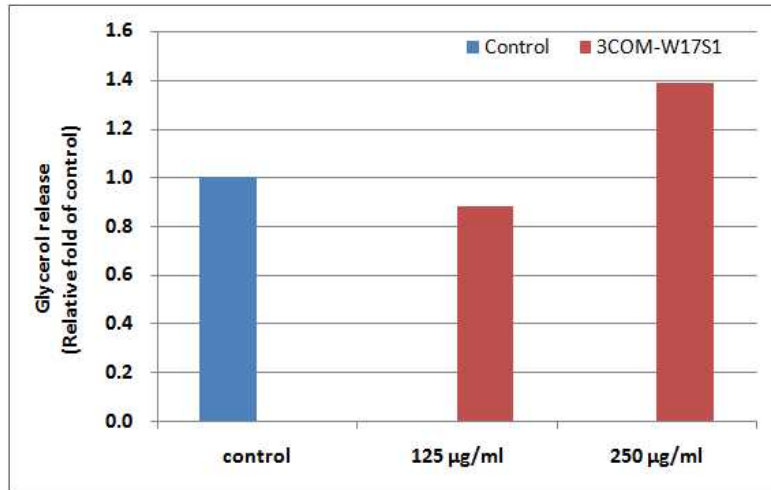


Figure 3-20. Effect of 3COM-W17S1 on lipolytic activity in 3T3-L1 adipocyte.

(2) 3COM-W17S5

(가) DPPH 라디칼 소거능

3COM-W17S5의 농도별 (20, 40 $\mu\text{g/ml}$) DPPH 라디칼 소거능을 측정하여 항산화 효과를 검증하였음. 실험결과, 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도부터 유의적인 소거능을 나타냈으며, ascorbic acid와 유사한 소거능을 확인 할 수 있었음.

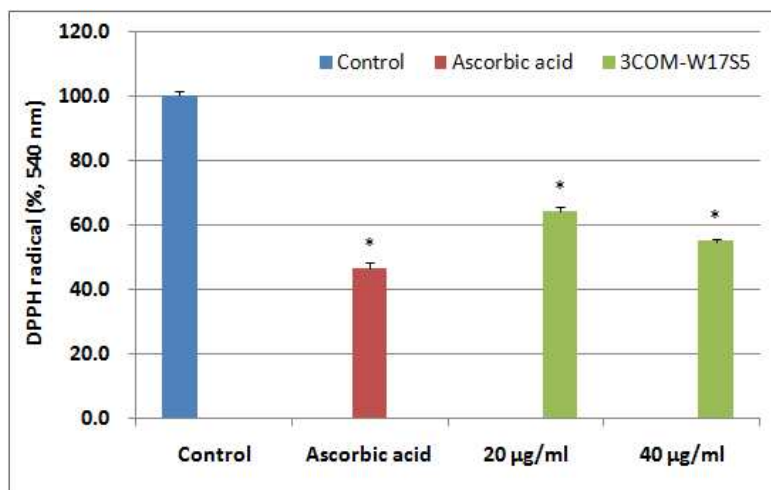


Figure 3-21. DPPH radical scavenging ability of 3COM-W17S5.

(나) Forskolin-유도 cAMP 생성에 미치는 억제효과

Win55212-2와 forskolin에 의해 활성화된 CB1 수용체의 cAMP를 증가시키는 물질들은 rimonabant와 같이 CB1에 대한 억제 효과가 있다고 판단되고, CB1 수용체에 대한 길항제는 지방 축적과 과다 식욕을 예방함으로써 비만 억제 효과를 가진다고 알려져 있는 바, 선정된 후보 소재인 3COM-W17S5의 CB1 수용체 신호전달작용에 대하여 길항작용을 하는지 확인하기 위하여 본 실험을 진행하였음. 그 결과 3COM-W17S5가 Win compound에 의해 억제 되는 cAMP의 양을 증가시킴을 확인하였음.

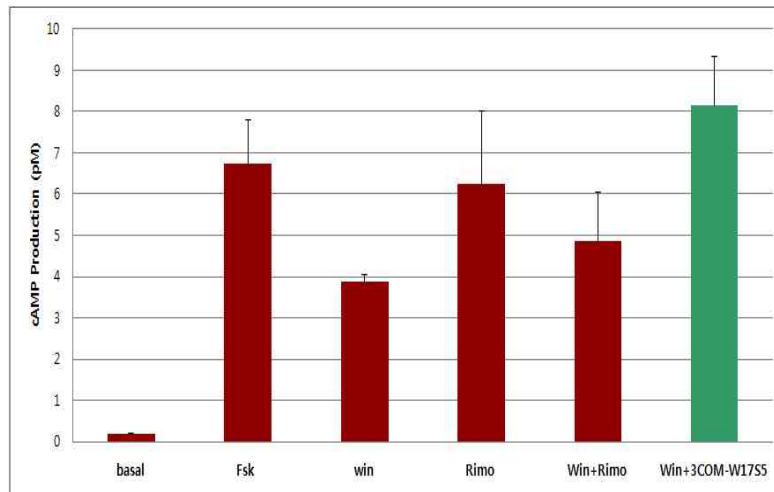


Figure 3-22. cAMP production effect of 3COM-W17S5 on the Forskolin induced model.

(다) Lipid accumulation 억제 효과

3T3-L1 preadipocyte에 분화를 유도하면서 3COM-W17S5를 40, 80, 100, 120 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하여 지방 축적정도를 측정 하였음. 그 결과, 농도 의존적인 억제효과를 관찰하였고, 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 70% 이상의 높은 억제 효과를 확인하였음.

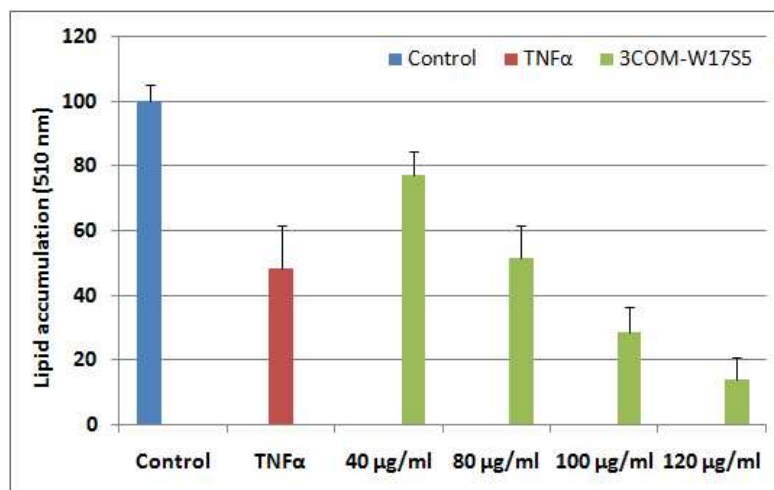


Figure 3-23. Inhibitory effect of 3COM-W17S5 on the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocyte.

(라) Intracellular Triglyceride 억제 효과

대부분의 지방구는 TG(triglyceride)와 perilipin A와 같은 단백질로 구성되어 있기 때문에, 본 연구에서는 지방구의 감소를 보다 세밀하게 관찰하기 위해 세포내의 TG함량을 측정 하였음. 3T3-L1 preadipocyte에 분화를 유도하면서 3COM-W17S5를 80, 120, 160 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하여 TG함량을 측정한 결과, 농도 의존적인 억제 활성을 나타내었고, 160 $\mu\text{g/ml}$ 에서 50 %이상의 높은 억제 활성을 나타내었음.

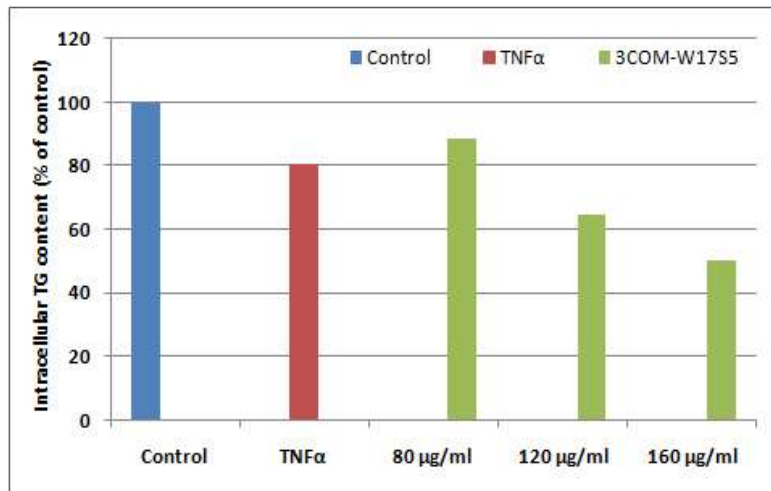


Figure 3-24. Inhibitory effect of 3COM-W17S5 on Intracellular triglyceride in 3T3-L1 adipocyte.

(마) Lipolysis 유도 효과

3T3-L1 adipocyte가 분화된 상태에서 3COM-W17S5를 처리하여 48시간 후에 배지로 방출된 glycerol 양을 측정하여 lipolysis 유도 효과를 검정하였음. 그 결과, 시료에 의해 glycerol 방출량이 농도 의존적으로 증가됨을 알 수 있었고, 125 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 control에 비해 약 2배 이상 증가 한 것을 확인하였음.

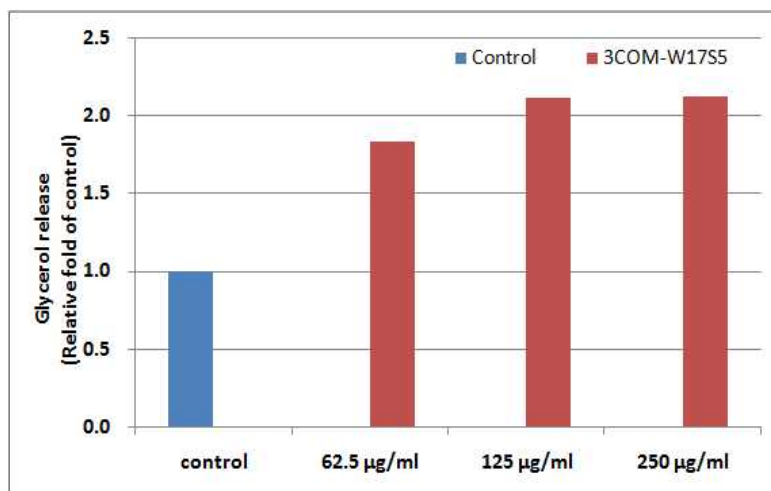


Figure 3-25. Effect of 3COM-W17S5 on lipolytic activity in 3T3-L1 adipocyte.

제 3 절 기능식품 소재개발 - In vivo 연구

본 과제 수행에 있어서 in vivo 연구는 주로 DIO (diet induced obesity) model 을 이용하여 수행되었음. 우선 DIO mice에서 선행연구에서 선발된 45 종의 후보물질의 효능 스크리닝을 먼저 수행하여 8종의 1차 후보물질을 선발함. 이후 DIO mice 에서의 효능 확인 및 유효물질 평가를 등을 수행하여 1차로 총 4종의 전임상후보 물질을 선발하였고 2차로 2종의 전임상 후보 물질이 추가 선발되었음. 또한 이러한 전임상 후보물질의 효능은 DIO rat model 시험을 통하여 효능에 대한 확인과정을 거쳤음. 이후 복합기전을 가지는 기능식품 소재 개발을 위하여 복합물질에 대한 효능 시험을 DIO mice 등을 활용하여 지속적으로 수행하여 최종적으로 전임상 물질 3종 (3COM-W17S1, 3COM-W17S3, 3COM-W17S5)을 성공적으로 도출하였음.

특히 현재 임상시험 수행중인 임상시험물질 (UP601, UP603) 에 대해서는 DIO mice 를 이용한 효능 확인 및 혈청을 활용한 ELISA 분석 등을 통해 그 작용기전에 대해 좀 더 과학적인 근거를 확보하고자 지속적인 연구를 수행하였음. 추가효능기전 연구인 랫드를 이용한 acute feed intake test를 수행하여 in vivo 효능을 평가하였음. 평가결과 최종 후보물질 4종 중 2개 및 전임상물질의 랫드에서 식욕억제 효능을 확인하였음.

1. DIO 모델에서의 효능 연구

가. 재료 및 방법

(1) DIO mice 실험모델 제작 및 효능 시험

5주령 수컷 C57BL/6J 마우스를 도입하여 일주일간 순화/적응기간을 거친 후 체중에 따라 무작위 배열을 통해 군분리를 함. 도입한 동물 중 10 수의 마우스는 실험 시작부터 종료 시 까지 일반 실험동물 사료를 급여하여 정상대조군으로써 활용하였음. 나머지 마우스에는 60% 고지방 식이를 8주 이상 급여하여 비만을 유도하였음. 비만유도가 완료된 마우스는 다시 체중을 바탕으로 무작위배열을 통해 군분리를 한 후 후보 물질 등을 경구 투여하여 체중 조절 효과를 평가하는데 활용하였음.

(2) DIO mice 효능평가지험에서의 주요 biomarker의 측정

주요 biomarker 는 시험물질 투여 기간 중에 관찰된 체중 및 사료섭취량임. 체중은 전자저울을 이용하여 매주 일정한 시각에 측정하여 기록하였음. 사료 섭취량은 약 24시간동안 급여된 사료에서 잔량은 소거하여 산출하였으며 각 마우스 개체별로 좀 더 정확한 사료 섭취량 측정을 위하여 각 마우스를 미니케이지에 한 마리 씩 수용하여 시험을 수행하였음.

시험물질 투여 및 관찰이 종료된 후에는 부검을 통하여 주요 장기 (liver, pancrease 등) 와 내장 지방 (epididymal, retroperitoneal 및 peri-renal fat pad)의 무게를 측정하여 체지방축적과 관련된 사항에 대한 연구를 진행함. 또한 혈청에서 간기능관련지표 (ALT, ASP, ALP,

TP 등) 와 지질대사 관련지표(TG, TC, LDL-C, HDL-C 등)의 변화를 알아보기 위하여 채취된 샘플을 GLP 분석기관에 의뢰하여 blood chemistry 분석결과를 확보하여 후보소재 및 임상시험 물질의 체중조절 효능 평가에 활용하였음.

부검시 적출된 간 조직에 대한 병리조직학적 분석을 실시함. 고정된 간 조직을 파라핀으로 포매 후 0.45 μm 로 박절한 다음 HE 염색을 실시하였음. 염색된 슬라이드를 광학 현미경 (Olympus BX51, Japan)로 검경하고 NASH scoring(non-alcoholic steato hepatitis) 을 실시하였음.

DEXA(dual energy X-ray absorptiometry, Lunar PIXImus, GE, USA)분석은 체성분분석을 위하여 실시하였음. 각 실험동물을 isoflurane으로 마취하여 진성시킨 상태에서 측정하였음.

(3) 체중 조절 기전 연구를 위한 혈액내 biomarker 변화 측정 (leptin, active ghrelin, insulin)

DIO mice를 이용한 효능 확인 및 기전 연구의 일환으로, 혈액내의 biomarker 변화를 측정하여 개선 효과를 검정하였음. 시료 투여 완료 후 부검 진행시, K3EDTA가 포함 된 tube에 protease inhibitor를 첨가 하여 혈액 채취 시 사용 하였고, protease inhibitor는 10 μl DPP-4 inhibitor (Millipore, #DPP4)와 1 mg/ml aprotinin(Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였음. 채취한 혈액은 4 $^{\circ}\text{C}$, 2,000 g에서 15분간 원심분리 후 상층액을 취해 e-tube에 일정량씩 분주 하여, -80 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하면서 실험을 진행하였음. Active ghrelin 함량 측정을 위한 plasma는 0.05 N의 HCl을 첨가 하여 acidification한 다음 -80 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하여 실험에 사용하였음. Biomarker는 leptin, active ghrelin, insulin을 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit를(Millipore, #EZML-82K, #EZRGRA-90K, #EZRMI-13K) 사용하여 측정하였음.

(4) DIO rat을 이용한 효능 확인시험

45% 고지방 식이로 유도된 비만 rat 에 후보물질을 투여하여 효능 평가 결과를 확인하고, 또한 임상시험을 위한 자료 확보를 위하여 최소 3개 용량범위를 설정하여 용량결정시험을 수행함.

시험물질 투여 및 관찰이 종료된 후에는 부검을 통하여 주요 장기 (liver, pancreas 등) 와 내장 지방 (epididymal, retroperitoneal 및 peri-renal fat pad)의 무게를 측정하여 체지방축적과 관련된 사항에 대한 연구를 진행함. 또한 혈청에서 간기능관련지표 (ALT, ASP, ALP, TP 등) 와 지질대사 관련지표(TG, TC, LDL-C, HDL-C 등)의 변화를 알아보기 위하여 채취된 샘플을 GLP 분석기관에 의뢰하여 blood chemistry 분석결과를 확보하여 후보소재 및 임상시험 물질의 체중조절 효능 평가에 활용하였음.

부검시 적출된 간 조직에 대한 병리조직학적 분석을 실시함. 고정된 간 조직을 파라핀으로 포매 후 0.45 μm 로 박절한 다음 HE 염색을 실시하였음. 염색된 슬라이드를 광학 현미경 (Olympus BX51, Japan)로 검경하고 NASH scoring(non-alcoholic steato hepatitis) 을 실시하였음.

나. 결과 및 고찰

(1) DIO mice 에서의 효능 시험

(가) 전임상 후보 물질에 대한 DIO mice 효능시험 결과

① P9071

8주간 60% 고지방 식이(Harlan, TD06414)로 비만을 유도한 마우스에 P9071을 8주간 경구투여 한 결과 체중증가가 유의적으로 감소됨을 관찰하였음.

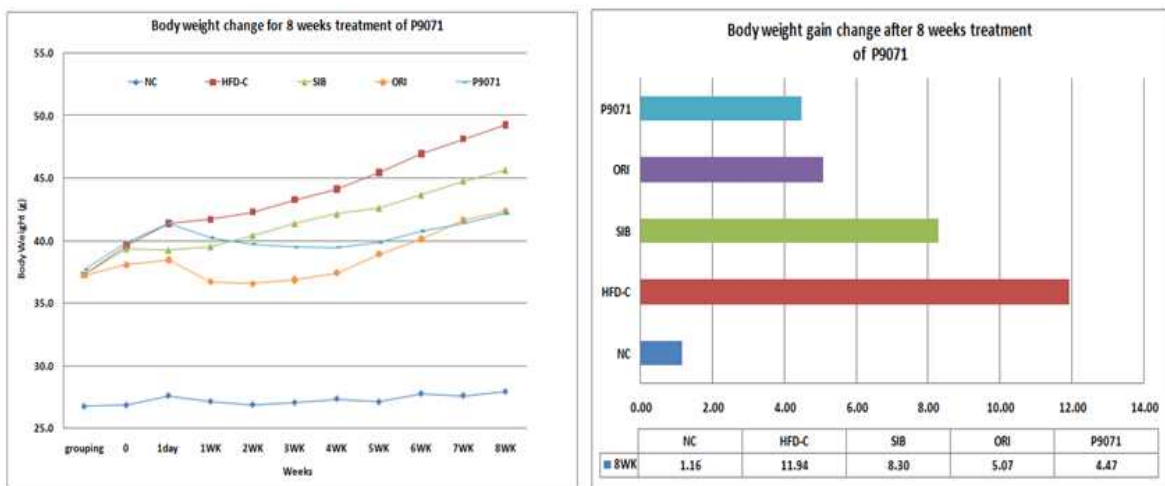


Figure 3-26. Body weight change for 8 weeks treatment of P9071. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; sibutramine 10mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40mg/kg, bid. All samples treated per oral.

시료투여 완료 후 부검을 통하여 각 지방조직을 적출하고 무게를 측정하였음. P9071 투여에 의하여 지방조직이 감소하는 경향을 보였음.

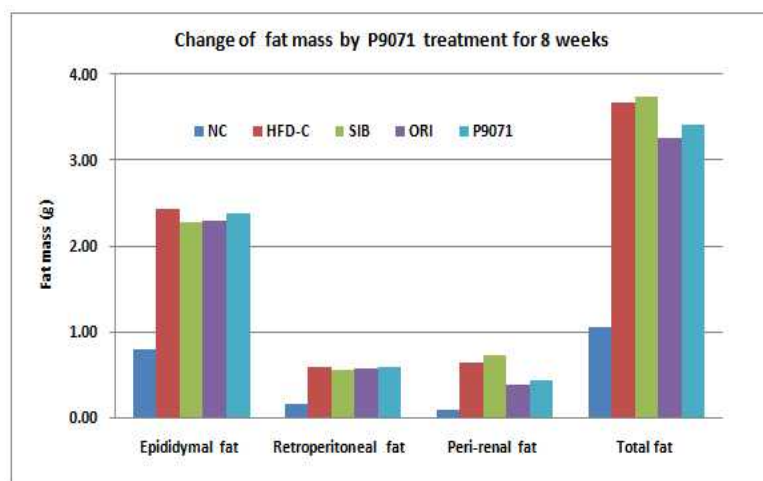


Figure 3-27. Change of fat mass by P9071 treatment for 8 weeks. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; sibutramine 10mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40mg/kg, bid. All samples treated per oral.

시료 투여 완료 후 혈액을 채취하여 간기능 지표 (ALT, AST, ALP 및 TP) 와 지질 관련 지표(T-Chol, LDL-C, HDL-C 및 TG) 에 대한 혈액분석을 실시한 결과 P9071을 투여한 군에서 T-CHOL 및 LDL-C 의 유의적인 감소가 관찰되었음.

Table 3-6. Blood chemistry results of P9071 treatment for 8 weeks.

Group		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	T-chol (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	TG (mg/dL)	TP (g/dL)
NC (n=4)	Mean	18.15 *	65.55	280.90 *	97.50 *	7.60	48.40 *	19.75	5.03
	SD	4.803	13.162	41.818	9.469	0.816	5.167	9.743	0.263
HFD-C (n=5)	Mean	99.66	82.06	160.60	219.00	12.18	75.40	28.20	5.22
	SD	54.218	22.713	42.020	30.512	4.595	4.898	11.367	0.487
SIB (n=5)	Mean	86.24	79.86	217.82	202.20	10.58	73.44	21.20	5.14
	SD	56.650	25.249	59.171	32.980	2.725	3.559	4.550	0.270
ORI (n=5)	Mean	34.28	65.46	167.28	157.20 *	5.56 *	71.34	39.80	5.04
	SD	14.914	13.227	18.165	29.508	0.958	9.235	27.161	0.152
P9071 (n=5)	Mean	31.48 *	88.96	136.06	176.20 *	6.64 *	72.58	15.00	5.24
	SD	12.564	70.911	28.239	23.264	1.759	4.645	3.317	0.537

* P<0.05 compare to HFD-C by T-test

시료투여 완료 후 부검을 통하여 간조직에 대한 병리조직학적 분석을 실시함. 고정된 간조직을 파라핀으로 포매 후 4.5um로 박절한 다음 HE 염색을 실시하였음. 광학현미경관찰을 통하여 NASH(non-alcoholic seato-hepatitis) scoring 을 실시한 결과 P9071을 투여한 실험군에서 유의적으로 감소하였음.

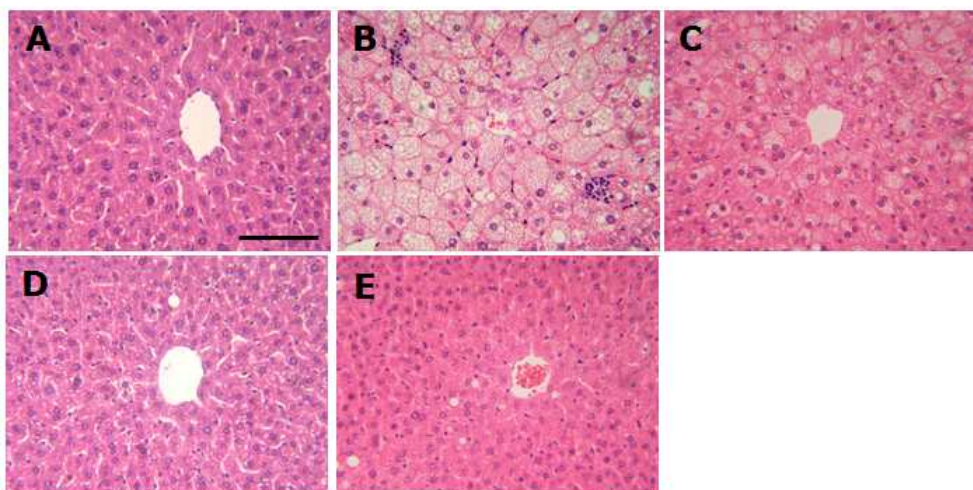


Figure 3-28. Representative picture of liver tissues of P9071 treatment for 8 weeks. A; Normal control group, B; High fat diet (HFD) group, C; Sibutramine (10mg/kg, sid.), D; Orlistat(40mg/kg, bid.), E; P9071 (1000mg/kg, bid.). Magnification X200, bar means 100um

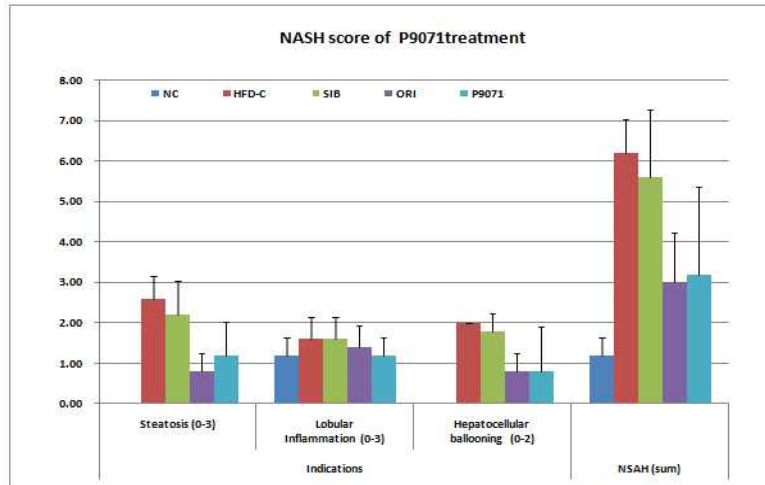


Figure 3-29. NASH score of P9071 treatment. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; sibutramine 10mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40mg/kg, bid. All samples treated per oral.

용량결정실험의 수행 : P9071소재를 저용량 및 고용량 두 용량을 설정하여 각각 투여하여 체중 변화를 관찰하였음. 8주 투여 기간 동안 두 가지 용량에 의한 체중변화는 유의한 차이를 보이지 않았으나 두 가지 용량 투여군 모두에서 고지방 투여군에 비하여 유의적으로 감소된 체중변화를 관찰하였음. 두 용량 군 모두 DIO mice에서 동등한 효능을 나타내는 것으로 보아 저용량 투여 시에도 효능을 나타내기에 충분한 것으로 나타났음.

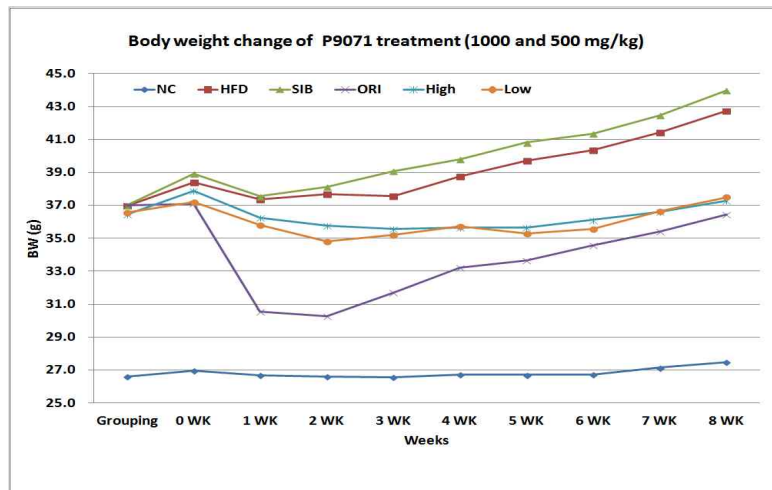


Figure 3-30. Body weight change of P9071 High and low dosages.

② UG0602

8주간 60% 고지방 식이(Harlan, TD06414)로 비만을 유도한 마우스에 UG0602를 8주간 경구 투여 한 결과 체중이 유의적으로 감소됨을 관찰하였음.

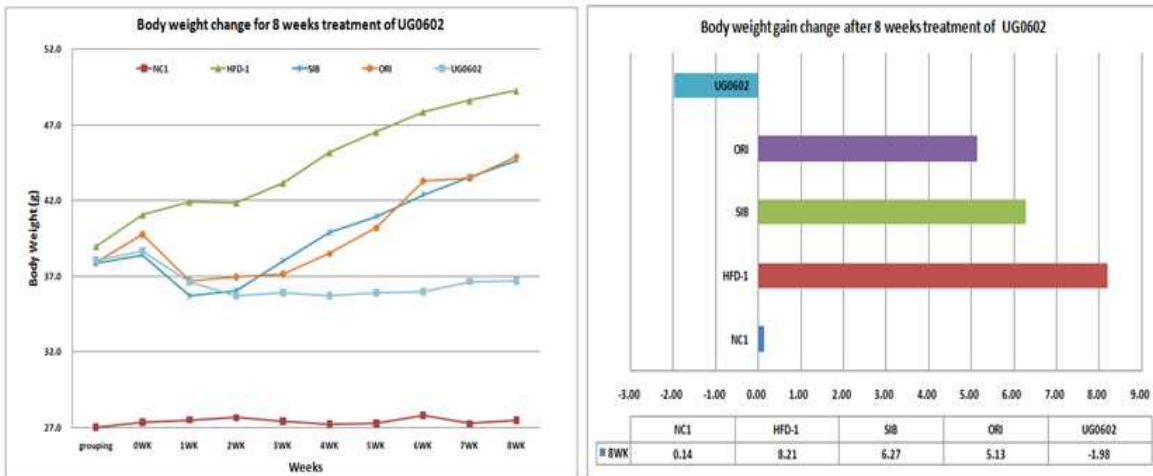


Figure 3-31. Body weight change for 8 weeks treatment of UG0602. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; sibutramine 10mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40mg/kg, bid. All samples treated per oral.

시료투여 완료 후 부검을 통하여 각 지방조직을 적출하고 무게를 측정하였음. UG0602 투여군에서 대조군 및 대조약인 Sibutramine 및 Orlistat 투여군에 비하여 지방조직의 무게가 감소되었음.

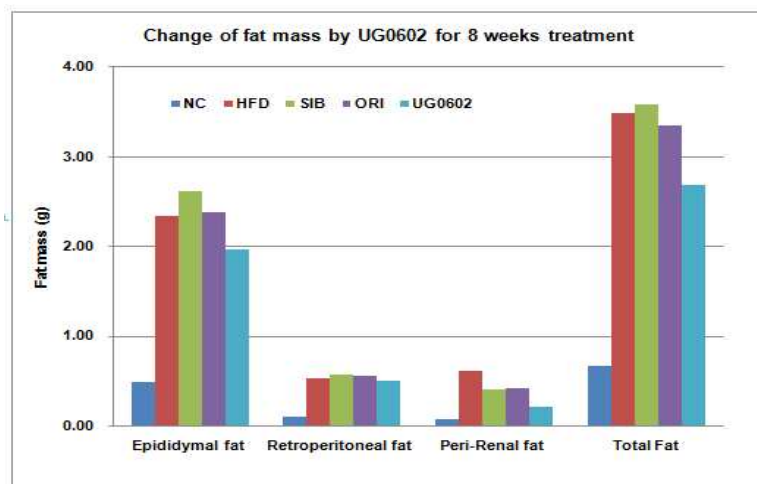


Figure 3-32. Change of fat mass by UG0602 treatment for 8 weeks. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; sibutramine 10mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40mg/kg, bid. All samples treated per oral.

시료 투여 완료 후 혈액을 채취하여 간기능 지표 (ALT, AST, ALP 및 TP) 와 지질 관련 지표 (T-Chol, LDL-C, HDL-C 및 TG) 에 대한 혈액분석을 실시한 결과 UG0602를 투여한 군에서 전체지표 값이 감소하였음.

Table 3-7. Blood chemistry results of UG0602 treatment for 8 weeks.

Blood chemistry result of UG0602 treatment

Group		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	T-chol (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	TG (mg/dL)	TP (g/dL)
NC (n=5)	Mean	15.30 *	49.96 *	264.62 *	89.60 *	7.04	42.58 *	22.00 *	5.04 *
	SD	1.681	11.397	62.455	9.659	2.304	6.308	7.071	0.114
HFD-C (n=4)	Mean	122.80	109.35	181.20	213.25	10.13	69.50	37.00	5.40
	SD	32.072	21.880	11.240	21.639	2.617	3.061	9.487	0.294
SIB (n=5)	Mean	67.24	84.46	156.68	158.60 *	5.26 *	64.78 *	46.60	5.04
	SD	42.203	20.835	45.995	5.030	1.389	2.901	15.126	0.167
ORI (n=5)	Mean	42.60 *	90.80	182.06	182.40 *	7.42	78.34 *	41.20	5.14
	SD	13.607	48.001	23.471	12.482	1.593	5.176	16.514	0.279
UG0602 (n=5)	Mean	38.74 *	57.44 *	107.50 *	160.40 *	5.96 *	72.12	29.60	4.84 *
	SD	8.22	12.39	43.67	15.19	0.87	2.91	12.78	0.05

* P<0.05 compare to HFD-C by T-test

시료투여 완료 후 부검을 통하여 간조직에 대한 병리조직학적 분석을 실시하였음. 고정된 간조직을 파라핀으로 포매 후 4.5 um로 박절한 다음 HE 염색을 실시하였음. 광학현미경관찰을 통하여 NASH(non-alcoholic seato-hepatitis) scoring 을 실시한 결과 UG0602 을 투여한 실험군에서 유의적으로 감소하였음.

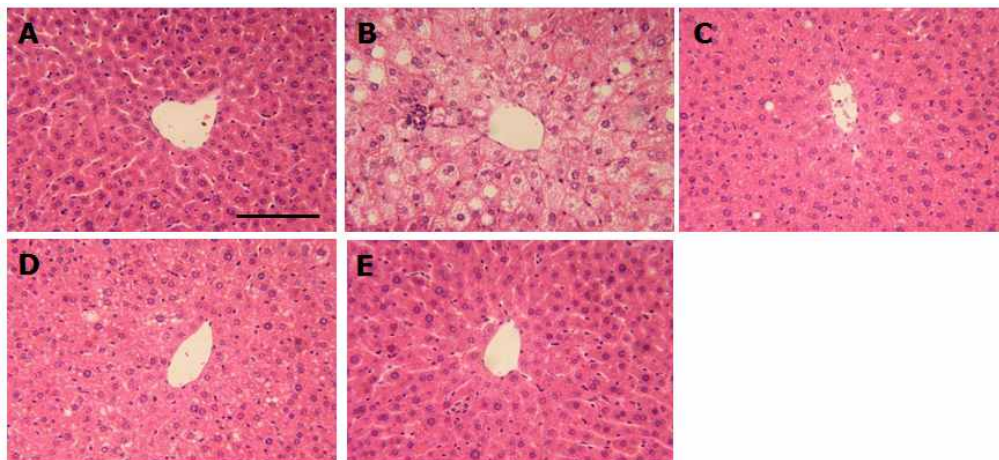


Figure 3-33. Representative picture of liver tissues of UG0602 treatment for 8 weeks. A; Normal control group, B; High fat diet (HFD) group, C; Sibutramine (10mg/kg, sid.), D; Orlistat(40mg/kg, bid.), E; UG0602 (250 mg/kg, bid.). Magnification X200, bar means 100um

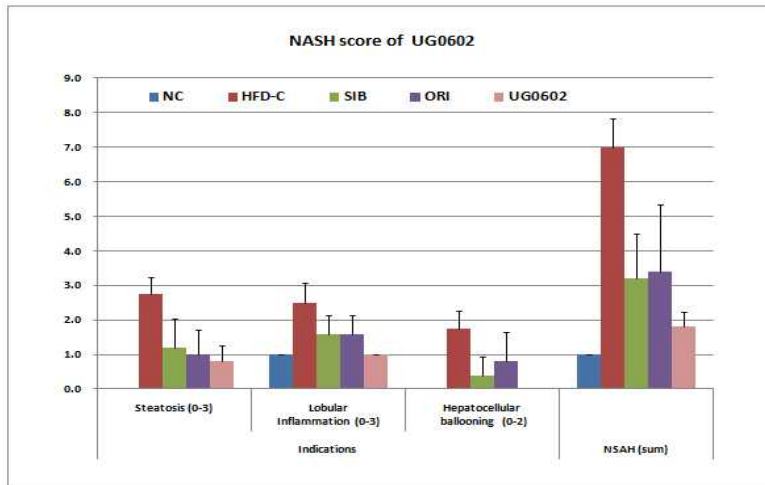


Figure 3-34. NASH score of UG0602 treatment. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; sibutramine 10mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40mg/kg, bid. All samples treated per oral.

③ UP438

8주간 60% 고지방 식이(Harlan, TD06414)로 비만유도한 마우스에 UP438을 5주간 경구투여 한 결과 체중이 대조군에 비하여 유의적으로 감소하였음.

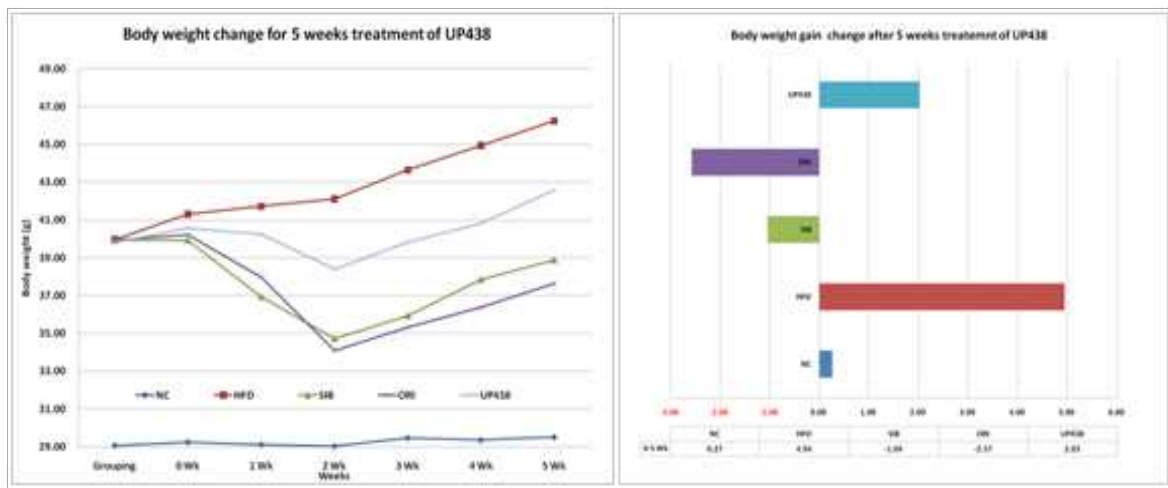


Figure 3-35. Body weight change for 5 weeks treatment of UP438. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; sibutramine 10mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40mg/kg, bid. All samples treated per oral.

④ P01999

8주간 60% 고지방 식이(Harlan, TD06414)로 비만유도한 마우스에 P01999 8주간 경구투여 한 결과 체중이 유의적으로 감소됨을 관찰하였음. 총 8주간 치료 투여기간 동안의 증체량(body weight gain) 또한 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였음.

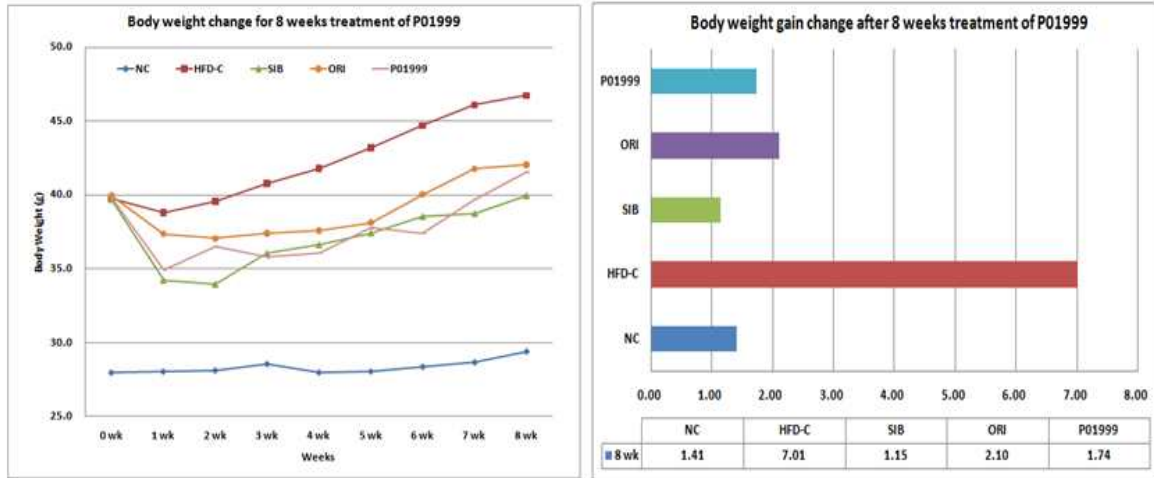


Figure 3-36. Body weight change for 8 weeks treatment of P01999. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; sibutramine 10mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40mg/kg, bid. All samples treated per oral.

시료 투여 완료 후 혈액을 채취하여 간기능 지표 (ALT, AST, ALP 및 TP) 와 지질 관련 지표 (T-Chol, LDL-C, HDL-C 및 TG) 에 대한 혈액분석을 실시한 결과 P01999 를 투여한 군에서 T-CHOL 및 LDL-C 의 유의적인 감소가 관찰되었음.

Table 3-8. Blood chemistry results of P01999 treatment for 8 weeks.

Group		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	T-chol (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	TG (mg/dL)	TP (g/dL)
NC (n=5)	Mean	13.78	45.56	245.80 *	120.40 *	8.10 *	60.08	33.00	5.22
	SD	1.171	1.137	21.257	10.431	1.140	4.609	12.062	0.179
HFD-C (n=5)	Mean	78.62	87.84	148.40	192.00	11.42	70.78	48.40	4.90
	SD	54.749	38.225	25.617	32.458	2.853	9.671	13.777	0.361
SIB (n=5)	Mean	37.00	65.95	166.45	155.75	6.18 *	68.73	49.75	4.80
	SD	34.273	19.436	24.707	53.786	2.636	15.400	16.091	0.392
ORI (n=5)	Mean	40.42	67.96	201.88 *	184.40	6.78 *	78.52	143.60	5.04
	SD	23.183	14.479	33.134	22.030	0.976	5.498	102.878	0.114
P01999 (n=5)	Mean	34.34	55.60	156.76	182.60	5.42 *	108.30	34.40	4.94
	SD	11.243	6.784	11.512	8.905	0.672	51.059	14.029	0.134

* P<0.05 compare to HFD-C by T-test

시료투여 완료 후 부검을 통하여 간조직에 대한 병리조직학적 분석을 실시하였음. 고정된 간조직을 파라핀으로 포매 후 4.5 um로 박절한 다음 HE 염색을 실시하였음. 광학현미경관찰을 통하여 NASH(non-alcoholic seato-hepatitis) scoring 을 실시한 결과 P01999을 투여한 실험군에서 유의적으로 감소하였음.

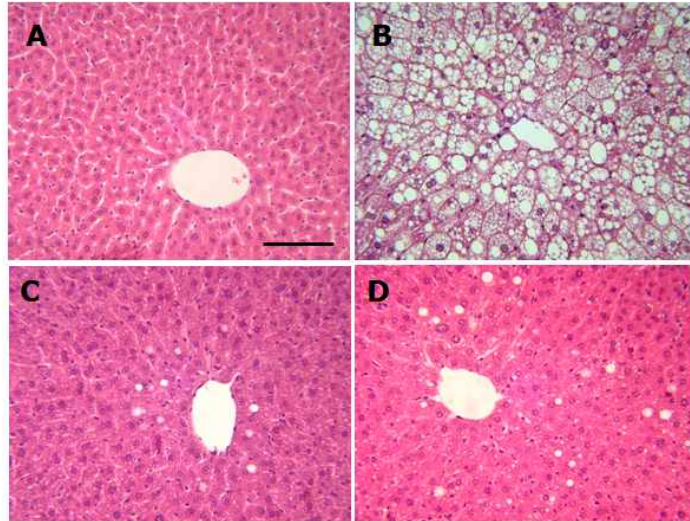


Figure 3-37. Representative picture of liver tissues of P01999 treatment for 8 weeks. A; Normal control group, B; High fat diet (HFD) group, C; Sibutramine (10mg/kg, sid.), D; P01999 (1000mg/kg, bid.). Magnification X200, bar means 100um

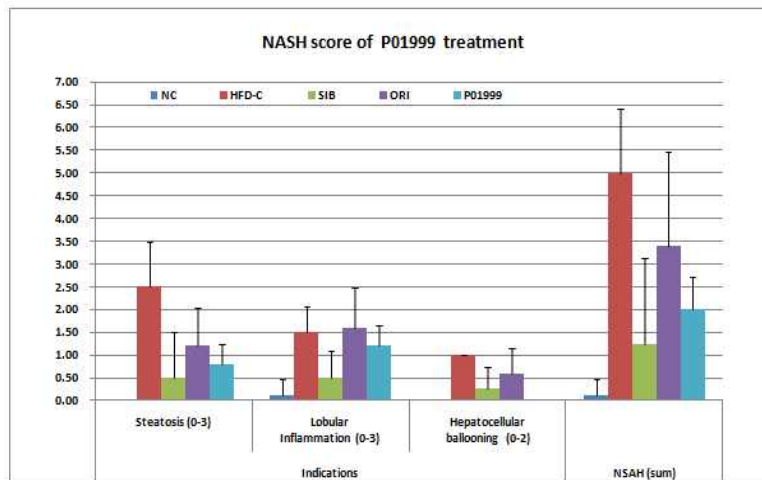


Figure 3-38. NASH score of P01999 treatment. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; sibutramine 10mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40mg/kg, bid. All samples treated per oral.

(나) 복합기전을 가지는 혼합소재 개발을 위한 효능 연구.

복합기전을 가진 소재 개발을 위하여 각각의 스크리닝 연구에서 도출된 전임상 후보물질들의 2 가지 또는 3가지 소재 혼합물에 대한 효능 연구를 실시하였음.

① 2COM-W12S4, 2COM-W12S5

8주간 60% 고지방 식이(Harlan, TD06414)로 비만을 유도한 마우스에 2가지 소재 혼합물 2COM-W12S4 (600 mg/kg/day, oral, bid) 및 2COM-W12S5 (550 mg/kg/day, oral, bid) 를 6 주간 경구투여 한 결과 2COM-W12S5를 투여한 군의 체중증가가 유의적으로 감소됨을 관찰하

였음.

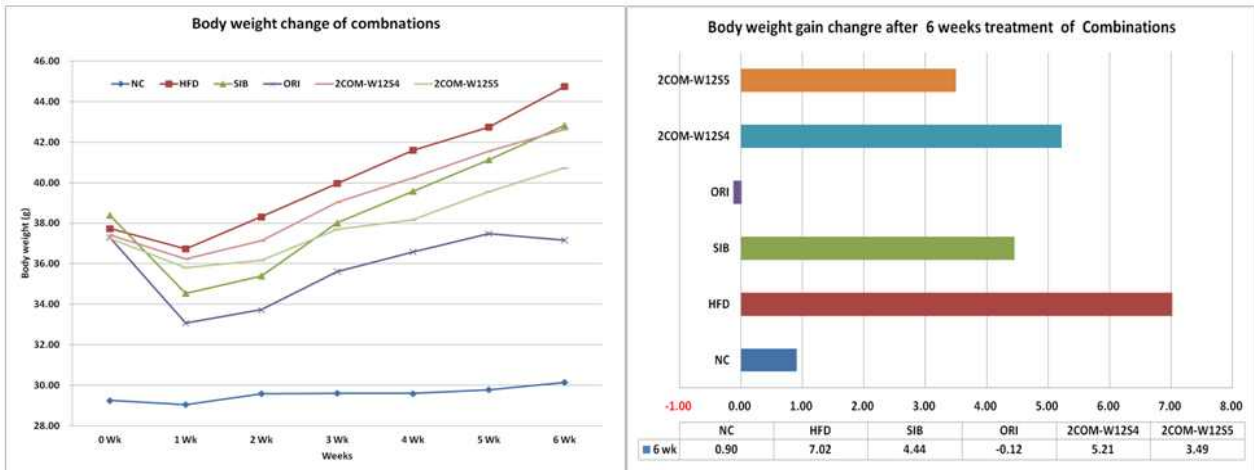


Figure 3-39. Body weight change for 6 weeks treatment of 2COM-W12S4 and 2COM-W12S5. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; Sibutramine 10 mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40 mg/kg, bid. All samples treated per oral.

전 투여기간에 걸친 체중 증가 및 사료 섭취량을 측정하여 FER 를 도출하였음. 실험 결과 2COM-W12S5 투여 군의 FER 이 유의성 있게 감소하였음. 또한 부검을 실시하여 각 지방조직을 적출하고 무게를 측정한 결과 또한 2COM-W12S5 투여군의 지방조직 무게가 유의성 있게 감소하였음.

Table 3-9. Result of FER at COM-W12S4 and 2COM-W12S5 treatment.

Group		Body weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	FER (Food efficiency ratio)
NC	Mean	0.021	3.442	0.006
	SD	0.021	0.274	0.006
	p value	0.0000	0.3363	0.0000
HFD	Mean	0.167	3.273	0.051
	SD	0.064	0.938	0.019
	p value	0.1122	0.0238	0.2659
SIB	Mean	0.106	2.827	0.037
	SD	0.058	0.759	0.021
	p value	0.1122	0.0238	0.2659
ORI	Mean	-0.003	3.175	-0.001
	SD	0.038	0.615	0.012
	p value	0.0002	0.6174	0.0002
2COM-W12S4	Mean	0.124	2.957	0.042
	SD	0.068	0.743	0.023
	p value	0.2836	0.1338	0.4765
2COM-W12S5	Mean	0.083	2.717	0.031
	SD	0.030	1.255	0.011
	p value	0.0150	0.0456	0.0484

FER(Food efficiency ratio)=Body weight gain(g/day)/Food intake(g/day)

p value : compare to HFD by t-test

Table 3-10. Result of absolute organ weight at COM-W12S4 and 2COM-W12S5 treatment.

Group		BW	Liver	Epididymal fat	Retroperitoneal fat	Peri-Renal fat	Total Fat ¹⁾
Normal Control	Mean	27.47	1.01	0.54	0.13	0.08	0.75
	STD	1.942	0.080	0.222	0.064	0.029	0.312
	p value	0.000	0.074	0.000	0.000	0.001	0.000
HFD Control	Mean	42.83	1.30	2.95	0.72	0.43	4.10
	STD	4.138	0.323	0.278	0.082	0.130	0.396
	p value						
SIB	Mean	40.54	1.43	2.59	0.61	0.40	3.61
	STD	4.074	0.428	0.644	0.172	0.195	0.813
	p value	0.356	0.583	0.241	0.209	0.815	0.218
ORI	Mean	35.31	0.99	1.78	0.48	0.22	2.47
	STD	2.942	0.122	0.318	0.091	0.082	0.439
	p value	0.005	0.051	0.000	0.001	0.008	0.000
2COM-W12S4	Mean	41.17	1.26	2.52	0.64	0.35	3.51
	STD	4.387	0.301	0.849	0.173	0.148	1.111
	p value	0.516	0.795	0.286	0.351	0.336	0.268
2COM-W12S5	Mean	39.45	1.14	2.56	0.68	0.31	3.55
	STD	3.408	0.106	0.239	0.043	0.066	0.285
	p value	0.154	0.290	0.027	0.300	0.076	0.020

1) Total fat is sum of the three fat pads(epididymal, retroperitoneal and perirenal fat)

*P<0.05 vs. HFD-C

부검 시 적출된 간조직에 대한 병리조직학적 분석을 실시하였음. 고정된 간조직을 파라핀으로 포매 후 4.5 μ m로 박절한 다음 HE 염색을 실시하였음. HFD 군의 경우 대부분 과도한 지방이 간에 침착되어 심한 지방간 소견을 보이는 것이 일반적임. 광학현미경관찰을 통하여 NASH(non-alcoholic seato-hepatitis) scoring 을 실시하여 치료투여에 의한 지방간 개선 정도를 측정 한 결과 2COM-W12S5을 투여한 실험군에서 유의적으로 감소하였음.

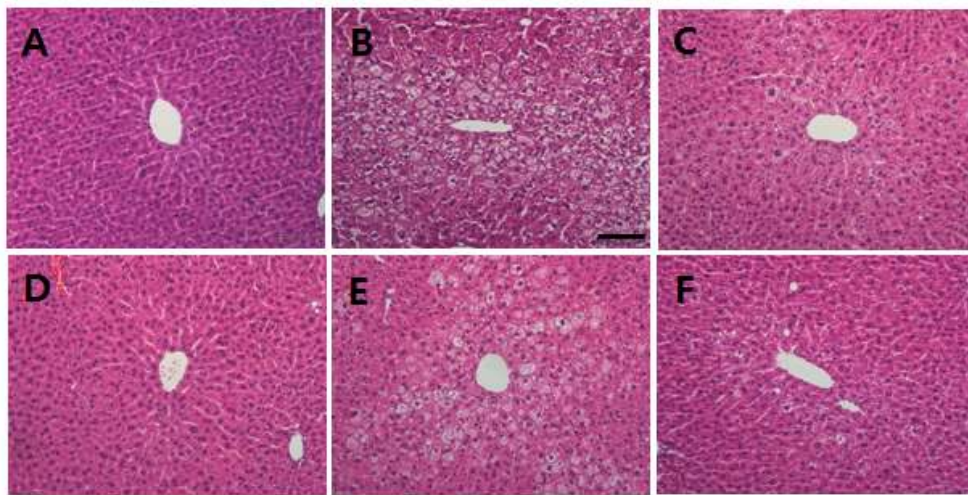


Figure 3-40. Representative picture of liver tissues of COM-W12S4 and 2COM-W12S5 treatment for 6 weeks. A; Normal control group, B; High fat diet (HFD) group, C; Sibutramine (10 mg/kg, sid.), D; Orlistat (40 mg/kg, bid.), E; COM-W12S4 (600 mg/kg/day, bid.), F; COM-W12S5 (550 mg/kg/day, bid). Magnification X200, bar means 100 μ m.

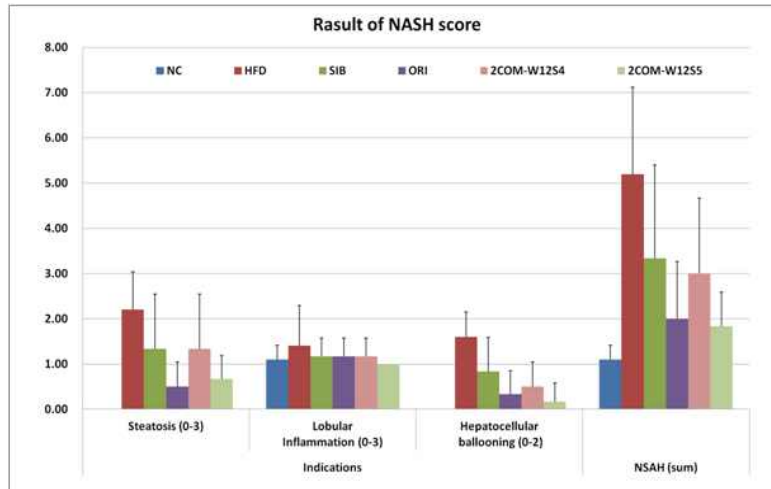


Figure 3-41. Result of NASH score at COM-W12S4 and 2COM-W12S5 treatment for 6 weeks. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; Sibutramine 10 mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40 mg/kg, bid. All samples treated per oral.

② 2COM-W14S2, 2COM-W14S3

8주간 60% 고지방 식이(Harlan, TD06414)로 비만을 유도한 마우스에 2가지 소재 혼합물 2COM-W14S2 (600 mg/kg/day, oral, bid) 및 2COM-W14S3 (700 mg/kg/day, oral, bid)를 7주간 경구투여 한 결과 2COM-W14S3를 투여한 군의 체중증가가 유의적으로 감소됨을 관찰하였음.



Figure 3-42. Body weight change for 7 weeks treatment of 2COM-W14S2 and 2COM-W14S3.

NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; Sibutramine 10 mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40 mg/kg, bid. All samples treated per oral.

전 투여기간에 걸친 체중 증가 및 사료 섭취량을 측정하여 FER를 도출하였음. 실험 결과 2COM-W14S3 투여 군의 FER 이 유의성 있게 감소하였음. 또한 부검을 실시하여 각 지방조직을 적출하고 무게를 측정한 결과 2COM-W14S3 투여군의 지방조직 무게가 유의성 있게 감

소하였음.

Table 3-11. Result of FER at 2COM-W14S2 and 2COM-W14S3 treatment.

Group		Body weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	FER (Food efficiency ratio)
NC	Mean	0.023	3.046	0.007
	SD	0.017	0.188	0.006
	<i>p</i> value	0.0005	0.0000	0.0003
HFD	Mean	0.125	2.376	0.053
	SD	0.040	0.400	0.017
	<i>p</i> value	0.7494	0.0347	0.4096
SIB	Mean	0.117	2.626	0.045
	SD	0.038	0.431	0.014
	<i>p</i> value	0.7494	0.0347	0.4096
ORI	Mean	0.012	2.711	0.005
	SD	0.032	0.456	0.012
	<i>p</i> value	0.0003	0.0069	0.0002
2COM-W14S2	Mean	0.076	2.310	0.033
	SD	0.050	0.280	0.023
	<i>p</i> value	0.0700	0.4962	0.0860
2COM-W14S3	Mean	-0.014	2.180	-0.006
	SD	0.050	0.474	0.023
	<i>p</i> value	0.0003	0.1126	0.0005

FER(Feed efficacy ratio)=Body weight gain(g/day)/Food intake(g/day)
p value : compare to HFD by t-test

Table 3-12. Result of absolute organ weight at 2COM-W14S2 and 2COM-W14S3 treatment.

Group		BW	Liver	Epididymal fat	Retroperitoneal fat	Peri-Renal fat	Total Fat
Normal Control	Mean	27.84	0.98	0.51	0.11	0.08	0.70
	STD	2.769	0.143	0.159	0.059	0.026	0.242
	<i>p</i> value	0.000	0.008	0.002	0.000	0.000	0.000
HFD Contorol	Mean	45.89	1.66	2.12	0.53	0.58	3.23
	STD	2.010	0.423	0.727	0.108	0.127	0.768
	<i>p</i> value	0.466	0.679	0.952	0.806	0.542	0.945
SIB	Mean	45.05	1.76	2.15	0.51	0.54	3.20
	STD	1.826	0.410	0.642	0.157	0.064	0.777
	<i>p</i> value	0.466	0.679	0.952	0.806	0.542	0.945
ORI	Mean	40.91	1.25	2.08	0.50	0.43	3.01
	STD	4.436	0.328	0.354	0.043	0.186	0.447
	<i>p</i> value	0.031	0.089	0.905	0.546	0.137	0.560
2COM-W14S2	Mean	44.48	1.92	2.50	0.57	0.52	3.58
	STD	5.258	0.832	0.425	0.070	0.187	0.462
	<i>p</i> value	0.551	0.505	0.298	0.447	0.507	0.354
2COM-W14S3	Mean	40.59	1.52	2.34	0.61	0.40	3.35
	STD	4.537	0.542	0.494	0.065	0.152	0.458
	<i>p</i> value	0.026	0.622	0.555	0.139	0.048	0.750

1) Total fat is sum of the three fat pads(epididymal, retroperitoneal and perirenal fat)
 *P<0.05 vs. HFD-C

부검 시 적출된 간 조직에 대한 병리조직학적 분석을 실시하였음. 고정된 간 조직을 파라핀으로 포매 후 4.5 μm로 박절한 다음 HE 염색을 실시하였음. HFD 군의 경우 대부분 과도한 지

방이 간에 침작되어 심한 지방간 소견을 보이는 것이 일반적임. 광학현미경관찰을 통하여 NASH (non-alcoholic seato-hepatitis) scoring 을 실시하여 시료투여에 의한 지방간 개선 정도를 측정 한 결과 2COM-W14S3을 투여한 실험군에서 NASH score 가 감소하는 경향을 보 였음.

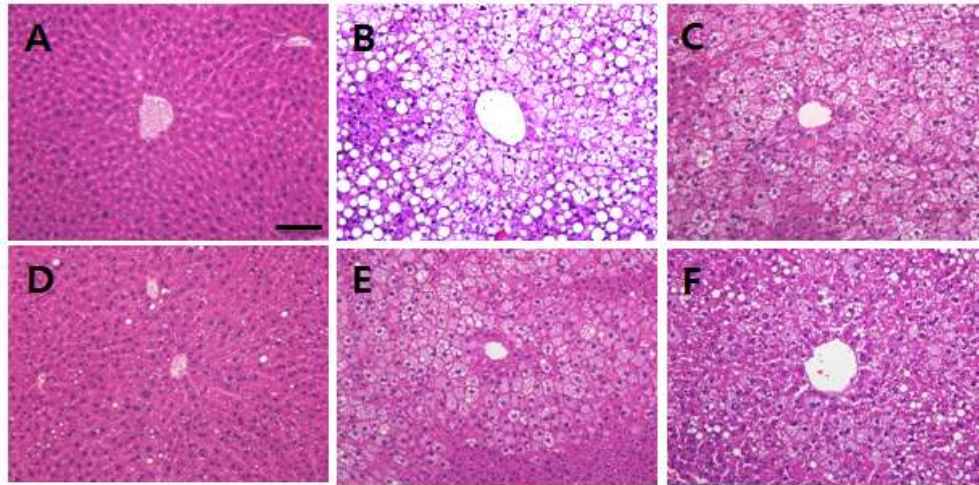


Figure 3-43. Representative picture of liver tissues of 2COM-W14S2 and 2COM-W14S3 treatment for 7 weeks. A; Normal control group, B; High fat diet (HFD) group, C; Sibutramine (10 mg/kg, sid.), D; Orlistat(40 mg/kg, bid.), E; COM-W14S2 (600 mg/kg/day, bid.), F; COM-W14S3 (700 mg/kg/day, bid). Magnification X200, bar means 100 μ m

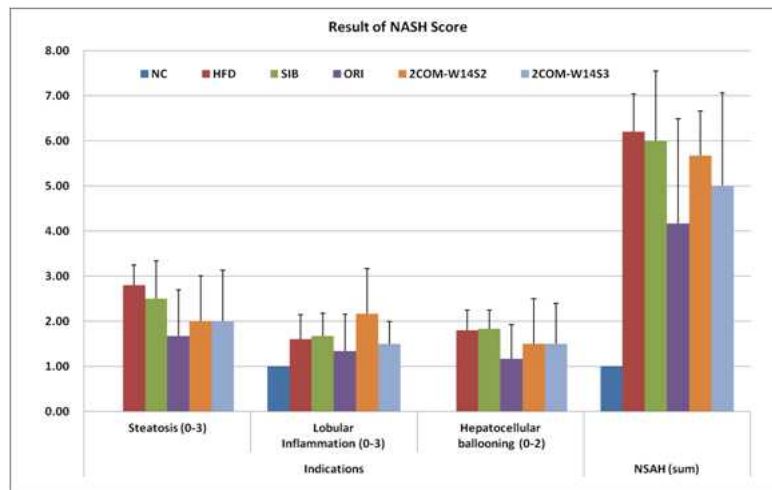


Figure 3-44. Result of NASH score at 2COM-W14S2 and 2COM-W14S3 treatment for 7 weeks. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; Sibutramine 10 mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40 mg/kg, bid. All samples treated per oral.

③ 3COM-W11S1, 3COM-W11S2, 3COM-W11S3, 3COM-W11S4

8주간 60% 고지방 식이 (Harlan, TD06414)로 비만을 유도한 마우스에 3 가지 소재 혼합물 3COM-W11S1 (800 mg/kg/day, oral, bid), 3COM-W11S2 (1100 mg/kg/day, oral, bid), 3COM-W11S3 (800 mg/kg/day, oral, bid), 3COM-W11S4 (1200 mg/kg/day, oral, bid)를 8 주

간 경구투여 한 결과 전체 투여군의 체중증가가 유의적으로 감소됨을 관찰하였음.

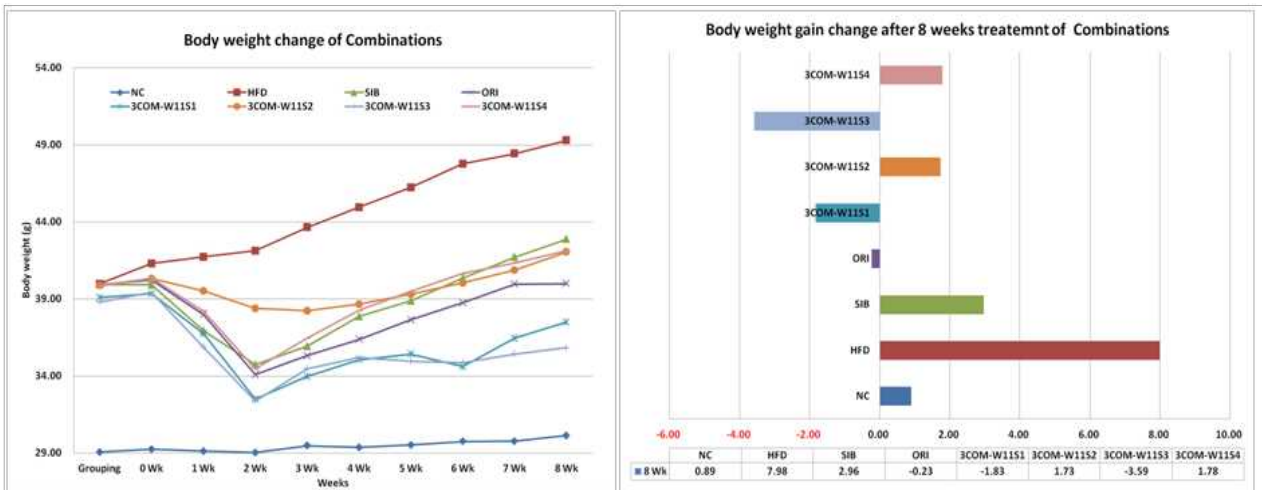


Figure 3-45. Body weight change for 6 weeks treatment of 3COM-W11S1, 3COM-W11S2, 3COM-W11S3 and 3COM-W11S4. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; Sibutramine 10 mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40 mg/kg, bid. All samples treated per oral.

전 투여기간에 걸친 체중 증가 및 사료 섭취량을 측정하여 FER 를 도출하였음. 실험 결과 전 투여군에서 FER이 유의성 있게 감소하였음. 또한 부검을 실시하여 각 지방조직을 적출하고 무게를 측정 한 결과 또한 투여군 전체에서 지방조직 무게가 유의성 있게 감소하였음.

Table 3-13. Result of FER at 3COM-W11S1, 3COM-W11S2, 3COM-W11S3 and 3COM-W11S4.

Group		Body weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	FER (Food efficiency ratio)
NC	Mean	0.017	3.181	0.005
	SD	0.011	0.906	0.003
	<i>p</i> value	0.0002	0.0202	0.0002
HFD	Mean	0.153	2.752	0.056
	SD	0.037	0.178	0.013
	<i>p</i> value	0.0004	0.3469	0.0005
SIB	Mean	0.057	2.629	0.022
	SD	0.026	0.673	0.010
	<i>p</i> value	0.0000	0.0000	0.0000
ORI	Mean	-0.004	3.147	-0.001
	SD	0.040	0.371	0.013
	<i>p</i> value	0.0000	0.0000	0.0000
3COM-W11S1	Mean	-0.035	2.700	-0.013
	SD	0.040	0.615	0.015
	<i>p</i> value	0.0000	0.6676	0.0000
3COM-W11S2	Mean	0.033	2.397	0.014
	SD	0.042	0.383	0.017
	<i>p</i> value	0.0003	0.0001	0.0009
3COM-W11S3	Mean	-0.069	2.391	-0.029
	SD	0.038	0.795	0.016
	<i>p</i> value	0.0003	0.0107	0.0009
3COM-W11S4	Mean	0.034	2.586	0.013
	SD	0.076	0.509	0.029
	<i>p</i> value	0.0000	0.1122	0.0000

FER(Feed efficacy ratio)=Body weight gain(g/day)/Food intake(g/day)
p value : compare to HFD by t-test

Table 3-14. Result of absolute organ weight at 3COM-W11S1, 3COM-W11S2, 3COM-W11S3 and 3COM-W11S4.

Group		BW	Liver	Epididymal fat	Retroperitoneal fat	Peri-Renal fat	Total Fat ¹⁾
Normal	Mean	27.81	1.07	0.46	0.11	0.06	0.63
	STD	1.370	0.062	0.126	0.042	0.017	0.181
	<i>p</i> value	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
HFD Control	Mean	47.48	2.11	2.30	0.57	0.68	3.56
	STD	2.295	0.368	0.400	0.090	0.141	0.454
	<i>p</i> value	0.023	0.020	0.902	0.764	0.011	0.428
SIB	Mean	41.67	1.51	2.34	0.56	0.39	3.29
	STD	4.758	0.384	0.520	0.082	0.180	0.673
	<i>p</i> value	0.0023	0.020	0.902	0.764	0.011	0.428
ORI	Mean	38.20	1.19	2.03	0.50	0.29	2.82
	STD	3.891	0.093	0.831	0.191	0.129	1.137
	<i>p</i> value	0.001	0.001	0.485	0.423	0.000	0.170
3COM-W11S1	Mean	36.86	1.38	2.12	0.56	0.25	2.92
	STD	1.691	0.026	0.411	0.147	0.063	0.603
	<i>p</i> value	0.000	0.005	0.473	0.797	0.000	0.077
3COM-W11S2	Mean	41.38	1.48	2.92	0.68	0.40	4.00
	STD	4.310	0.306	0.218	0.037	0.107	0.289
	<i>p</i> value	0.012	0.009	0.008	0.021	0.003	0.075
3COM-W11S3	Mean	35.04	1.27	1.71	0.46	0.21	2.38
	STD	2.700	0.091	0.464	0.152	0.048	0.657
	<i>p</i> value	0.000	0.002	0.063	0.175	0.000	0.009
3COM-W11S4	Mean	41.50	1.47	2.54	0.64	0.35	3.54
	STD	3.753	0.184	0.723	0.071	0.066	0.786
	<i>p</i> value	0.008	0.004	0.497	0.174	0.000	0.953

1) Total fat is sum of the three fat pads(epididymal, retroperitoneal and perirenal fat)
 *P<0.05 vs. HFD-C

부검 시 각 실험동물의 혈액을 채혈하여 혈청 내 각종 지질 프로파일 등에 대한 생화학적 분

석 및 적출된 간 조직에 대한 병리조직학적 검사를 실시하였음. 3COM-W11S1과 3COM-W11S2를 투여한 군에서는 TG (Triglyceride)가 유의하게 감소하였으며 3COM-W11S3과 3COM-W11S4를 투여한 군에서는 T-chol (Total cholesterol)이 유의하게 감소하였음. 다른 지질 프로파일 또한 HFD 대조군에 비하여 감소하는 경향을 나타내었음.

Table 3-15. Result of blood chemistry at 3COM-W11S1, 3COM-W11S2, 3COM-W11S3 and 3COM-W11S4.

Group		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Glu (mg/dL)	T-chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	TP (g/dL)	LDL-C (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)
Normal Control	Mean	16.83	39.58	182.23	147.50	107.50	25.00	5.18	3.50	61.95
	STD	1.037	0.330	34.032	13.077	7.047	1.155	0.150	0.548	3.347
	p value	0.072	0.046	0.062	0.000	0.010	0.073	0.100	0.050	0.010
HFD Control	Mean	88.83	97.80	235.03	347.00	229.75	38.50	5.65	10.13	75.05
	STD	52.704	35.293	31.025	42.237	42.883	9.983	0.465	4.200	6.251
	p value	0.116	0.163	0.013	0.068	0.024	0.134	0.037	0.047	0.089
SIB	Mean	31.40	65.35	158.25	260.25	158.50	28.50	4.90	4.43	68.15
	STD	9.032	3.911	31.631	65.759	20.809	5.802	0.316	1.815	2.723
	p value	0.011	0.163	0.013	0.068	0.024	0.134	0.037	0.047	0.089
ORI	Mean	23.03	51.40	177.35	269.17	155.83	88.33	5.08	4.28	75.57
	STD	6.720	8.052	13.486	46.232	23.558	32.222	0.172	0.770	5.837
	p value	0.087	0.076	0.003	0.027	0.007	0.019	0.024	0.067	0.897
3COM-W11S1	Mean	17.70	46.54	188.68	318.60	172.60	15.40	4.86	5.94	76.44
	STD	2.264	3.757	33.653	46.977	29.888	2.074	0.207	2.642	7.451
	p value	0.0737	0.0616	0.0715	0.3782	0.0500	0.0172	0.0109	0.1090	0.7746
3COM-W11S2	Mean	26.82	57.90	194.14	338.60	198.40	20.20	4.98	8.74	74.90
	STD	5.287	12.930	30.283	50.481	15.307	9.680	0.130	1.016	4.598
	p value	0.0995	0.0495	0.0867	0.7981	0.1677	0.0273	0.0596	0.5615	0.9679
3COM-W11S3	Mean	20.53	50.43	174.75	312.25	172.50	20.50	4.80	5.63	78.48
	STD	5.437	6.001	24.604	39.610	10.661	11.733	0.000	0.903	2.994
	p value	0.0802	0.0728	0.0227	0.2753	0.0411	0.0581	0.0107	0.1195	0.3612
3COM-W11S4	Mean	27.87	55.83	215.10	331.50	194.00	8.50	5.15	8.47	72.85
	STD	7.631	9.902	18.461	26.021	15.887	2.429	0.105	1.731	3.796
	p value	0.080	0.073	0.023	0.275	0.041	0.058	0.011	0.119	0.361

④ 3COM-W12S6, 3COM-W12S7

8주간 60% 고지방 식이 (Harlan, TD06414)로 비만을 유도한 마우스에 3 가지 소재 혼합물 3COM-W12S6 (600 mg/kg/day, oral, bid) 및 3COM-W12S7 (650 mg/kg/day, oral, bid)를 6 주간 경구투여 한 결과 3COM-W12S6을 투여한 군의 체중증가가 유의적으로 감소한 것으로 나타났음.

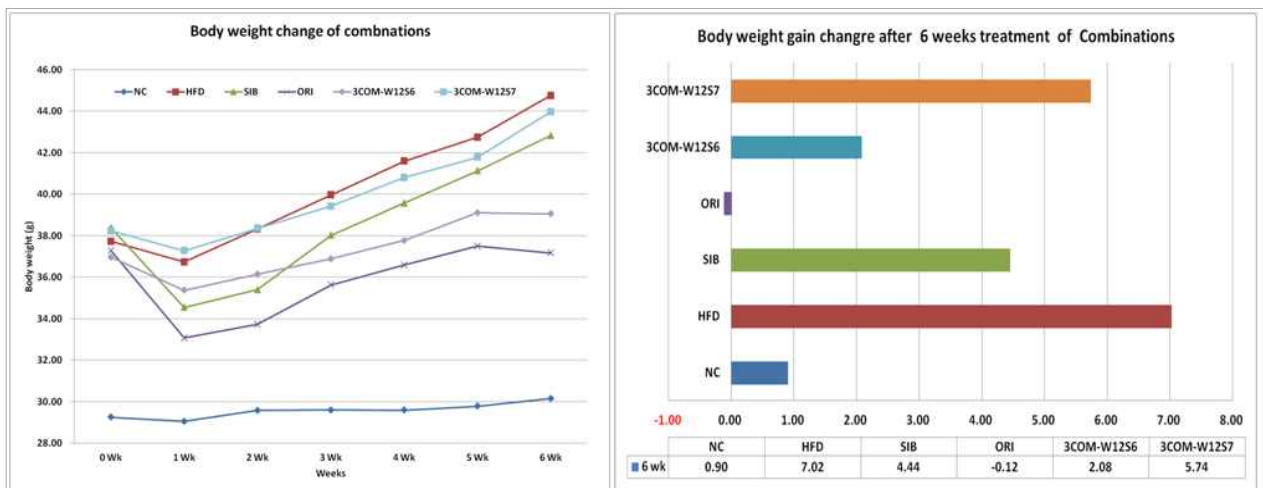


Figure 3-46. Body weight change for 6 weeks treatment of 3COM-W12S6 and 3COM-W12S7. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB;

Sibutramine 10 mg/kg, sid, ORL; Orlistat 40 mg/kg, bid. All samples treated per oral.

전 투여기간에 걸친 체중 증가 및 사료 섭취량을 측정하여 FER를 도출하였음. 실험 결과 3COM-W12S6 투여 군의 FER 이 유의성 있게 감소하였음. 또한 부검을 실시하여 각 지방조직을 적출하고 무게를 측정한 결과 또한 3COM-W12S6 투여군의 지방조직 무게가 유의성 있게 감소하였음.

Table 3-16. Result of FER at 3COM-W12S6 and 3COM-W12S7.

Group		Body weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	FER (Food efficiency ratio)
NC	Mean	0.021	3.442	0.006
	SD	0.021	0.274	0.006
	p value	0.0000	0.3363	0.0000
HFD	Mean	0.167	3.273	0.051
	SD	0.064	0.938	0.019
	p value	0.1122	0.0238	0.2659
SIB	Mean	0.106	2.827	0.037
	SD	0.058	0.759	0.021
	p value	0.0002	0.6174	0.0002
ORI	Mean	-0.003	3.175	-0.001
	SD	0.038	0.615	0.012
	p value	0.0002	0.6174	0.0002
3COM-W12S6	Mean	0.041	2.965	0.017
	SD	0.044	0.788	0.015
	p value	0.0025	0.1322	0.0099
3COM-W12S7	Mean	0.137	2.872	0.048
	SD	0.053	1.066	0.019
	p value	0.3894	0.1095	0.7569

FER(Food efficacy ratio)=Body weight gain(g/day)/Food intake(g/day)
p value : compare to HFD by t-test

Table 3-17. Result of absolute organ weight at 3COM-W12S6 and 3COM-W12S7 treatment.

Group		BW	Liver	Epididymal fat	Retroperitoneal fat	Peri-Renal fat	Total Fat ¹⁾
Normal Control	Mean	27.47	1.01	0.54	0.13	0.08	0.75
	STD	1.942	0.080	0.222	0.064	0.029	0.312
	p value	0.000	0.074	0.000	0.000	0.001	0.000
HFD Control	Mean	42.83	1.30	2.95	0.72	0.43	4.10
	STD	4.138	0.323	0.278	0.082	0.130	0.396
	p value	0.356	0.583	0.241	0.209	0.815	0.218
SIB	Mean	40.54	1.43	2.59	0.61	0.40	3.61
	STD	4.074	0.428	0.644	0.172	0.195	0.813
	p value	0.005	0.051	0.000	0.001	0.008	0.000
ORI	Mean	35.31	0.99	1.78	0.48	0.22	2.47
	STD	2.942	0.122	0.318	0.091	0.082	0.439
	p value	0.005	0.051	0.000	0.001	0.008	0.000
3COM-W12S6	Mean	35.68	1.18	1.71	0.50	0.20	2.41
	STD	5.186	0.159	0.897	0.232	0.095	1.188
	p value	0.025	0.415	0.018	0.069	0.007	0.016
3COM-W12S7	Mean	42.13	1.36	2.90	0.63	0.39	3.92
	STD	4.371	0.289	0.404	0.078	0.118	0.519
	p value	0.781	0.753	0.794	0.088	0.598	0.515

1) Total fat is sum of the three fat pads(epididymal, retroperitoneal and perirenal fat)

*P<0.05 vs. HFD-C

부검시 적출된 간 조직에 대한 병리조직학적 분석을 실시하였음. 고정된 간 조직을 파라핀으로 포매 후 4.5 μm 로 박절한 다음 HE 염색을 실시하였음. HFD 군의 경우 대부분 과도한 지방이 간에 침착되어 심한 지방간 소견을 보이는 것이 일반적임. 광학현미경관찰을 통하여 NASH (non-alcoholic seato-hepatitis) scoring 을 실시하여 시료 투여에 의한 지방간 개선 정도를 측정 한 결과 3COM-W12S6을 투여한 실험군에서 유의적으로 감소함을 관찰하였음.

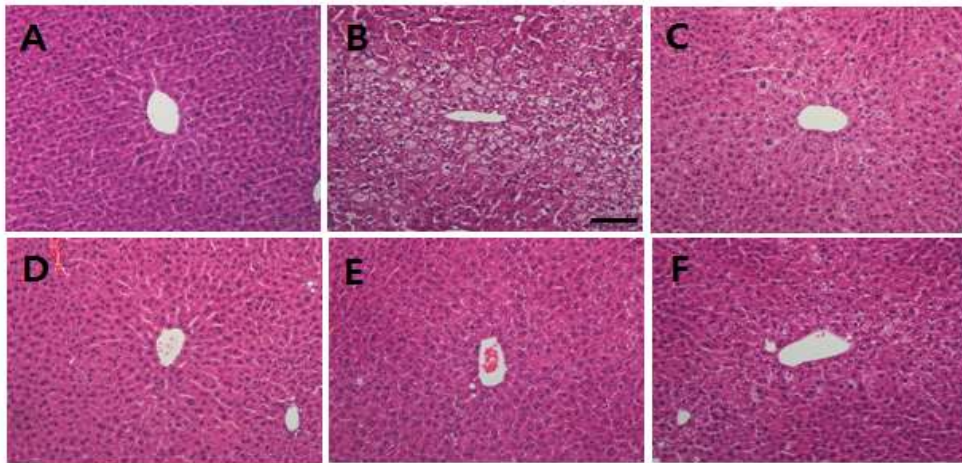


Figure 3-47. Representative picture of liver tissues of 3COM-W12S6 and 3COM-W12S7 treatment for 6 weeks. A; Normal control group, B; High fat diet (HFD) group, C; Sibutramine (10 mg/kg, sid.), D; Orlistat(40 mg/kg, bid.), E; 3COM-W12S6 (600 mg/kg/day, bid.), F; 3COM-W12S7 (650 mg/kg/day, bid). Magnification X200, bar means 100 μm

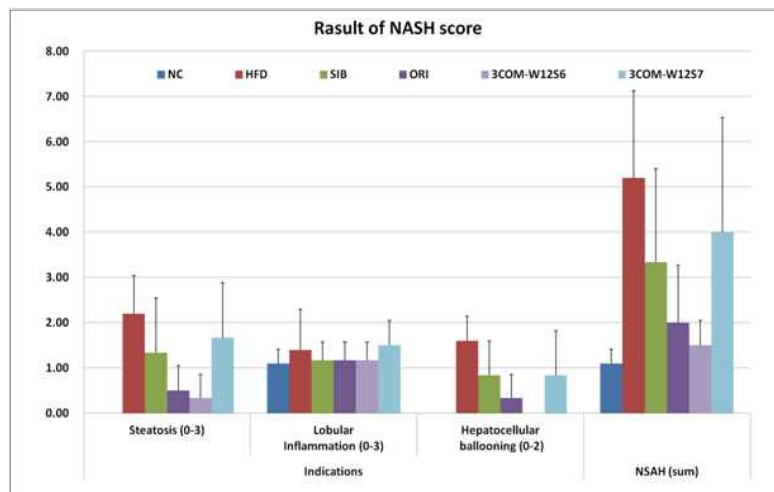


Figure 3-48. Result of NASH score at 3COM-W12S6 and 3COM-W12S7 treatment for 6 weeks. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; Sibutramine 10 mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40 mg/kg, bid. All samples treated per oral.

⑤ 3COM-W17S1

8주간 60% 고지방 식이 (Harlan, TD06414)로 비만을 유도한 마우스에 3 가지 소재 혼합물

3COM-W17S1을 두 개 용량군을 설정하여 투여함. 저용량군 (650 mg/kg/day, oral, bid) 및 고용량군 (1300 mg/kg/day, oral, bid)을 7 주간 경구투여 한 결과 저용량 및 고용량 투여군 전체에서 체중증가가 유의적으로 감소하였음.

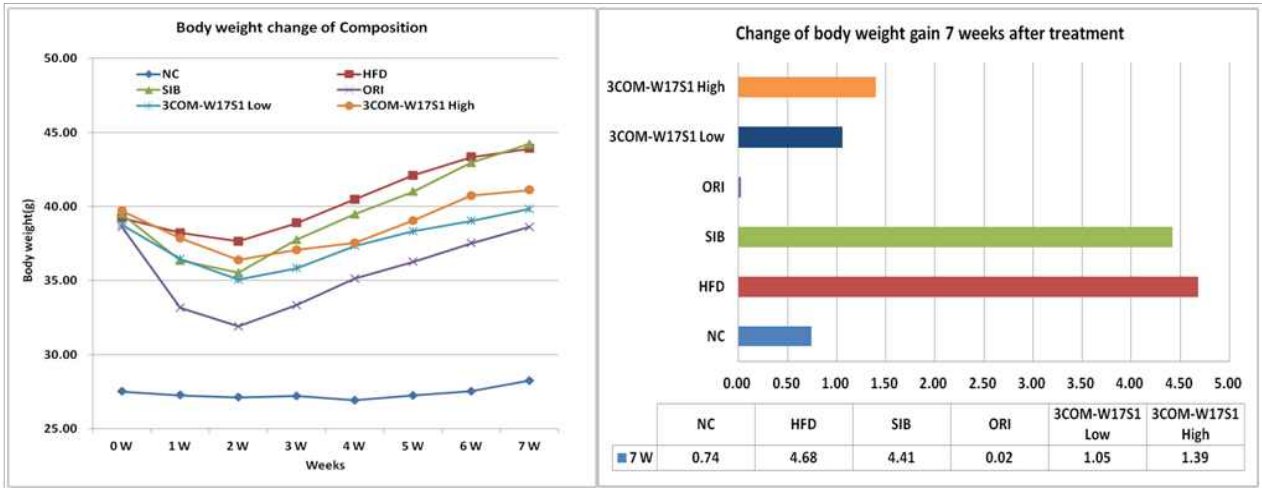


Figure 3-49. Body weight change for 6 weeks treatment of low and high dose of 3COM-W17S1. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; Sibutramine 10 mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40 mg/kg, bid. All samples treated per oral.

전 투여기간에 걸친 체중 증가 및 사료 섭취량을 측정하여 FER를 도출 하였음. 실험 결과 저용량 투여 군의 FER 이 유의성 있게 감소됨을 확인하였음.

Table 3-18. Result of FER at 3COM-W17S1, low and high dose treatment.

Group		Body weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	FER (Food efficiency ratio)
NC	Mean	0.016	3.401	0.005
	SD	0.016	0.556	0.005
	p value	0.0009	0.0000	0.0007
HFD	Mean	0.100	2.592	0.038
	SD	0.033	0.521	0.013
	p value	0.8333	0.0378	0.6176
SIB	Mean	0.094	2.817	0.033
	SD	0.040	0.854	0.014
	p value	0.8333	0.0378	0.6176
ORI	Mean	0.000	3.195	0.000
	SD	0.038	0.752	0.012
	p value	0.0010	0.0000	0.0007
3COM-W17S1 Low	Mean	0.022	2.617	0.009
	SD	0.070	0.754	0.027
	p value	0.0234	0.9052	0.0225
3COM-W17S1 High	Mean	0.030	2.315	0.013
	SD	0.066	0.618	0.028
	p value	0.0320	0.0004	0.0512

p value : compare to HFD by t-test

부검 시 각 실험동물의 혈액을 채혈하여 혈청 내 각종 지질 프로파일 등에 대한 생화학적 검

사를 실시하였음. 저용량 및 고용량 투여군 모두에서 TG가 유의하게 감소하였으며 저용량 군에서는 LDL-chol 또한 유의적인 감소를 보임. 다른 지질 프로파일 또한 HFD 대조군에 비하여 감소하는 경향을 나타내었음.

Table 3-19. Result of blood chemistry at 3COM-W17S1, low and high dose treatment.

Group		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Glu (mg/dL)	T-chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	TP	LDL-C (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)
NC	Mean	19.51	48.56	223.26	196.78	116.78	10.00	5.62	4.00	62.74
	SD	1.561	6.396	14.725	31.104	6.418	2.872	0.286	0.682	3.076
	p value	0.0277	0.0088	0.0007	0.0153	0.0016	0.0001	0.0624	0.0126	0.1600
HFD	Mean	51.32	87.77	148.67	234.70	181.70	33.10	5.28	8.23	67.86
	SD	38.335	37.269	47.590	30.159	46.466	10.816	0.437	4.300	10.217
	p value									
ORI	Mean	21.83	65.65	147.47	194.00	137.33	27.83	5.08	4.03	62.42
	SD	5.707	17.307	26.823	47.147	28.261	6.555	0.214	0.301	9.746
	p value	0.0389	0.1970	0.9559	0.0521	0.0543	0.3020	0.3241	0.0130	0.3121
3COM-W17S1 Low	Mean	20.69	59.44	171.17	283.33	150.14	12.67	4.84	5.00	61.70
	SD	6.722	12.564	36.850	40.928	39.418	5.007	0.404	1.243	12.104
	p value	0.0334	0.0462	0.3395	0.0160	0.1642	0.0007	0.0537	0.0473	0.2935
3COM-W17S1 High	Mean	23.61	52.74	164.63	286.71	170.00	8.43	5.04	6.13	69.86
	SD	6.923	4.977	41.181	32.973	39.383	1.988	0.360	1.652	12.294
	p value	0.0500	0.0158	0.4841	0.0042	0.5955	0.0000	0.2562	0.1848	0.7200

p value : compare to HFD by t-test

부검시 적출된 간 조직에 대한 병리조직학적 분석을 실시하였음. 고정된 간 조직을 파라핀으로 포매 후 4.5 μm 로 박절한 다음 HE 염색을 실시하였음. HFD 군의 경우 대부분 과도한 지방이 간에 침착되어 심한 지방간 소견을 보이는 것이 일반적임. 광학현미경관찰을 통하여 NASH (non-alcoholic seato-hepatitis) scoring 을 실시하여 시료투여에 의한 지방간 개선 정도를 측정 한 결과 3COM-W17S1 투여군에서 유의적으로 감소함을 관찰하였음.

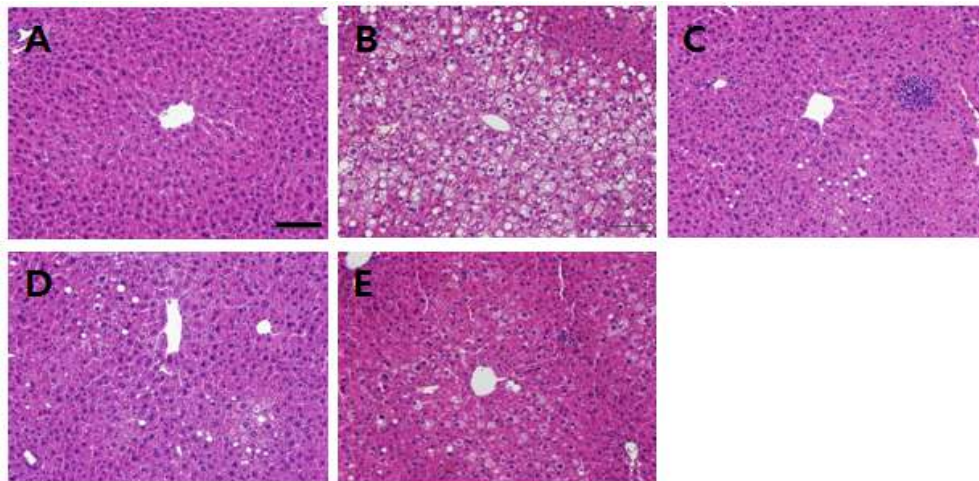


Figure 3-50. Representative picture of liver tissues of 3COM-W17S1, low and high dose treatment. A; Normal control group, B; High fat diet (HFD) group, C; Orlistat(40 mg/kg, bid.), D; 3COM-W17S1(650 mg/kg/day, bid.), D; 3COM-W17S1(1300 mg/kg/day, bid.). Magnification X200, bar means 100 μm .

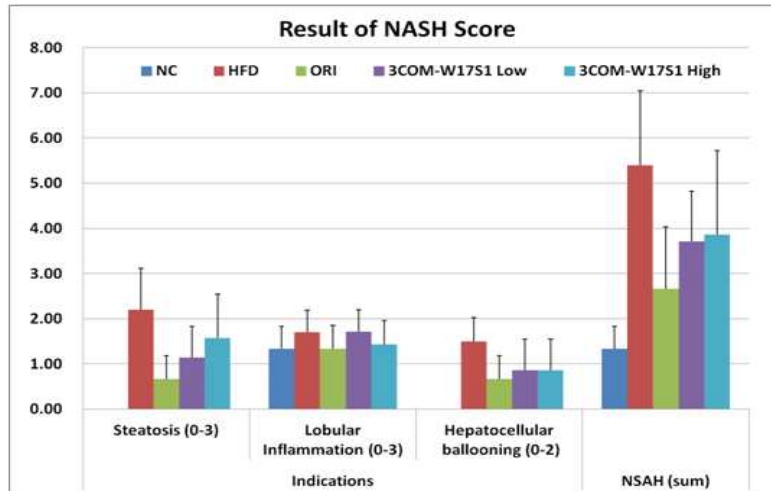


Figure 3-51. Result of NASH score at 3COM-W17S1, low and high dose treatment. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; Sibutramine 10 mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40 mg/kg, bid. All samples treated per oral.

⑥ 3COM-W18S1, 3COM-W18S2

8주간 60% 고지방 식이 (Harlan, TD06414)로 비만을 유도한 마우스에 3 가지 소재 혼합물 3COM-W18S1 (750, 1500 mg/kg/day, oral, bid)과 3COM-W18S2 (550, 100 mg/kg/day, oral, bid)를 두 개 용량군을 설정하여 투여하였음. 9 주간 경구투여 한 결과 전 투여군 에서 체중변화를 관찰하지 못하였음.

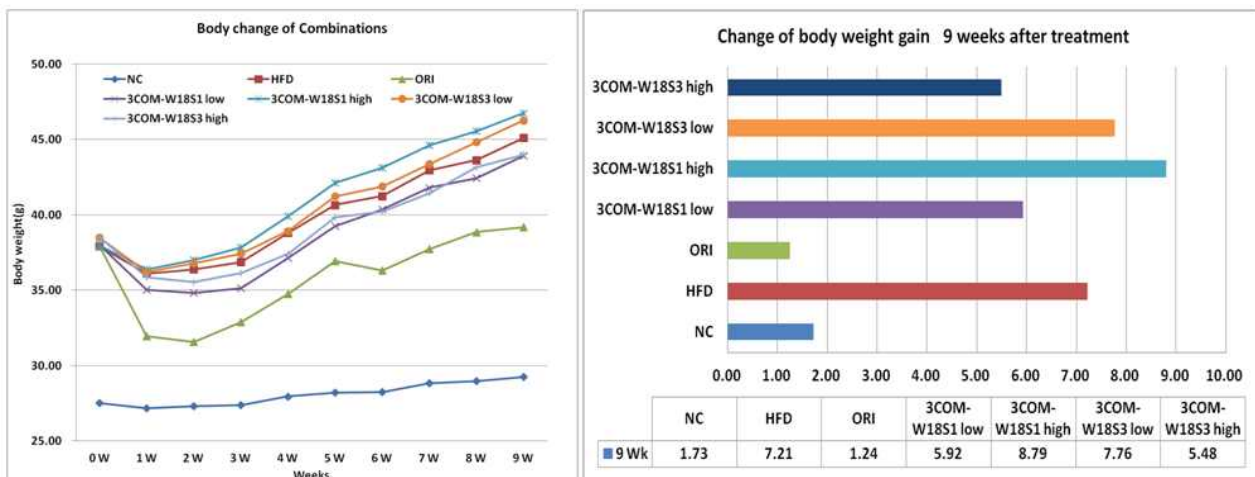


Figure 3-52. Body weight change for 6 weeks treatment of low and high dose of 3COM-W18S1 and 3COM-W18S2.. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, SIB; Sibutramine 10 mg/kg, sid, ORI; Orlistat 40 mg/kg, bid. All samples treated per oral.

(다) 임상시험 소재의 효능 확인 및 기전 연구

임상시험을 위한 소재 3COM-W17S1(UP601) 및 3COM-W17S5(UP603) 에 대한 효능 확인

시험을 실시하였으며 또한 작용기전 연구를 위하여 혈액내에서 ELISA 를 이용한 biomarker 를 측정하였음.

① 3COM-W17S1

DIO mice 에 임상시험 소재인 3COM-W17S1(UP601) 을 두 개 용량군을 설정하여 투여하였음. 저용량군 (650 mg/kg/day, oral, bid) 및 고용량군 (1300 mg/kg/day, oral, bid)을 7 주간 경구투여 한 결과 전 투여 동물에서 체중증가가 유의적이고 농도 의존적으로 감소한 것으로 나타났음.

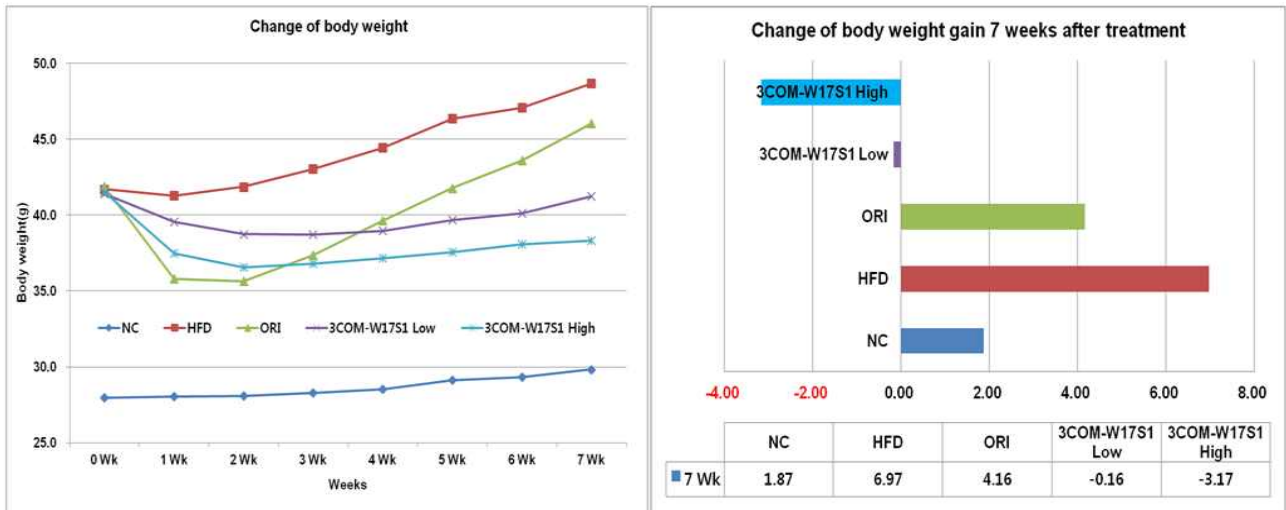


Figure 3-53. Body weight change for 7 weeks treatment of low and high dose of 3COM-W17S1. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, ORI; Orlistat 40 mg/kg, bid. All samples treated per oral.

전 투여기간에 걸친 체중 증가 및 사료 섭취량을 측정하여 FER를 산출하였음. 전 투여군에서 사료 섭취량이 유의하게 감소하였으며 또한 사료효율성도 감소하였음. 이는 임상시험물질 3CON-W17S1 이 DIO mice 의 식욕저하를 유발할 수 있으며 또한 과도한 열량을 섭취함에도 불구하고 체중증가로 나타나지 않음을 시사 함.

3Table 3-20. Result of FER at 3COM-W17S1, low and high dose treatment.

Group		Body weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	FER (Food efficiency ratio)
NC	Mean	0.038	3.305	0.012
	SD	0.015	0.485	0.005
	p value	0.0002	0.0000	0.0001
HFD	Mean	0.142	2.575	0.055
	SD	0.056	0.373	0.022
ORI	Mean	0.085	2.877	0.029
	SD	0.035	0.802	0.012
	p value	0.0131	0.0000	0.0042
3COM- W17S1 Low	Mean	-0.003	2.290	-0.001
	SD	0.045	0.465	0.020
	p value	0.0000	0.0000	0.0000
3COM- W17S1 High	Mean	-0.065	2.024	-0.032
	SD	0.058	0.593	0.028
	p value	0.0000	0.0000	0.0000

FER(Food efficacy ratio)=Body weight gain(g/day)/Food intake(g/day)
p value : compare to HFD by t-test

부검시 각 실험동물의 혈액을 채혈하여 혈청 내 각종 지질 프로파일 등에 대한 생화학적 검사를 실시하였음. 저용량 및 고용량 투여군 모두에서 간기능 지표가 향상됨을 나타내었고 지질 프로파일의 경우 Total cholesterol 및 LDL-chol 가 유의하게 감소하였으며 TG는 감소하는 경향을 나타내었음. 3CON-W17S1의 투여에 의하여 간기능 및 지질 프로파일이 개선되는 결과를 나타냄.

Table 3-21. Result of blood chemistry at 3COM-W17S1, low and high dose treatment.

Group		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Glu (mg/dL)	T-chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	TP (g/dL)	LDL-C (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)
NC	Mean	12.74	47.64	261.18	164.40	90.00	15.20	4.76	6.78	45.08
	STD	1.250	1.524	72.525	40.741	9.407	7.563	0.270	1.425	4.572
	p value	0.002	0.003	0.039	0.003	0.000	0.106	0.700	0.025	0.000
HFD	Mean	91.06	85.30	165.28	275.80	177.60	24.80	4.70	10.12	65.36
	STD	22.757	12.765	20.093	42.588	16.196	9.039	0.200	2.307	4.818
ORI	Mean	57.64	91.14	183.90	241.40	168.20	58.60	4.88	7.84	70.10
	STD	21.867	21.728	19.097	19.165	27.941	14.859	0.327	1.915	8.832
	p value	0.045	0.618	0.171	0.138	0.533	0.002	0.324	0.127	0.323
3COM-W17S1 Low	Mean	40.84	61.02	187.00	256.60	159.20	24.80	4.60	6.78	66.04
	STD	16.157	6.303	15.531	43.125	18.674	19.639	0.158	1.602	5.366
	p value	0.004	0.005	0.092	0.499	0.135	1.000	0.406	0.029	0.838
3COM-W17S1 High	Mean	36.76	64.84	178.12	198.40	136.00	18.60	4.38	4.52	62.72
	STD	8.792	10.162	16.059	25.284	29.017	8.503	0.164	1.674	8.568
	p value	0.001	0.023	0.297	0.008	0.023	0.296	0.025	0.002	0.565

간조직의 HE stain 슬라이드를 검경한 결과 HFD 군의 경우 대부분 과도한 지방이 간에 침착되어 심한 지방간 소견을 보이는 것이 일반적임. 광학현미경관찰을 통하여 NASH (non-alcoholic seato-hepatitis) scoring 을 실시하여 시료투여에 의한 지방간 개선 정도를 측정 한 결과 3COM-W17S1 투여군에서 유의적이고 용량 의존적으로 NASH 를 개선시키는 것

으로 나타났음.

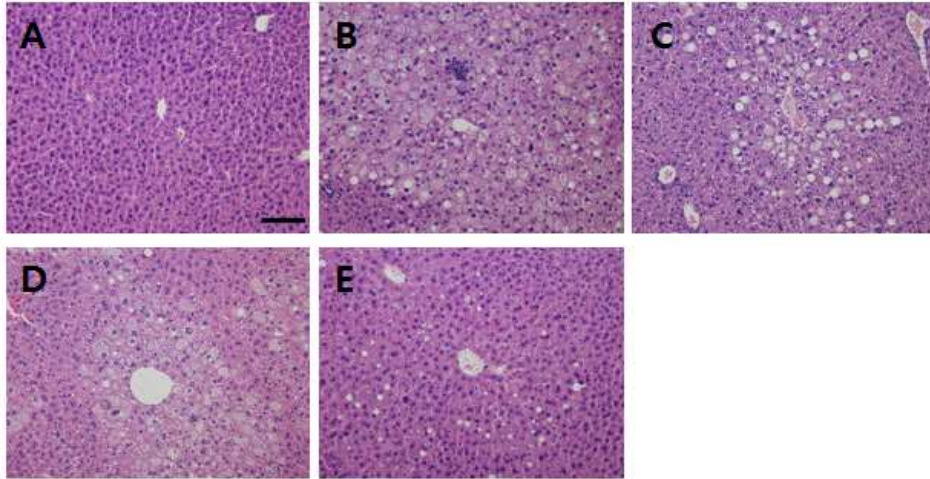


Figure 3-54. Representative picture of liver tissues of 3COM-W17S1, low and high dose treatment. A; Normal control, B; HFD (60% fat calorie diet group, C; Orlistat 40mg/kg, D; 3COM-W17S1 Low (UP601 650mg/kg), E; S 3COM-W17S1 High (UP601, 1300mg/kg) Magnification is X200 and the bar means 100 um.

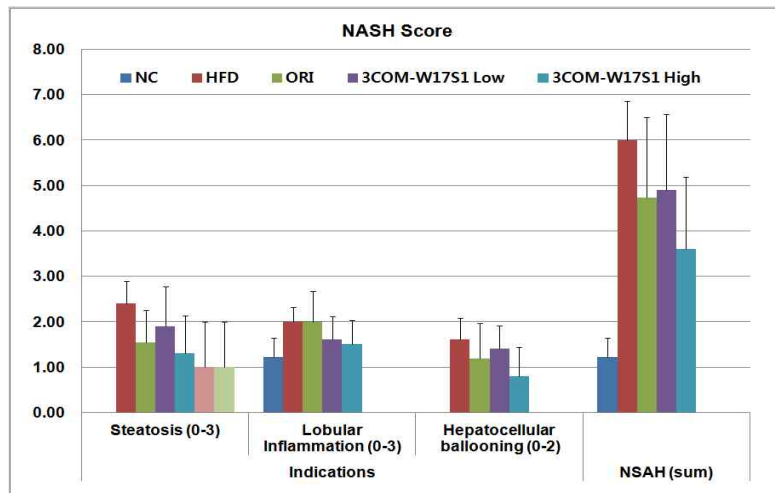


Figure 3-55. Result of NASH score at 3COM-W17S1, low and high dose treatment. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, ORI; Orlistat 40 mg/kg, bid. All samples treated per oral.

투여 5주 후 실시한 DEXA 분석 결과 3COM-W17S1 (1300 mg/kg)을 투여한 실험군에서 체지방 및 체지방이 HFD 군에 비하여 유의적으로 변화함을 관찰하였음. 이는 3COM-W17S1 투여에 의한 체중 감소가 체지방감소로 인한 것임을 나타내는 것임.

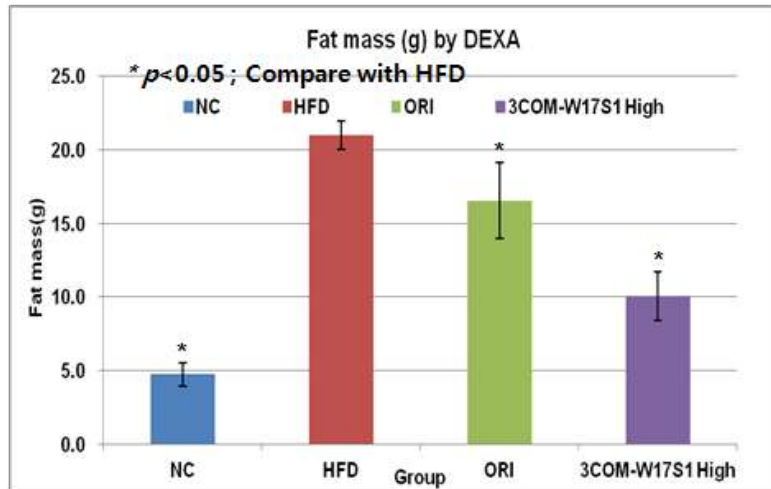


Figure 3-56. Result of DEXA analysis by LUNA PIXImus. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, ORI; Orlistat 40 mg/kg, bid.

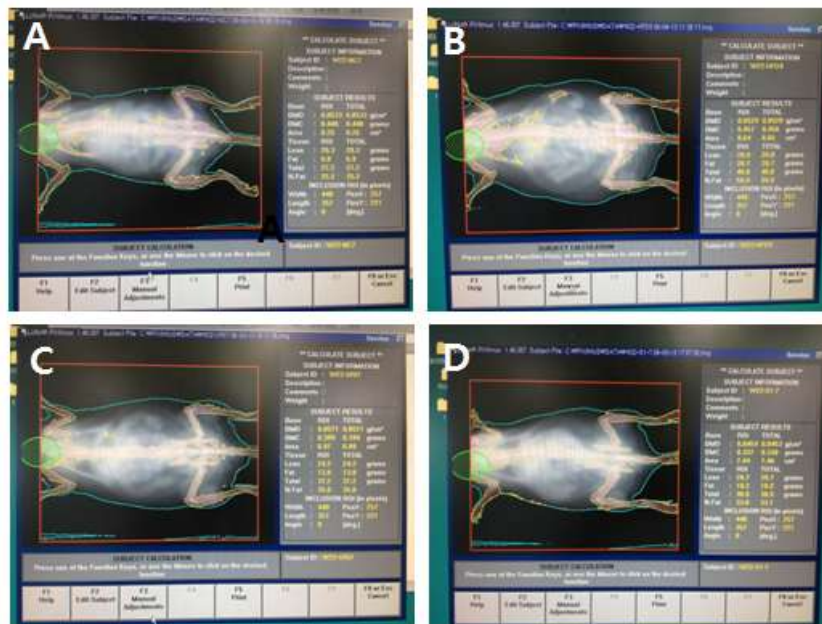


Figure 3-57. Representative picture of DEXA at 3COM-W17S1 treatment. A Normal control, B; HFD (60% fat calorie diet group, C; Orlistat 40mg/kg, D 3COM-W17S1 High (UP601, 1300mg/kg)

Leptin은 지방세포의 비만유전자에 의해 생성되어 식욕을 억제시키고 포만감을 느끼게 하는 호르몬으로 지방 세포내 지방 량이 많을수록 leptin의 분비량이 증가하는 것으로 알려져 있어, 혈중 leptin 농도는 체지방량을 나타내는 지표로 비만연구에 많이 사용되고 있음. 8주간 고지방 식이로 비만을 유도한 마우스의 혈청 내 leptin 농도를 측정 한 결과, 고지방식이(HFD)군의 혈청 leptin양이 normal control(NC)에 비해 유의적으로 증가 한 것을 확인하였음. 3COM-W17S1을 경구투여한 군의 혈청 leptin농도는 HFD군에 비해 유의적으로 감소하여 개선효과를 보이는 것을 확인하였음.

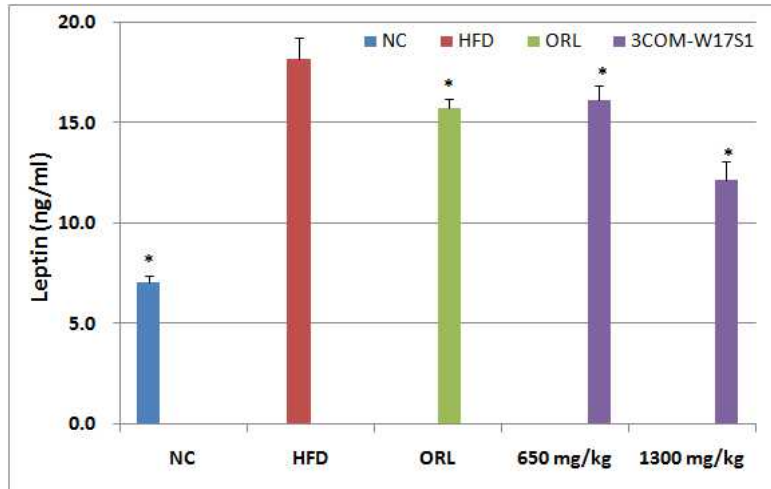


Figure 3-58. Effect of 3COM-W17S1 on plasma levels of leptin in diet-induced obese mice. C : Normal control, HFD : High fat diet, ORL : Orlistat 40 mg/kg

Ghrelin은 위장에서 분비되어 혈중에 존재하는 유일한 식욕증가 호르몬으로 알려져 있으며, 식욕증가, 지방세포의 증식 및 분화를 촉진하고 에너지 대사를 조절하는 작용이 있어 비만한 사람은 적게 분비되며, 체중을 줄이면 증가하는 것으로 알려짐. 8주간 고지방 식이로 비만을 유도한 마우스의 혈청 내 ghrelin 농도를 측정한 결과, HFD군의 혈청 ghrelin양이 NC에 비해 유의적으로 감소한 것을 확인하였음. 3COM-W17S1을 경구투여한 군의 혈청 ghrelin 농도는 HFD군에 비해 유의적으로 증가하여 개선효과를 나타내는 것을 확인하였음.

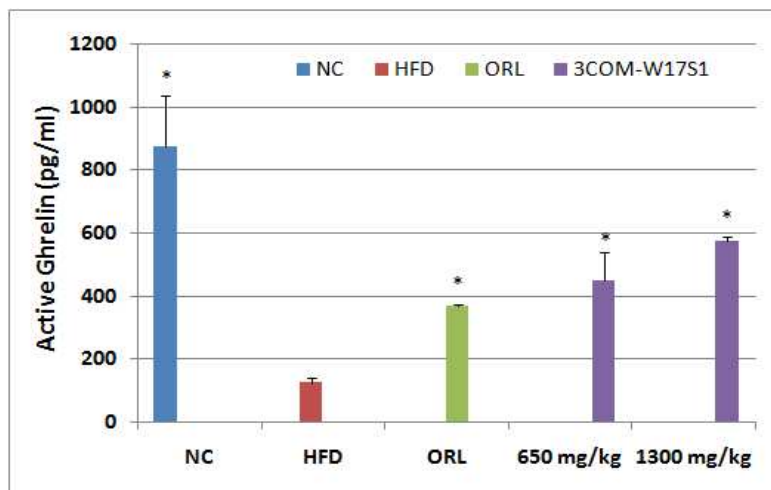


Figure 3-59. Effect of 3COM-W17S1 on plasma levels of ghrelin in diet-induced obese mice. NC : Normal control, HFD : High fat diet, ORL : Orlistat 40 mg/kg

혈청 insulin 농도는 NC에 비해 HFD 군에서 5배 이상 높은 수치를 나타내었고, 3COM-W17S1을 경구 투여한 그룹에서는 HFD 군에 비해 농도 의존적인 감소현상을 보이며, 개선효과를 확인하였음.

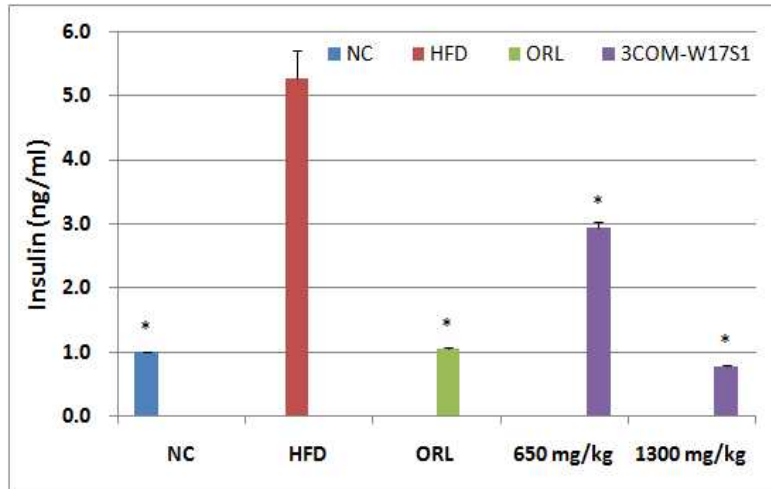


Figure 3-60. Effect of 3COM-W17S1 on plasma levels of insulin in diet-induced obese mice. NC : Normal control, HFD : High fat diet, ORL : Orlistat 40 mg/kg

② 3COM-W17S5

DIO mice 에 임상시험 소재인 3COM-W17S5(UP603) 을 두 개 용량군을 설정하여 투여하였음. 저용량군 (650 mg/kg/day, oral, bid) 및 고용량군 (1300 mg/kg/day, oral, bid)을 7 주간 경구투여 한 결과 전 투여 동물에서 체중증가가 유의적이고 농도 의존적으로 감소함을 확인하였음.

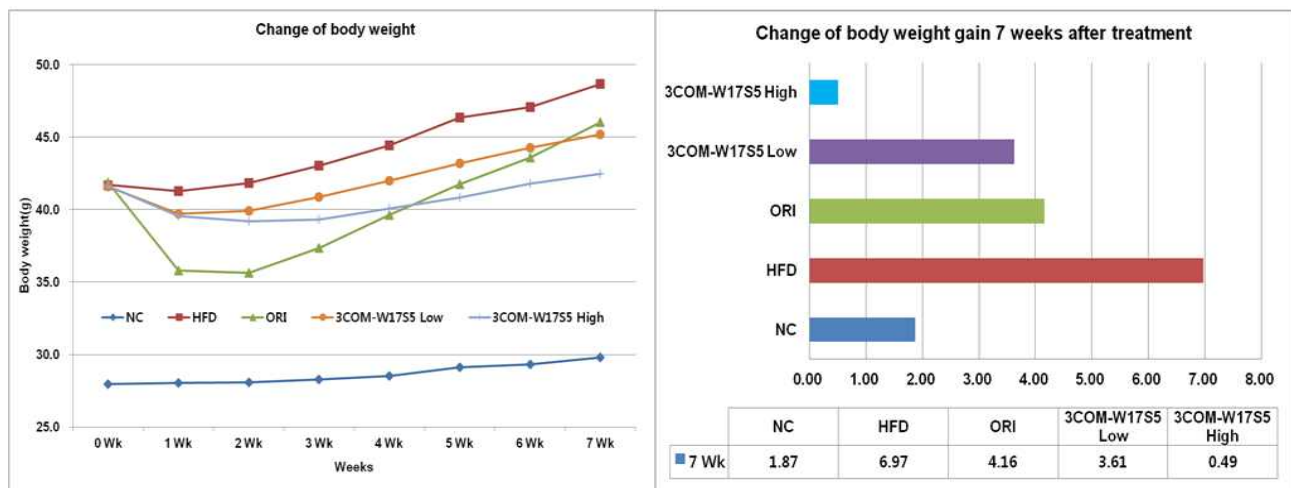


Figure 3-61. Body weight change for 7 weeks treatment of low and high dose of 3COM-W17S5. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, ORI; Orlistat 40 mg/kg, bid. All samples treated per oral.

전 투여기간에 걸친 체중 증가 및 사료 섭취량을 측정하여 FER를 산출하였음. 전 투여군에서 사료 섭취량이 유의하게 감소하였으며 또한 사료효율성도 감소하였음. 이는 임상시험물질 3CON-W17S5 이 DIO mice 의 식욕저하를 유발할 수 있으며 또한 과도한 열량을 섭취함에도 불구하고 체중증가로 나타나지 않음을 시사 함.

Table 3-22. Result of FER at 3COM-W17S5, low and high dose treatment.

Group		Body weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	FER (Food efficiency ratio)
NC	Mean	0.038	3.305	0.012
	SD	0.015	0.485	0.005
	p value	0.0002	0.0000	0.0001
HFD	Mean	0.142	2.575	0.055
	SD	0.056	0.373	0.022
ORI	Mean	0.085	2.877	0.029
	SD	0.035	0.802	0.012
	p value	0.0131	0.0000	0.0042
3COM- W17S5 Low	Mean	0.074	2.494	0.030
	SD	0.071	0.490	0.028
	p value	0.0275	0.0711	0.0358
3COM- W17S5 High	Mean	0.010	2.355	0.004
	SD	0.048	0.496	0.020
	p value	0.0000	0.0000	0.0001

FER(FEED EFFICACY RATIO)=BODY WEIGHT GAIN(G/DAY)/FOOD INTAKE(G/DAY)

p value : compare to HFD by t-test

부검시 모든 실험동물에서 혈액을 채취하여 혈액생화학적 검사를 실시하였음. 저용량 및 고용량 투여군 모두에서 간기능 지표가 향상됨을 나타내었고 지질 프로파일의 경우 Total cholesterol 및 LDL-chol 가 유의하게 감소하였으며 TG는 감소하는 경향을 나타내었음. 3CON-W17S1의 투여에 의하여 간기능 및 지질 프로파일이 개선되는 결과를 나타내었음.

Table 3-23. Result of blood chemistry at 3COM-W17S5, low and high dose treatment.

Group		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Glu (mg/dL)	T-chol (mg/dL)	TG (mg/dL)	TP (g/dL)	LDL-C (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)
NC	Mean	12.74	47.64	261.18	164.40	90.00	15.20	4.76	6.78	45.08
	STD	1.250	1.524	72.525	40.741	9.407	7.563	0.270	1.425	4.572
	p value	0.002	0.003	0.039	0.003	0.000	0.106	0.700	0.025	0.000
HFD	Mean	91.06	85.30	165.28	275.80	177.60	24.80	4.70	10.12	65.36
	STD	22.757	12.765	20.093	42.588	16.196	9.039	0.200	2.307	4.818
ORI	Mean	57.64	91.14	183.90	241.40	168.20	58.60	4.88	7.84	70.10
	STD	21.867	21.728	19.097	19.165	27.941	14.859	0.327	1.915	8.832
	p value	0.045	0.618	0.171	0.138	0.533	0.002	0.324	0.127	0.323
3COM-W17S5 Low	Mean	48.32	65.74	181.62	265.80	185.00	29.80	5.00	9.60	70.70
	STD	16.697	6.781	6.874	32.081	22.978	11.432	0.235	2.297	5.456
	p value	0.010	0.016	0.124	0.686	0.572	0.465	0.061	0.730	0.140
3COM-W17S5 High	Mean	32.65	56.28	184.53	240.00	140.50	14.00	4.63	5.20	66.20
	STD	4.514	8.983	12.943	20.801	12.767	3.559	0.096	1.407	3.232
	p value	0.004	0.006	0.143	0.171	0.007	0.061	0.516	0.007	0.775

간조직의 HE stain 슬라이드를 검경한 결과 HFD 군의 경우 대부분 과도한 지방이 간에 침착되어 심한 지방간 소견을 보이는 것이 일반적임. 광학현미경관찰을 통하여 NASH (non-alcoholic seato-hepatitis) scoring 을 실시하여 시료투여에 의한 지방간 개선 정도를 측정 한 결과 3COM-W17S5 투여군에서 유의적이고 용량 의존적으로 NASH 를 개선시키는 것으로 나타났음.

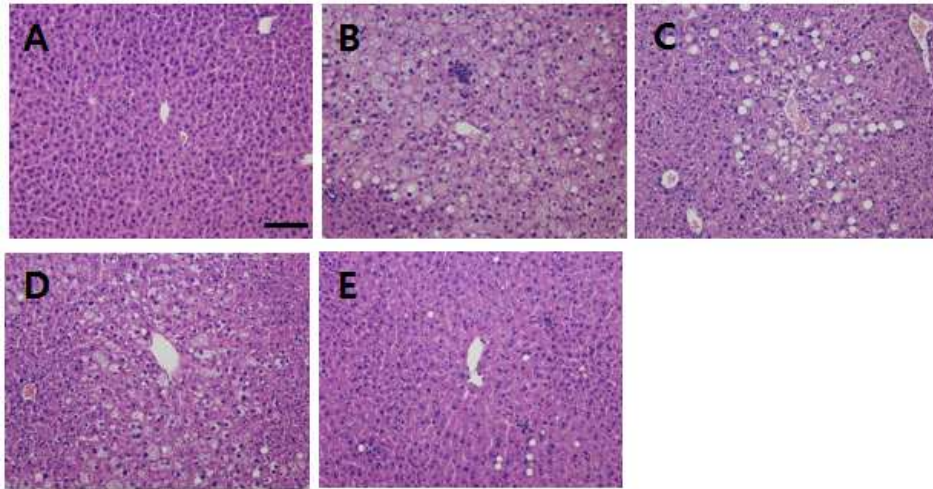


Figure 3-62. Representative picture of liver tissues of 3COM-W17S5, low and high dose treatment. A; Normal control, B; HFD (60% fat calorie diet group, C; Orlistat 40mg/kg, D; 3COM-W17S5 Low (UP603, 850mg/kg) G 3COM-W17S5 High (UP603, 1700mg/kg) Magnification is X200 and the bar means 100 um.

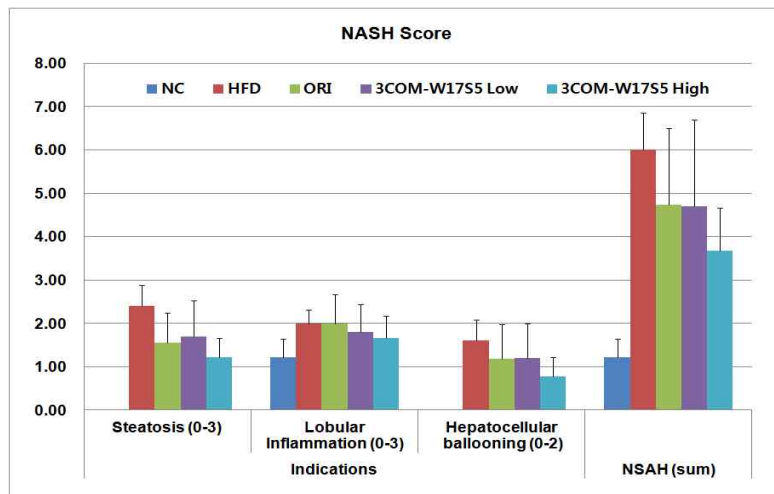


Figure 3-63. Result of NASH score at 3COM-W17S1, low and high dose treatment. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, ORI; Orlistat 40 mg/kg, bid. All samples treated per oral.

투여 5주 후 실시한 DEXA 분석 결과 3COM-W17S5(1700 mg/kg)를 투여한 실험군에서 체지방이 HFD 군에 비하여 유의적으로 감소하였음. 3COM-W17S5 투여 시 관찰되는 체중감소는 근육 등 제지방 성분이 아닌 지방성분의 감소에서 나타나는 것을 시사 하였음.

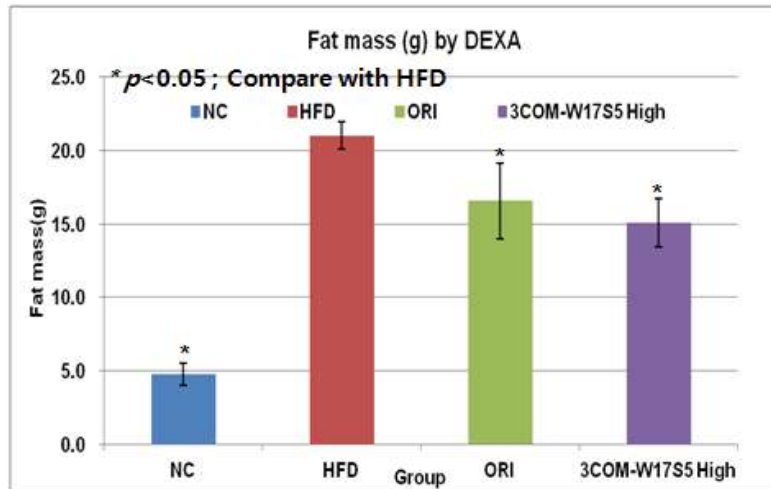


Figure 3-64. Result of DEXA analysis by LUNA PIXImus. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, ORI; Orlistat 40 mg/kg, bid.

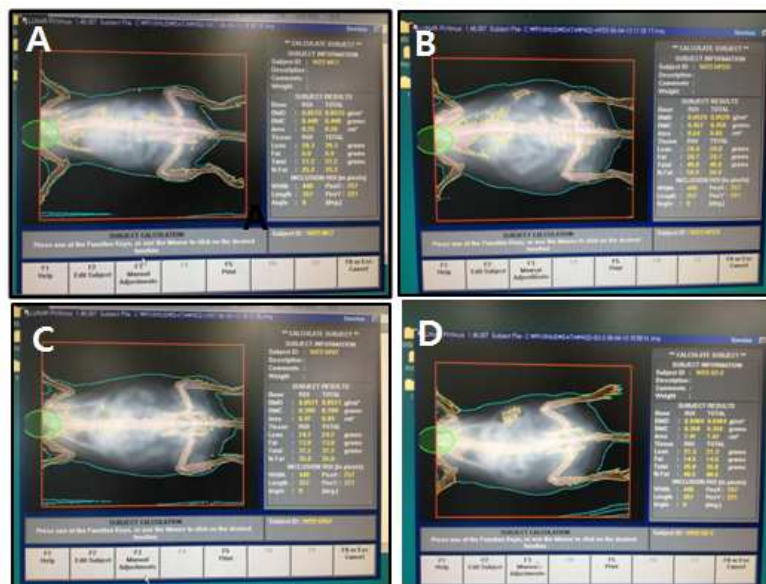


Figure 3-65. Representative picture of DEXA at 3COM-W17S5 treatment. A Normal control, B; HFD (60% fat calorie diet group, C; Orlistat 40mg/kg, D 3COM-W17S5 High (UP601, 1700mg/kg)

8주간 고지방 식이로 비만을 유도한 마우스의 혈청 내 leptin 농도를 측정 한 결과, 고지방식이 (HFD)군의 혈청 leptin양이 NC 군에 비해 유의적으로 증가하였고, 3COM-W17S5을 경구투여 한 군의 혈청 leptin농도는 HFD군에 비해 유의적으로 감소한 것을 확인하였음.

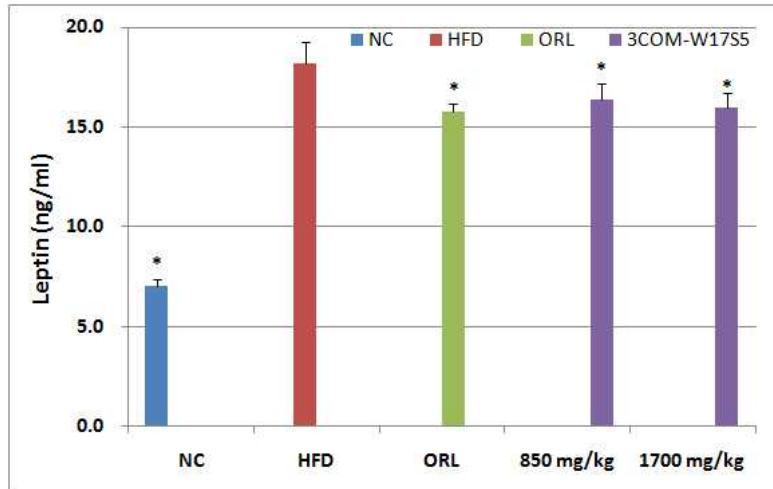


Figure 3-66. Effect of 3COM-W17S5 on plasma levels of leptin in diet-induced obese mice. NC : Normal control, HFD : High fat diet, ORL : Orlistat 40 mg/kg

8주간 고지방 식이로 비만을 유도한 마우스의 혈청 내 ghrelin 농도를 측정 한 결과, HFD군의 혈청 ghrelin양이 NC에 비해 유의적으로 감소 한 것을 확인하였고, 3COM-W17S5를 경구투여 한 군의 혈청 ghrelin 농도는 HFD군에 비해 유의적으로 증가한 것을 확인하였음.

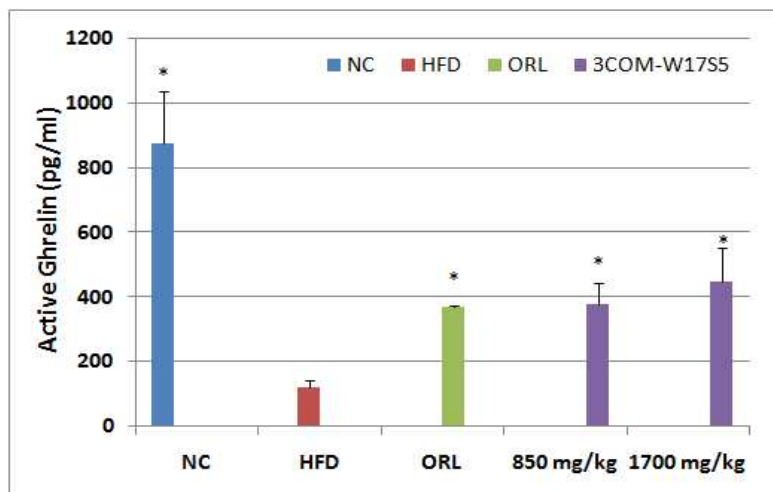


Figure 3-67. Effect of 3COM-W17S5 on plasma levels of ghrelin in diet-induced obese mice. NC : Normal control, HFD : High fat diet, ORL : Orlistat 40 mg/kg

혈청 insulin 농도는 NC에 비해 HFD 그룹에서 5배 이상 높은 수치를 나타내었고, 3COM-W17S5를 경구 투여한 그룹에서 농도 의존적인 감소현상을 확인하였음.

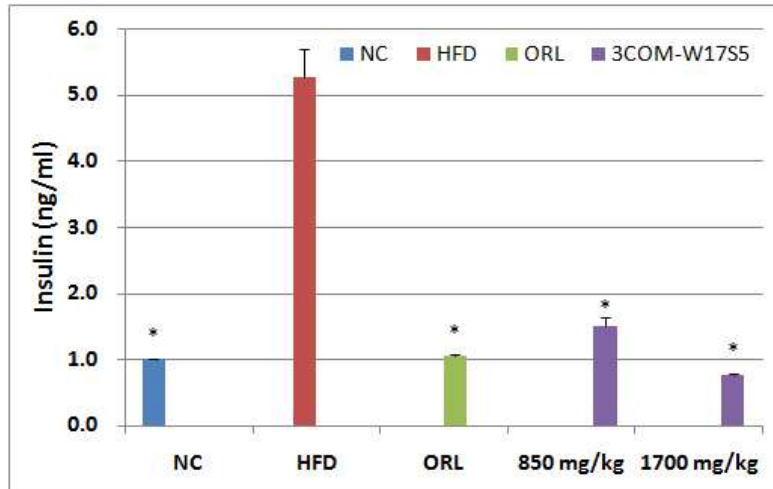


Figure 3-68. Effect of 3COM-W17S5 on plasma levels of insulin in diet-induced obese mice. NC : Normal control, HFD : High fat diet, ORL : Orlistat 40 mg/kg

(2) DIO rat을 이용한 효능 확인 시험

DIO mice 모델에서 전임상 후보 물질 및 전임상물질 등에 대한 효능을 다시 확인하였음.

(가) DIO rat 에서의 전임상 후보 물질의 효능 확인 실험

① P9071

5주령 Wistar rat을 Normal diet와 High fat diet군으로 나눠 5주간 비만 유도한 후, High fat diet 군을 다시 2개 군으로 분리하여 각각 High fat diet + Vehicle 및 High fat diet + P9071 군으로 분리하여 98일간 투여 후 P9071에 대한 체중감소 효능을 평가하였음.

High fat 식이를 하면서 P9071을 하루 1회 98일간 경구투여 했을 때 대조군에 대비 P9071 투여군의 체중이 유의성 있게 감소하였음.

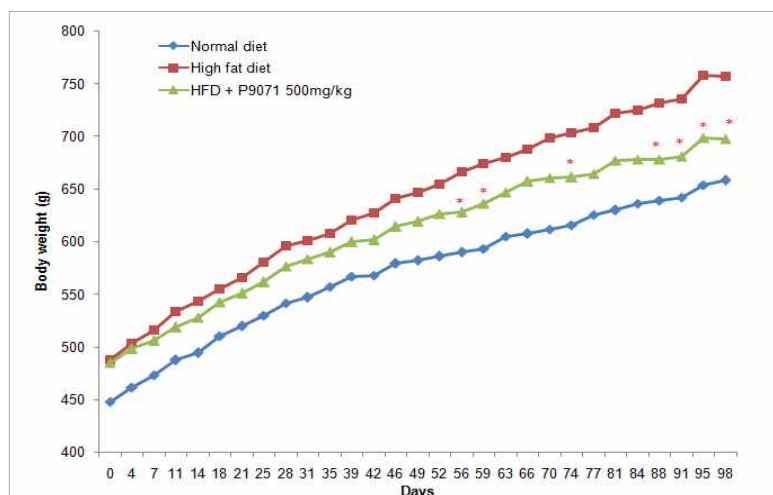


Figure 3-69. Change in body weight of male rats after repeated treatment with P9071.

Significant difference from corresponding high fat diet group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

High fat 식이를 하면서 P9071을 하루 1회 98일간 경구투여 했을 때, body weight gain이 대조군에 대비 P9071 투여에 의해 유의성 있게 감소하였음.

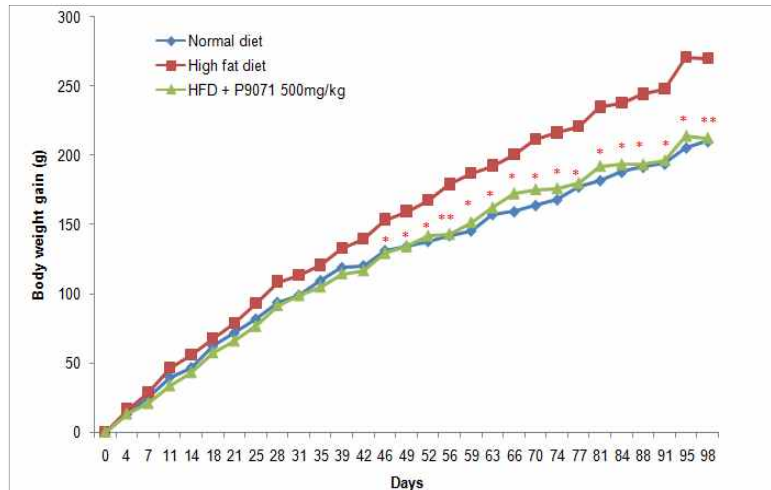


Figure 3-70. Change in body weight gain of male rats after repeated treatment with P9071. Significant difference from corresponding high fat diet group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

High fat 식이를 하면서 P9071을 하루 1회 98일간 경구투여 했을 때, Liver, Epididymal, Perirenal, Retroperitoneal 그리고 total fat pad 무게가 High fat diet 대조군에 대비 P9071 투여에 의해 유의성 있게 감소하였음.

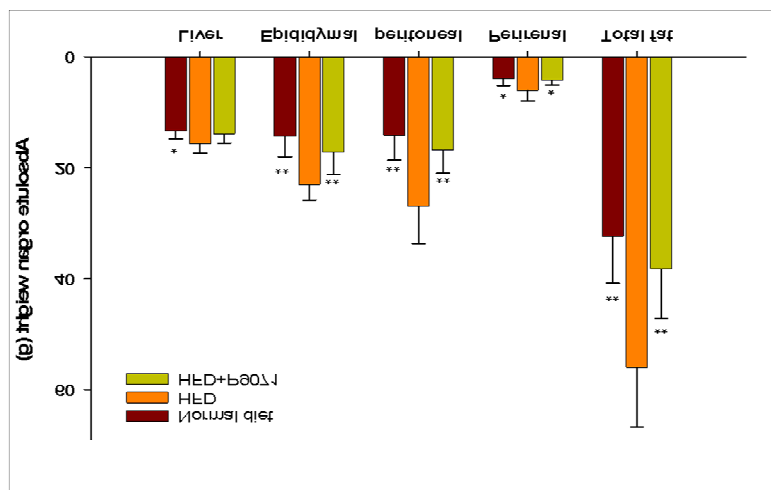


Figure 3-71. Effects of P9071 extract on liver and adipose tissues (Epididymal, Retroperitoneal, Perirenal) fat weights in rats fed high-fat diet. Significant difference from corresponding high fat diet group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

② UG0602

4주령 SD rat을 Normal diet와 High fat diet군으로 나눠 5주간 비만 유도한 후, High fat

diet 군을 다시 3개 군으로 분리하여 각각 High fat diet + Vehicle, High fat diet + Sibutramin 그리고 High fat diet + UG0602 군으로 분리하여 21 일간 투여 후 UG0602에 대한 체중감소 효능을 평가하였음.

High fat 식이를 하면서 UG0602를 하루 1회 21 일간 경구투여 했을 때, High fat diet 대조군에 대비 UG0602 투여에 의해 체중 감소 효과는 관찰되지 않았음.

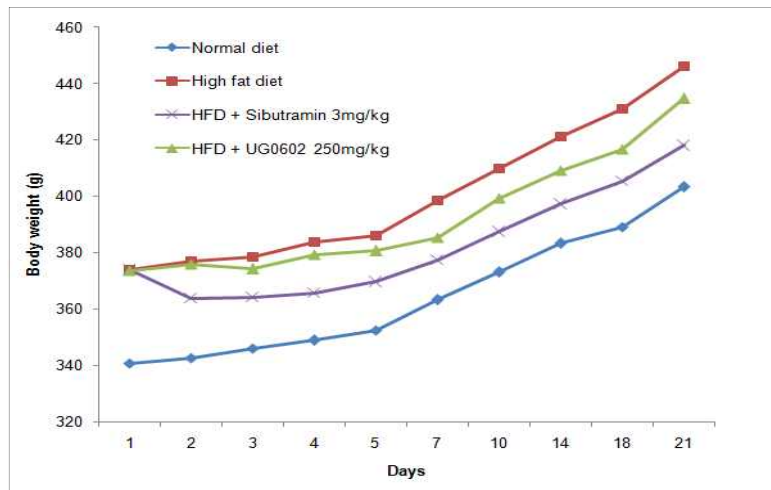


Figure 3-72. Change in body weight of male rats after repeated treatment with UG0602. Significant difference from corresponding high fat diet group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

High fat 식이를 하면서 UG0602를 하루 1회 21 일간 경구투여 했을 때, body weight gain 이 High fat diet 대조군에 대비 UG0602 투여에 의해 유의성 있게 감소하였음.

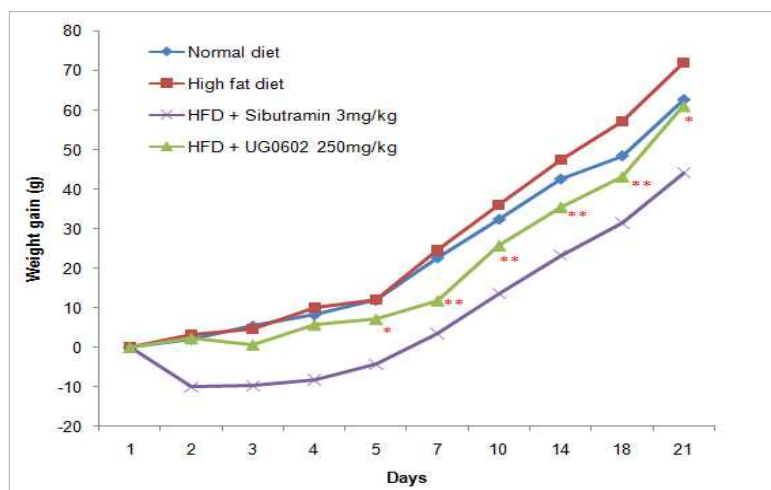


Figure 3-73. Change in body weight gain of male rats after repeated treatment with UG0602. Significant difference from corresponding high fat diet group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

③ UP438

4주령 SD rat을 Normal diet와 High fat diet군으로 나눠 5주간 비만 유도한 후, High fat diet 군을 다시 3개 군으로 분리하여 각각 High fat diet + Vehicle, High fat diet + Sibutramin 그리고 High fat diet + UP438 군으로 분리하여 21 일간 투여 후 UP438에 대한 체중감소 효능을 평가하였음.

High fat 식이를 하면서 UP438을 하루 2회 21 일간 경구투여 했을 때, 체중이 High fat diet 대조군에 대비 UP438 투여에 의해 유의성 있게 감소하였음.

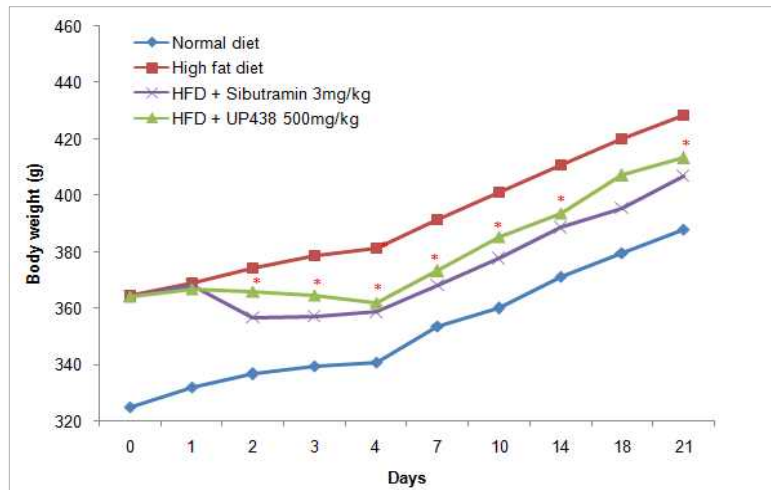


Figure 3-74. Change in body weight of male rats after repeated treatment with UP438. Significant difference from corresponding high fat diet group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

High fat 식이를 하면서 UP438을 하루 2회 21 일간 경구투여 했을 때, body weight gain이 High fat diet 대조군에 대비 UP438 투여에 의해 유의성 있게 감소하였음.

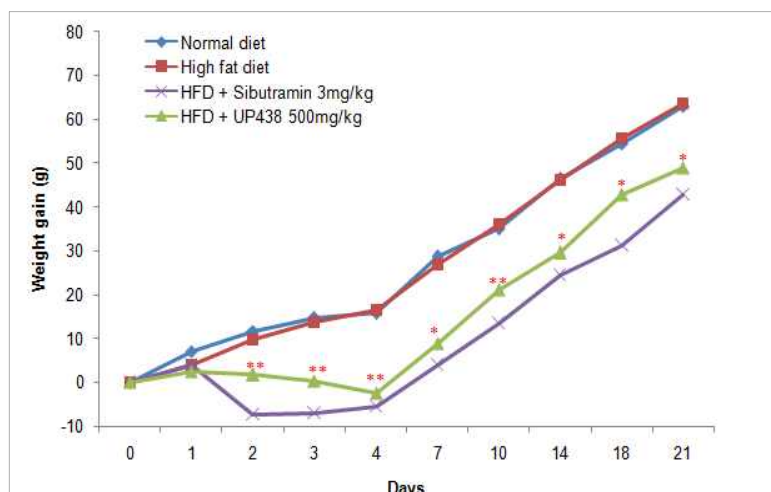


Figure 3-75. Change in body weight gain of male rats after repeated treatment with UP438. Significant difference from corresponding high fat diet group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

High fat 식이를 하면서 UP438을 하루 2회 21 일간 경구투여 했을 때, Epididymal, Perirenal,

Retroperitoneal 그리고 total fat pad 장기 무게가 High fat diet 대조군에 대비 UP438 투여에 의해 유의성 있게 감소하였음.

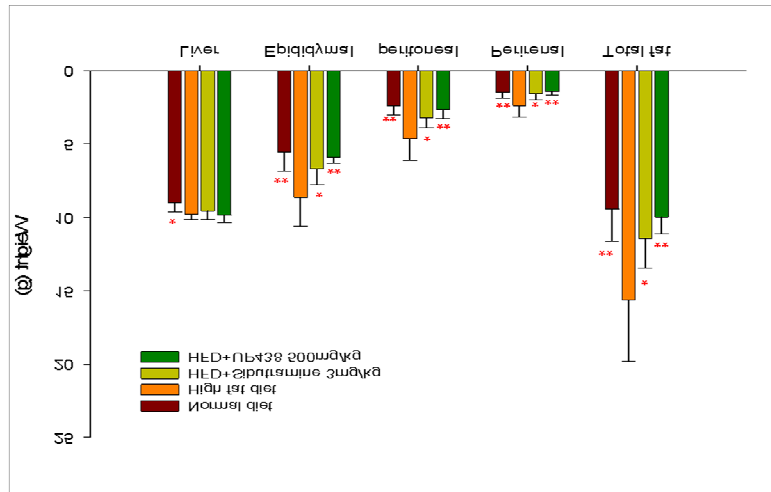


Figure 3-76. Effects of UP438 extract on liver and adipose tissues (Epididymal, Retroperitoneal, Perirenal) fat weights in rats fed high-fat diet. Significant difference from corresponding high fat diet group (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

④ P01999

3주령 SD rat을 Normal diet와 High fat diet군으로 나눠 5주간 비만 유도한 후, High fat diet 군을 다시 2개 군으로 분리하여 각각 High fat diet + Vehicle 및 High fat diet + P01999 군으로 분리하여 98일간 투여 후 P01999에 대한 체중감소 효능을 평가하였음.

High fat 식이를 하면서 P01999를 하루 1회 98일간 경구투여 했을 때, 체중이 High fat diet 대조군에 대비 P01999 투여에 의해 유의성 있게 감소하였음.

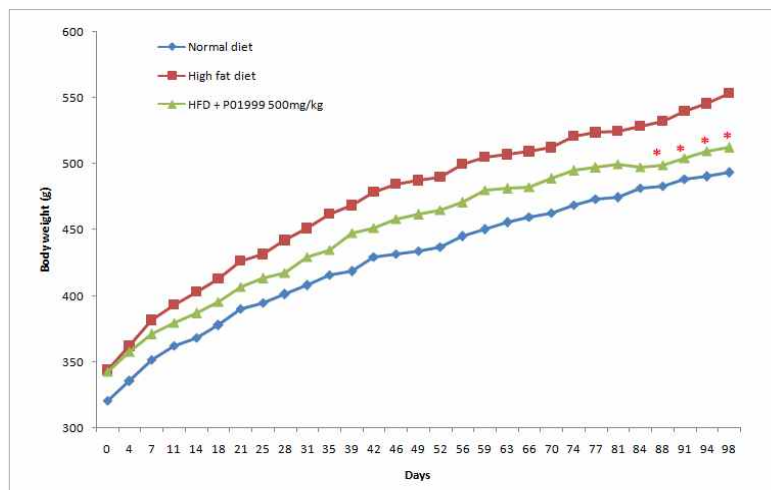


Figure 3-77. Change in body weight of male rats after repeated treatment with P01999. Significant difference from corresponding high fat diet group (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

High fat 식이를 하면서 P01999를 하루 1회 98일간 경구투여 했을 때, body weight gain이 High fat diet 대조군 대비 P01999 투여에 의해 유의성 있게 감소하였음.

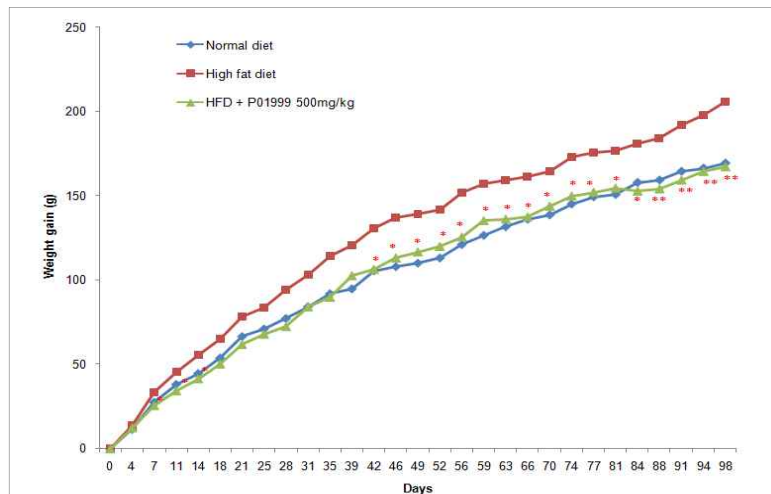


Figure 3-78. Change in body weight gain of male rats after repeated treatment with P01999. Significant difference from corresponding high fat diet group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

High fat 식이를 하면서 P01999를 하루 1회 98일간 경구투여 했을 때, Liver, Epididymal, Perirenal, Retroperitoneal 그리고 total fat pad 장기 무게가 High fat diet 대조군 대비 P01999 투여에 의해 유의성 있게 감소하였음.

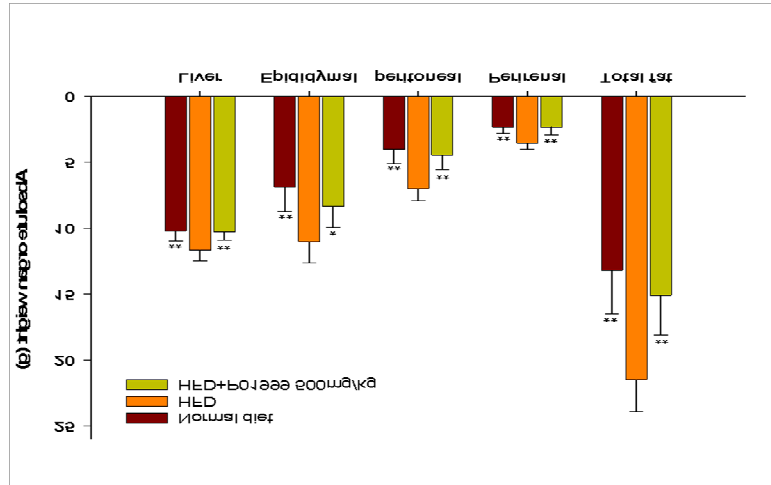


Figure 3-79. Effects of P01999 extract on liver and adipose tissues (Epididymal, Retroperitoneal, Perirenal) fat weights in rats fed high-fat diet. Significant difference from corresponding high fat diet group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

(나) 전임상 및 임상시험 후보 물질의 DIO rat 에서의 효능 확인 실험

복합기전을 가지는 혼합소재 개발을 위하여 DIO mouse 모델에서 효능이 검증된 소재를 이용하여 효능 연구를 실시하여 임상시험 후보소재를 결정.

① 2COM-R8S1

4주령 SD rat을 Normal diet와 High fat diet군으로 나눠 6주간 비만 유도 후, High fat diet 군을 다시 3개 군으로 분리하여 각각 High fat diet, Orlistat 및 2COM-R8S1 group으로 나누어 51일간 투여하여 2COM-R8S1에 대한 체중감소 효능을 평가하였음.

High fat diet 식이를 하면서 2COM-R8S1을 하루 2회 51일간 경구투여 했을 때, HFD군에 대비 2COM-R8S1 투여군의 체중감소 효능은 관찰되지 않았음.

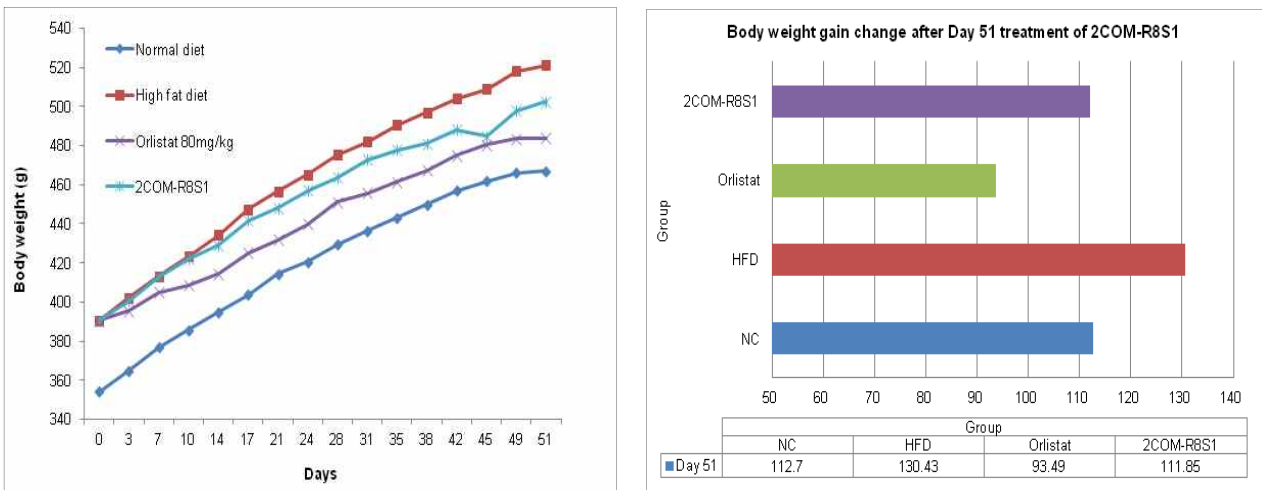


Figure 3-80. Body weight change for day 51 treatment of 2COM-R8S1. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, Orlistat: Orlistat 80 mg/kg, 2COM-R8S1 750 mg/kg, bid.

② 2COM-R8S2

4주령 SD rat을 Normal diet와 High fat diet군으로 나눠 6주간 비만 유도 후, High fat diet 군을 다시 3개 군으로 분리하여 각각 High fat diet, Orlistat 및 2COM-R8S2 group으로 나누어 51일간 투여하여 2COM-R8S2에 대한 체중감소 효능을 평가하였음.

High fat diet 식이를 하면서 2COM-R8S2를 하루 2회 51일간 경구투여 했을 때, HFD군에 대비 2COM-R8S2 투여군의 체중감소 효능은 관찰되지 않았음.

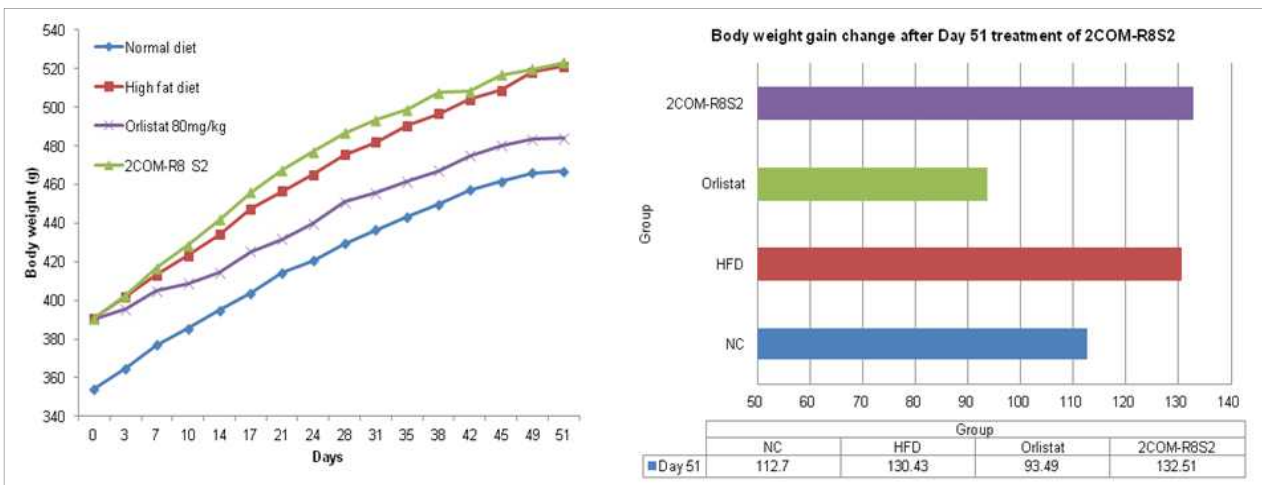


Figure 3-81. Body weight change for day 51 treatment of 2COM-R8S2. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, Orlistat: Orlistat 80 mg/kg, 2COM-R8S2 750 mg/kg, bid.

③ 3COM-R9S2

4주령 SD rat을 Normal diet와 High fat diet군으로 나눠 6주간 비만 유도 후, High fat diet 군을 다시 4개 군으로 분리하여 각각 High fat diet, Orlistat, 3COM-R9S2L (Low dose) 및 3COM-R9S2H (High dose) group으로 나누어 35일간 투여하여 3COM-R9S2에 대한 체중감소 효능을 평가하였음.

High fat diet 식이를 하면서 3COM-R9S2를 하루 2회 35일간 경구투여 했을 때, HFD군에 대비 3COM-R9S2 투여군의 체중은 투여 후 14일까지는 감소 경향이 관찰되었으나, 이 후 체중감소 효능은 관찰되지 않았음.

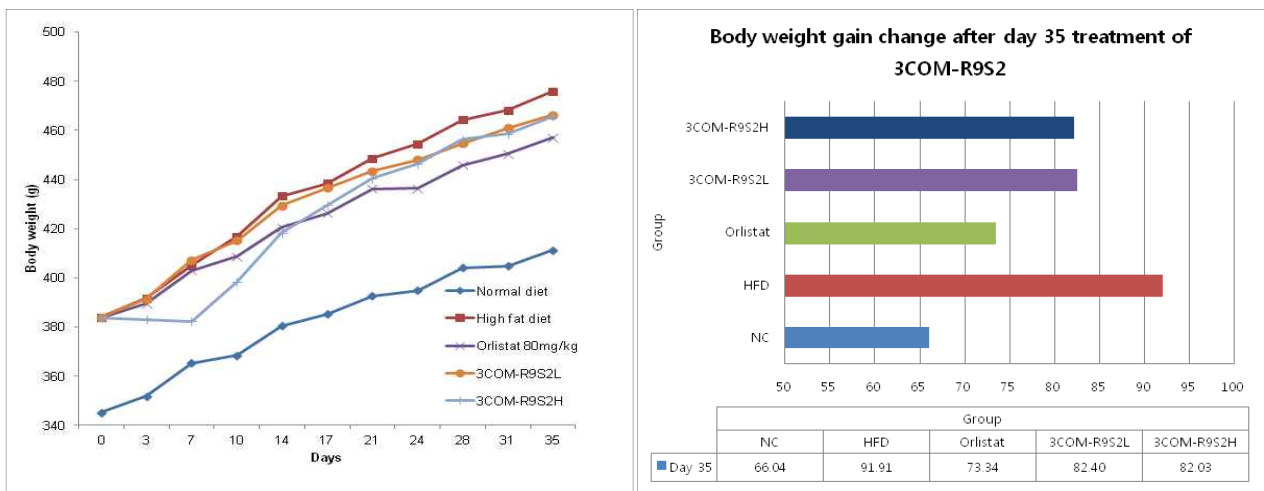


Figure 3-82. Body weight change for day 35 treatment of 3COM-R9S2. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, Orlistat: Orlistat 80 mg/kg, 3COM-R9S2L 800 mg/kg, 3COM-R9S2H 1600 mg/kg, bid.

④ 3COM-W17S1

4주령 SD rat을 Normal diet와 High fat diet군으로 나눠 8주간 비만 유도 후, High fat diet 군을 다시 4개 군으로 분리하여 각각 High fat diet, Orlistat, 3COM-W17S1L (Low dose) 및 3COM-W17S1H (High dose) group으로 나누어 55일간 투여하여 3COM-W17S1에 대한 체중감소 효능을 평가하였음.

High fat diet 식이를 하면서 3COM-W17S1을 하루 2회 55일간 경구투여 했을 때, HFD군에 대비 3COM-W17S1 투여군의 체중이 유의하게 감소하였음.

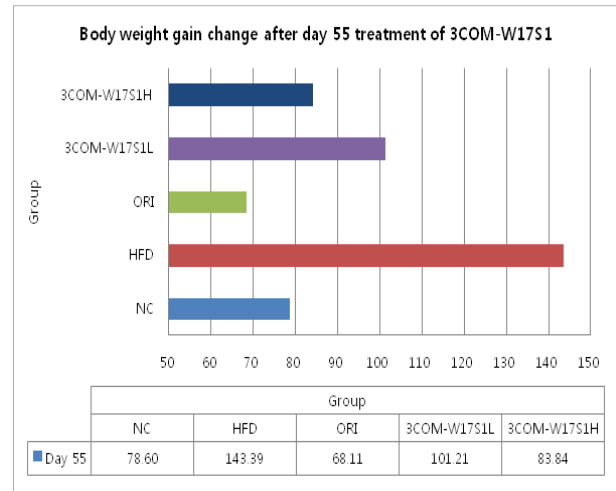
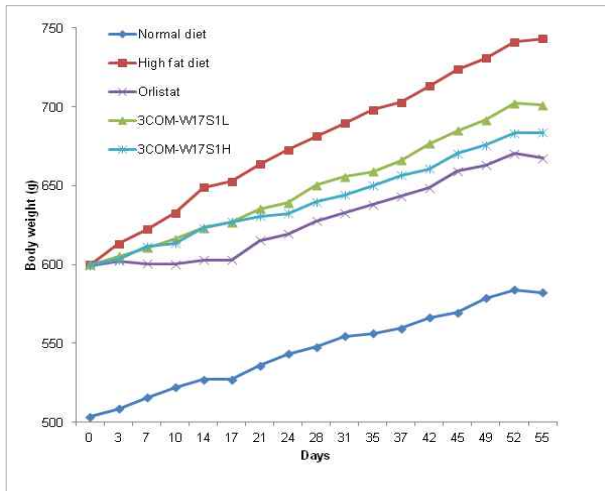


Figure 3-83. Body weight change for day 55 treatment of 3COM-W17S1. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, ORI: Orlistat 80 mg/kg, 3COM-W17S1L 650 mg/kg, 3COM-W17S1H 1300 mg/kg, bid.

혈액을 채취하여 혈액생화학적 검사를 실시한 결과, 간기능 지표인 AST 및 T-bilirubin과 지질 관련 지표인 TG (Triglyceride)가 HFD군에 비해 3COM-W17S1 투여에 의해 유의하게 감소하였음.

Table 3-24. Blood chemistry results of 3COM-W17S1 for day 55 treatment.

Group		ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Glu (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bil (mg/dL)	T-cho (mg/dL)	TG (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)
NC	Mean	41.13	152.69	361.23	163.88	14.89	0.49	0.09	100.00	105.25	10.05	25.30
	SD	9.27	27.97	89.16	14.17	0.91	0.05	0.03	12.34	64.38	2.30	3.77
	p value	0.204	0.416	0.821	0.009	0.000	0.612	0.778	0.006	0.259	0.249	0.195
HFD	Mean	54.75	168.00	348.58	198.38	11.61	0.51	0.09	124.63	137.13	11.15	27.63
	SD	26.46	43.12	126.40	27.09	1.60	0.08	0.02	17.44	40.50	1.10	3.01
	p value	0.085	0.242	0.266	0.086	0.086	0.176	0.048	0.158	0.067	0.411	0.772
Orlistat	Mean	35.65	146.39	480.16	172.13	13.23	0.46	0.06	110.13	216.38	10.63	28.18
	SD	7.54	24.18	288.95	29.71	1.87	0.06	0.03	21.16	100.04	1.36	4.30
	p value	0.067	0.041	0.432	0.262	0.132	0.036	0.001	0.179	0.010	0.070	0.218
3COM-W17S1L	Mean	34.00	127.29	303.70	182.50	10.51	0.44	0.05	112.25	83.63	9.29	25.86
	SD	9.10	25.14	92.17	27.27	1.07	0.04	0.01	17.58	28.79	2.35	2.41
	p value	0.149	0.010	0.953	0.288	0.471	0.126	0.002	0.146	0.043	0.299	0.344
3COM-W17S1H	Mean	39.35	114.89	351.86	184.50	10.96	0.44	0.05	108.38	97.00	9.99	26.05
	SD	6.19	17.66	87.31	22.87	1.89	0.10	0.02	24.04	30.45	2.78	3.41
	p value	0.149	0.010	0.953	0.288	0.471	0.126	0.002	0.146	0.043	0.299	0.344

p value: Compared to HFD group

시료투여 완료 후 부검을 통하여 간 조직에 대한 병리조직학적 분석을 실시함. 고정된 간조직

을 파라핀으로 포매 후 4.5 μm 로 박절한 다음 HE 염색을 실시하였음. 광학현미경 관찰을 통하여 NASH (Non-alcoholic seato-hepatitis) scoring을 실시한 결과 3COM-W17S1을 투여 실험군에서 유의하게 감소하였음.

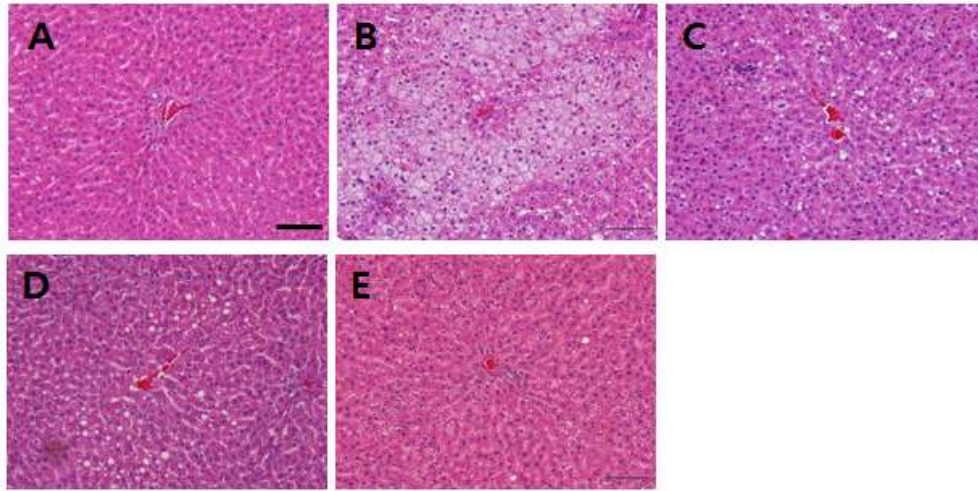


Figure 3-84. Representative picture of liver tissues of 3COM-R10S1 for day 55 treatment. A; Normal diet control group, B; High fat diet control group, C; Orlistat 80 mg/kg, D; 3COM-W17S1L, E; 3COM-W17S1H. Magnification X200, bar means 100 μm .

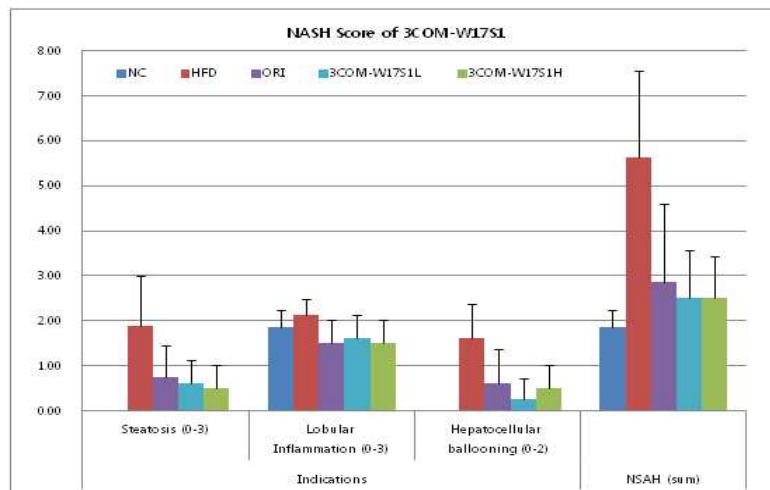


Figure 3-85. NASH score of 3COM-W17S1 for day 55 treatment. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, ORI: Orlistat 80 mg/kg, 3COM-W17S1L 650 mg/kg, 3COM-W17S1H 1300 mg/kg, bid.

부검 후 간 및 지방조직들을 적출하여 무게를 측정 한 결과, Epididymal, Perirenal, Retroperitoneal 및 Total fat 무게가 High fat diet군에 비해 3COM-W17S1 투여에 의해 유의 성 있게 감소하였음.

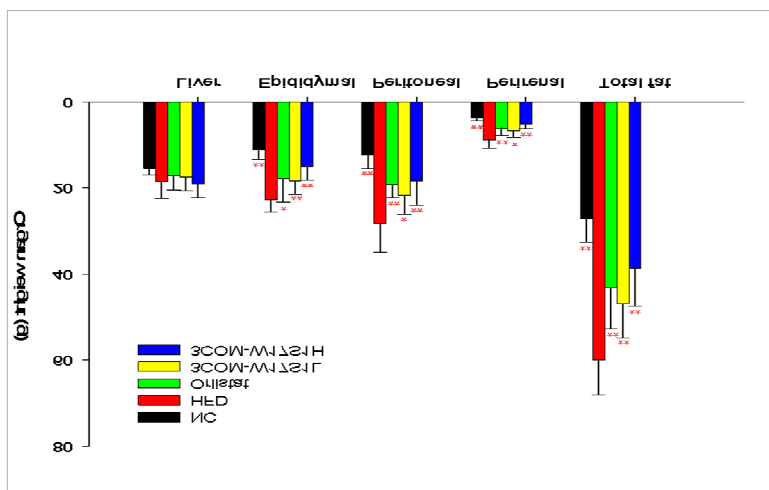


Figure 3-86. Effects of 3COM-W17S1 on liver and adipose tissues (Epididymal, Retroperitoneal, Perirenal) fat weights in rats fed high-fat diet. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, Orlistat: Orlistat 80 mg/kg, 3COM-W17S1L 650 mg/kg, 3COM-W17S1H 1300 mg/kg, bid.

전 투여기간에 걸친 체중 증가 및 사료 섭취량을 측정하여 FER (Food efficiency ratio)를 도출함. 실험 결과 3COM-W17S1 투여 군의 FER 이 유의성 있게 감소하였음.

Table 3-25. Result of FER at 3COM-W17S1 treatment.

Group		Weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	FER (Food efficiency ratio)
Normal diet	Mean	1.400	24.260	0.060
	SD	0.350	0.720	0.010
	p value	0.001	0.073	0.000
High fat diet	Mean	2.560	21.140	0.120
	SD	0.610	2.370	0.020
	p value	0.000	0.023	0.000
Orlistat	Mean	1.220	25.710	0.050
	SD	0.520	1.090	0.020
	p value	0.000	0.023	0.000
3COM-W17S1L	Mean	1.810	19.620	0.090
	SD	0.340	1.000	0.020
	p value	0.011	0.303	0.009
3COM-W17S1H	Mean	1.500	19.570	0.080
	SD	0.550	1.310	0.030
	p value	0.003	0.302	0.002

FER(Food efficiency ratio) = (body weight gain (g/day))/food intake (g/day). p value: Compared to HFD group. NC; Normal diet control group, HFD; High fat diet control group, Orlistat: Orlistat 80 mg/kg, 3COM-W17S1L 650 mg/kg, 3COM-W17S1H 1300 mg/kg, bid.

2. SD rat 을 이용한 Acute feed intake 시험

가. 재료 및 방법

실험동물은 8주령 수컷 Sprague-Dawley 랫드를 이용하였음. 사료섭취량 측정을 위하여 각 군의 랫드들은 폴리카보네이트 케이지 (width X depth X height, 260 X 420 X 180 mm)에 한 마리씩 사육하였음. 적응 기간 동안 일반 동물 사료 (2018S, Harlan, USA)를 공급하였고 적응 및 실험 기간에서 물은 자유롭게 공급하였음. 야행성인 실험동물의 특성으로 인하여 밤 낮 주기를 바꾸고 (dark cycle: 08:00-20:00 hour) 7주일간 적응과 순화 기간을 가지고 본 실험에 사용하였음. 실험동물은 0.15% xanthane solution을 vehicle 로 경구 투여하였고 어둠이 시작되어 사료 섭취가 활발해지기 30분전에 16시간 이상 절식시킨 실험동물에 후보 소재를 경구 투여하였음. 사료 섭취에 대한 기호를 증가시키기 위하여 45% 고지방 사료 (TD66415, Harlan, USA)를 급여한 투여하였음. 체중은 절식 전날의 체중과 0, 2, 8 및 24시간에서 측정하였고 사료 섭취량은 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 그리고 24 시간에 측정하여 후보 소재의 사료 섭취에 대한 효능을 평가하였음.

나. 결과 및 고찰

(1) 전임상 후보물질에 대한 Acute feed intake 시험 결과

(가) UG0602

UG0602 섭취에 의한 Acute Feed intake test를 수행하기 위하여 아래와 같이 실험동물을 2개 군으로 나누어 실시하였음.

Table 3-26. Randomizing for acute feed intake of UG0602.

	Group	Dose(mg/kg)	No. animals (ID)
G1	Control	-	11 (1M01~1M11)
G2	Treatment group (UP0602)	250	11 (2M01~2M11)

시간별 사료 섭취량을 측정한 결과 1시간에서 10시간까지 UG0602 투여한 군에서 사료 섭취량이 유의성 있는 감소를 보였음.

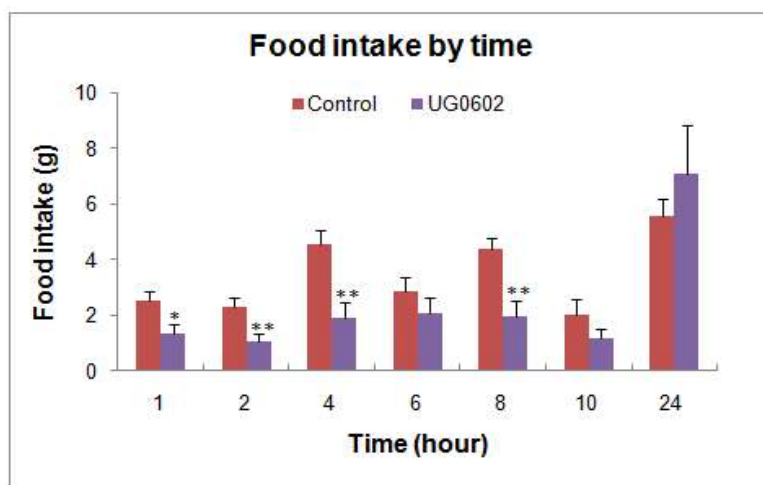


Figure 3-87. Changes of food intake by time in SD rats after single oral administration of UG0602 (n=11).

또한 누적 사료 섭취량에서도 대조군에 비하여 UG0602 투여 군에서 1시간에서 24시간까지 유의적인 사료 섭취량의 감소가 보였음.

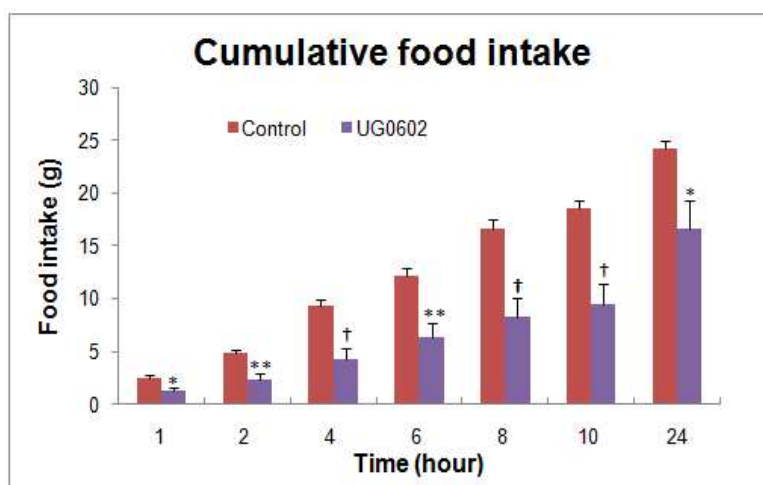


Figure 3-88. Changes of cumulative food intake in SD rats after single oral administration of UG0602 (n=11).

UG0602 투여 직후, 2, 8 그리고 24 시간 후 체중 변화를 측정 한 결과 8시간 및 24시간 후 UG0602 투여군에서 체중이 감소되는 경향이 관찰되었음.

또한 체중의 증가 정도에서도 대조군과 비교하여 UG0602 투여군에서 body weight gain의 증가가 적게 나타났음.

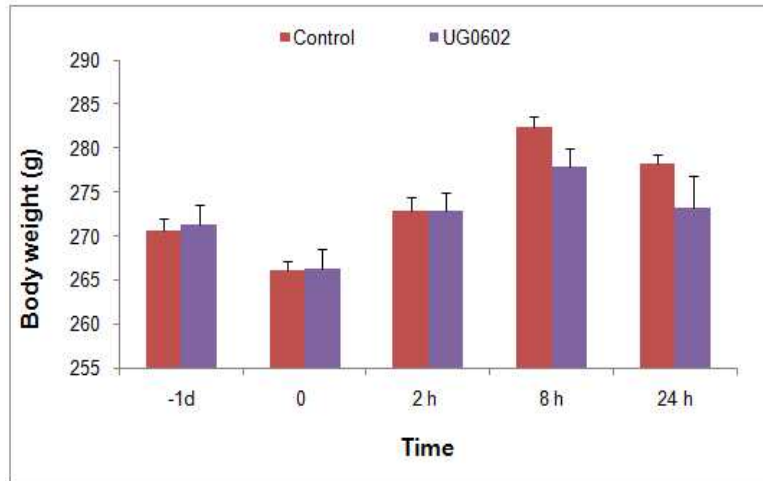


Figure 3-89. Changes of body weight in SD rats after single oral administration of UG0602. (n=11).

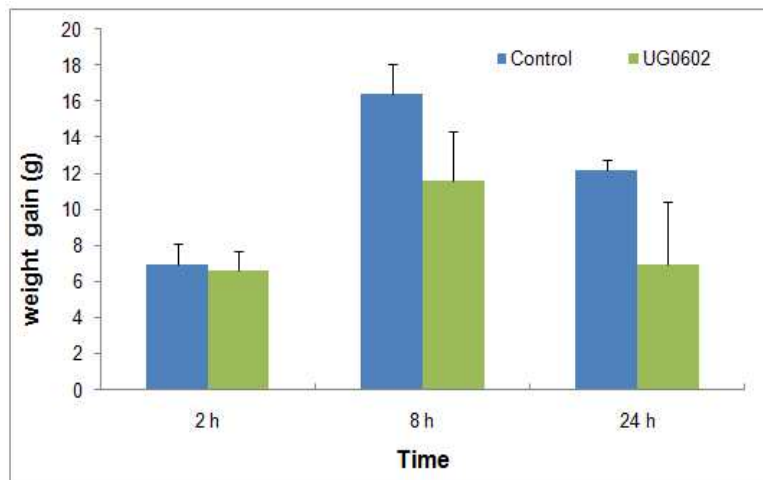


Figure 3-90. Changes of body weight gain in SD rats after single oral administration of UG0602 (n=11).

(나) UP438

UP438에 대한 acute feed intake test를 수행하기 위하여 대조군 및 2개 용량의 UP438 투여군을 설정하였음. 이에 따라 UP438의 용량 의존적인 관계가 있는지 관찰하였음.

Table 3-27. Randomizing for acute feed intake of UP438.

Group	Dose(mg/kg)	No. animals (ID)
G1 Control	-	7 (1M01~1M7)
G2 Treatment group I (UP438)	250	7 (2M01~2M7)
G3 Treatment group II (UP438)	500	8 (3M01~3M8)

시간별 사료 섭취량은 대조군과 비교하여 시료 투여 후 1시간에서 8시간까지 농도 의존적으로 사료 섭취량이 감소된 것을 관찰하였음.

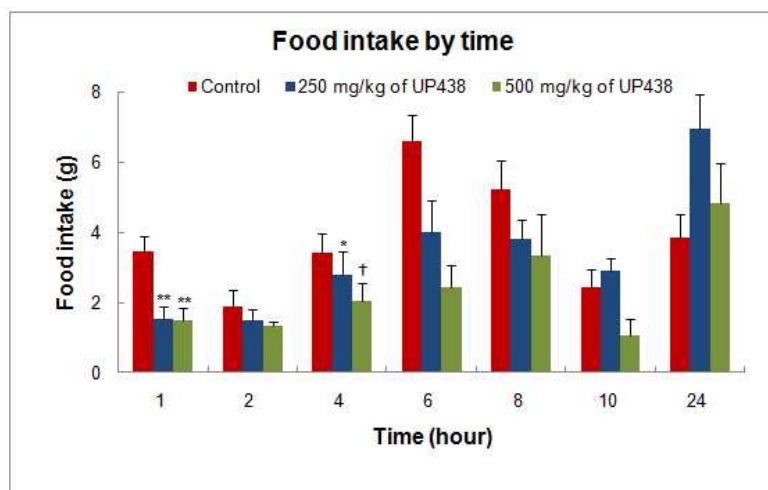


Figure 3-91. Changes of feed intake by time in SD rats after single oral administration of UP438 (n=7~8).

누적 사료 섭취량에서는 시료 투여 후 시간경과에 따라 농도 의존적이면서 유의적인 감소를 확인하였음.

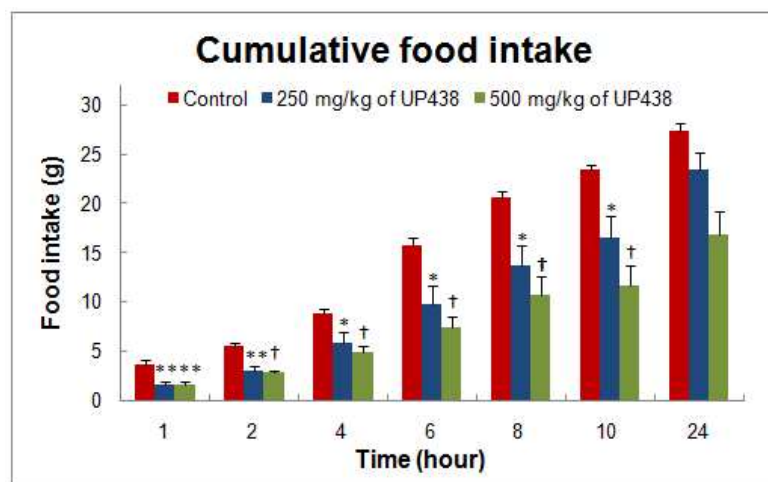


Figure 3-92. Changes of cumulative food intake in SD rats after single oral administration

of UP438 (n=7~8).

체중은 대조군과 비교하여 8 시간과 24 시간 경과 후에 체중 감소의 경향성을 보였음. Body weight gain 에서는 용량 의존적으로 대조군과 비교하여 유의적인 감소가 관찰되었음.

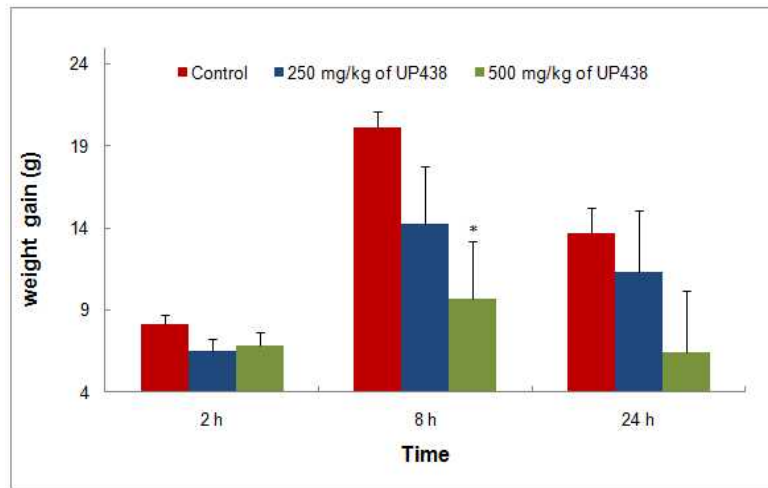


Figure 3-93. Changes of body weight gain in SD rats after single oral administration of UP438(n=7~8).

(2) 전임상 및 임상시험 물질에 대한 Acute feed intake 실험 결과

(가) 3COM-W17S1

3COM-W17S1의 투여에 의한 acute feed intake test를 수행하기 위하여 대조군 및 2개 용량의 투여군을 설정하였음. 이에 따라 COM-W17S1의 용량 의존적인 관계가 있는지 관찰하였음.

Table 3-28. Groups for Sample treatment.

Group	Dose (mg/kg)	No. animal (ID)
G1 Control (Vehicle)	-	8 (1M01-1M10)
G2 3COM-W17S1	650	8 (2M01-2M10)
G3 3COM-W17S1	1300	8 (3M01-3M10)

시험 물질을 경구 투여한 후 각 시간별로 사료 섭취량의 변화를 알아보았다. 3COM-W17S1을 경구 투여 후 650 mg/kg 용량 군에서는 4시간과 6시간에 각각 사료 섭취량이 감소하였고 1300 mg/kg 용량 군에서는 2, 4 그리고 8시간에서 사료 섭취량이 유의적으로 감소하였음.

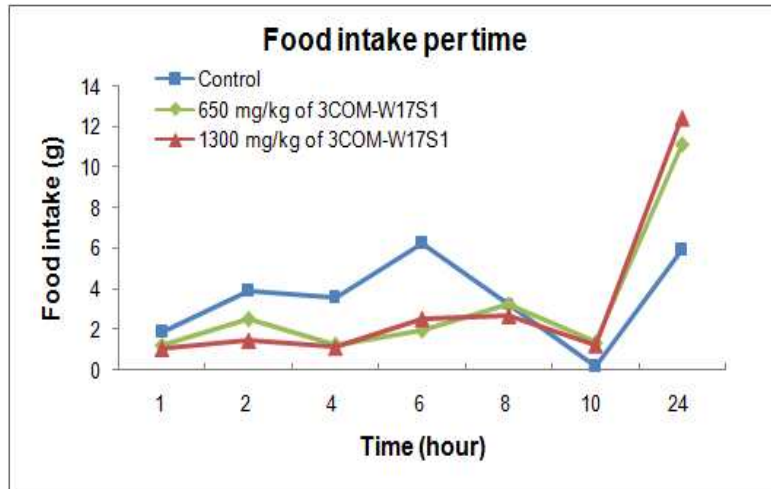


Figure 3-94. Change of acute food intake per time in non-obese fasting SD rat fed high fat diet. Values represent Mean \pm SE (n=8).

시간별 사료 섭취량의 합인 누적 사료섭취량으로 실험동물의 24시간 동안 사료 섭취량의 변화를 알아보았다.

3COM-W17S3 투여군에서는 650 mg/kg 용량 군에서 4시간에서 10시간 까지, 1300 mg/kg 용량 군에서는 2시간에서 24시간까지 유의적인 사료 섭취량의 감소를 보였다.

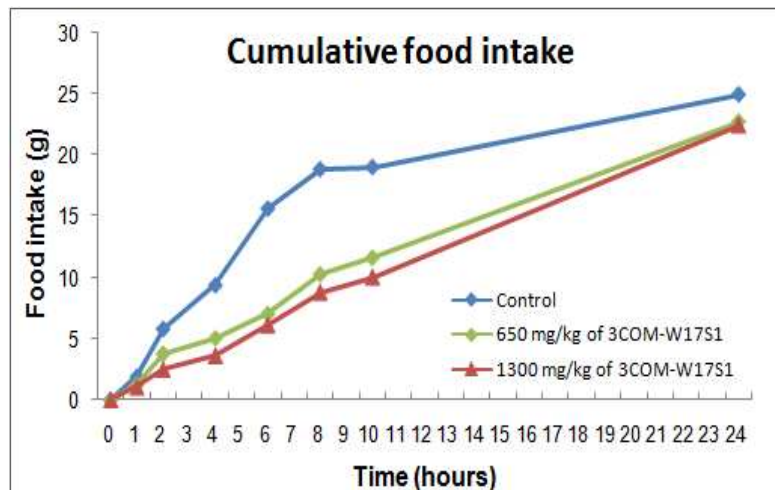


Figure 3-95. Change of cumulative food intake in non-obese fasting SD rat fed high fat diet. Values represent Mean \pm SE (n=8).

3COM-W17S3을 투여했을 때 650 mg/kg 투여군은 투여 후 8 시간에서, 1300 mg/kg 의 농도에서는 2 시간 및 8시간 후 체중이 유의적으로 감소하였음.

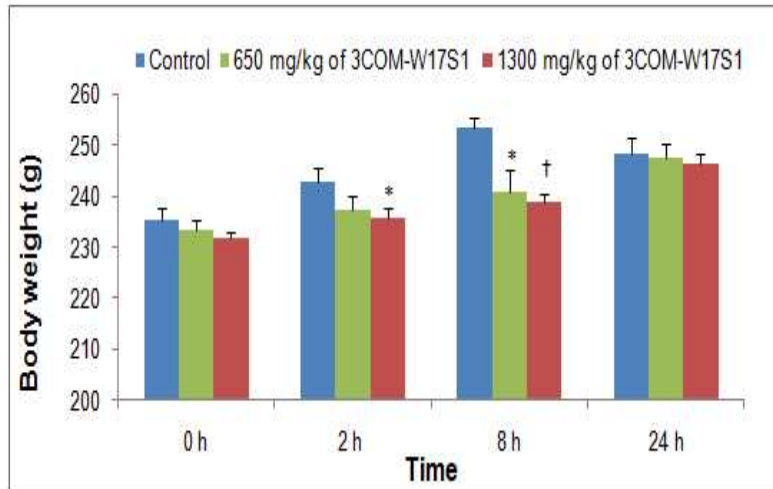


Figure 3-96. Change of body weight gain in non-obese fasting SD rat fed high fat diet. Values represent Mean \pm SE (n=8). Significances were marked as follows: * p<0.05, † p<0.001

Body weight gain 은 650 mg/kg 투여군에서는 투여 후 8시간에서, 1300 mg/kg 투여군에서는 각각 2시간과 8시간에서에서 유의적으로 감소하였음.

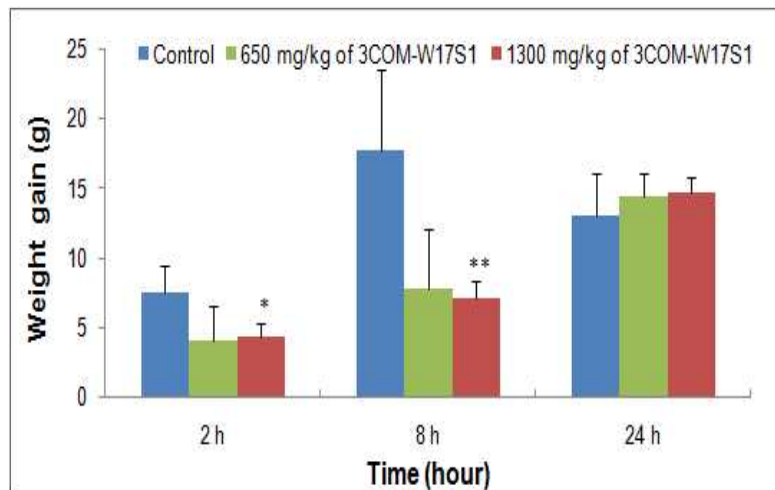


Figure 3-97. Change of body weight gain in non-obese fasting SD rat fed high fat diet. Values represent Mean \pm SE (n=8). Significances were marked as follows: * p<0.05, ** p<0.01

(나) 3COM-W17S5

3COM-W17S5의 투여에 의한 acute feed intake test를 수행하기 위하여 대조군 및 2개 용량의 투여군을 설정하였음. 이에 따라 COM-W17S5의 용량 의존적인 관계가 있는지 관찰하였음

Table 3-29. Groups for Sample treatment

	Group	Dose (mg/kg)	No. animal (ID)
G1	Control (Vehicle)	-	8 (1M01-1M10)
G2	3COM-W17S5	850	8 (4M01-4M10)
G3	3COM-W17S5	1700	8 (5M01-5M10)

시험 물질을 경구 투여한 후 각 시간별로 사료 섭취량의 변화를 보았을 때 3COM-W17S5 군에서 850 mg/kg 용량 군에서는 4시간, 1700 mg/kg 용량 군에서는 1, 2, 4 그리고 6시간에서 사료 섭취량이 유의적으로 감소하였음.

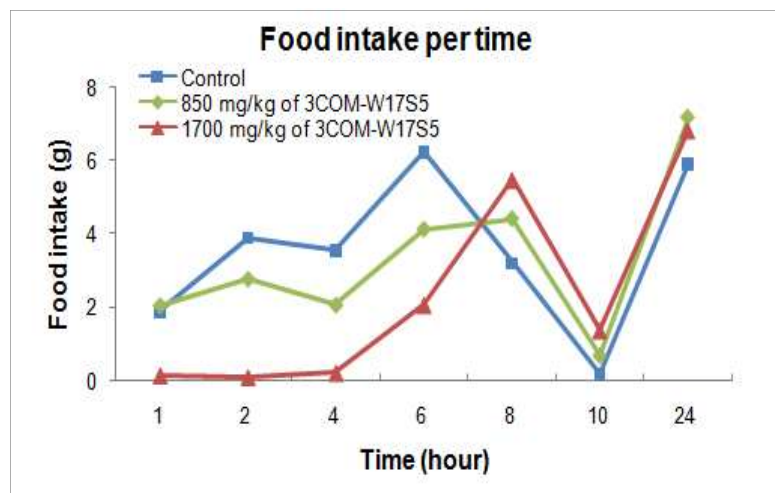


Figure 3-98. Change of acute food intake per time in non-obese fasting SD rat fed high fat diet. Values represent Mean \pm SE (n=8).

시간별 사료 섭취량의 합인 누적 사료섭취량으로 실험동물의 24시간 동안 사료 섭취량의 변화를 알아보았음. 3COM-W17S5 투여군 모두에서 사료섭취의 감소 경향이 관찰되었고 850 mg/kg 용량 군에서는 4, 6 그리고 24시간에서, 1700 mg/kg 용량 군에서는 1시간에서 24시간 까지 유의적인 사료 섭취의 감소를 보였음.

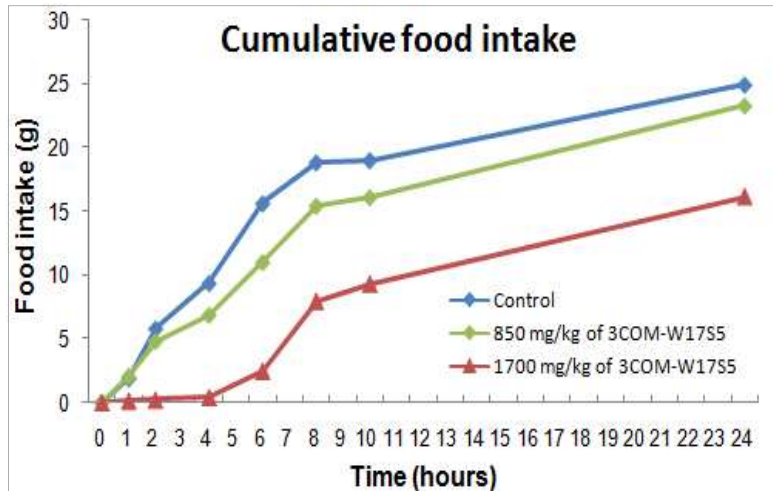


Figure 3-99. Change of cumulative food intake in non-obese fasting SD rat fed high fat diet. Values represent Mean \pm SE (n=8).

1700 mg/kg 의 3COM-W17S5 을 투여했을 때 8시간에서 유의적인 체중의 감소가 관찰되었다.

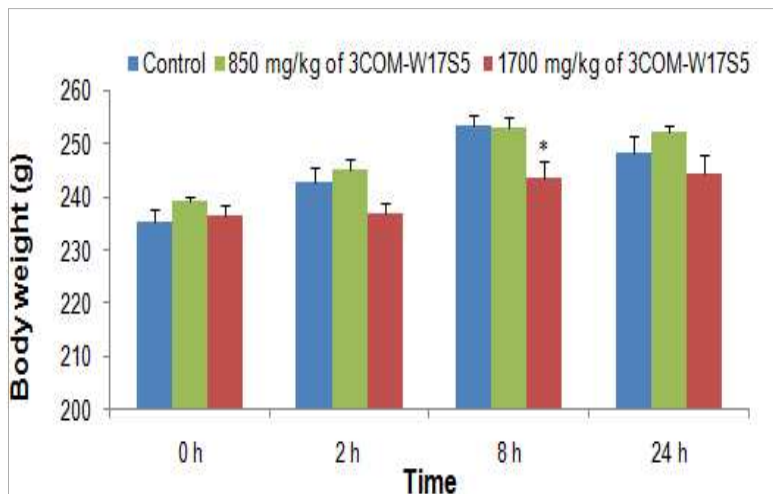


Figure 3-100. Change of body weight gain in non-obese fasting SD rat fed high fat diet. Values represent Mean \pm SE (n=8). Significances were marked as follows: * p<0.05, ** p<0.01

1700 mg/kg 의 3COM-W17S5 투여군에서 2시간과 8시간에서 body weight gain에서 유의적인 감소가 보였음.

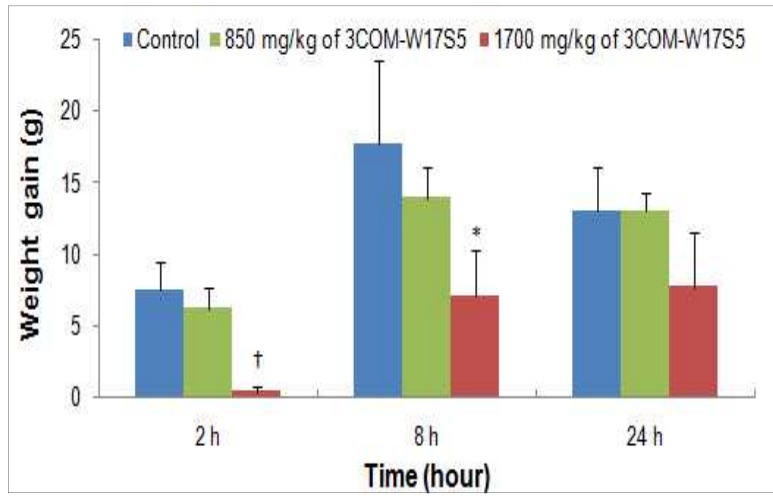


Figure 3-101. Change of body weight gain in non-obese fasting SD rat fed high fat diet. Values represent Mean \pm SE (n=8). Significances were marked as follows: * p<0.05, † p<0.001.

제 4 절 기능식품 소재 개발 - 안전성 연구

기능식품 소재의 개발을 위하여 효능평가와 동시에 안전성이 입증된 소재개발에 주력하였음. 본 연구에 사용된 대부분의 후보 물질들은 미국 GRAS 및 식약청 등에 식용으로 등재되어 있어 그 독성이 심각하게 고려되지 않으나 본 연구에서는 복용 시 안전성에 대한 과학적 근거 마련을 위하여 마우스 및 랫드를 이용하여 안전성 연구를 별도로 수행하였음.

선행연구 및 1차로 도출된 전임상 후보 물질에 대해서는 1차적으로 마우스를 활용한 안전성 스크리닝을 우선 시행하였음. 안전성이 확인된 후보소재에 대해서만 효능시험 등을 진행하였으며 각기 도출된 전임상 후보 및 임상시험 물질에 대해서는 랫드를 이용한 단회 경구 독성 시험, 14일 및 28일 경구반복투여 독성시험을 자체 실시하여 안전성 결과를 확보하였음. 확보된 연구결과는 임상시험 진행과 관련된 IRB 제출 자료로도 활용되었으며 최종 임상시험소재로 선정된 두개 소재에 대하여서는 향후 마케팅 및 개별 인정 진행 등을 위하여 GLP 기관에서 90일 독성 반복경구투여 시험을 진행 중에 있음.

1. 재료 및 방법

가. 마우스를 이용한 독성 스크리닝 실험

실험동물을 이용한 독성스크리닝 시험을 활용하여 도출된 후보소재의 독성유무를 판단하고 향후 개발 진행여부에 대한 자료로 활용하였음. 수컷 CB1 mice에 각 후보소재를 2g/kg 용량으로 5일간 경구 투여하여 독성유무를 평가함.

나. 랫드를 이용한 단회 독성 시험

암-수 랫드를 이용하여 시험물질을 단회 투여하고, 투여 후 14일 동안 일반증상, 체중 변화, 부검시 육안소견을 관찰하여 개략의 치사량을 구하기 위해 실시하였으며, 본 실험에서의 투여 용량은 실험동물에게 가능한 최대용량을 투여하였음.

다. 랫드를 이용한 14일 반복 경구 독성 시험

암-수 랫드를 14 일간 경구투여하고 일반증상, 체중변화, 혈액 및 혈청 생화학적 검사, 부검시 육안소견, 조직병리학적 검사를 실시하여 NOAEL (no-observed-adverse-effect-level)을 구하기 위해 실시함. 14일 반복투여에 의한 독성시험 결과는 28일 반복투여 독성시험에 대한 용량 결정의 근거자료로 활용되었음.

라. 랫드를 이용한 28일 반복 경구 독성 시험

암-수 랫드를 28일간 경구투여하고 일반증상, 체중변화, 혈액 및 혈청 생화학적 검사, 부검시 육안소견, 조직병리학적 검사를 실시하여 NOAEL (no-observed-adverse-effect-level)을 구하기 위해 실시하였으며 28일 반복투여에 의한 독성시험 결과는 90일 반복투여 독성시험에 대한 용량 결정의 근거자료로 활용되었음.

마. 랫드를 이용한 GLP 90일 반복독성시험

선정된 임상 후보소재의 안전성을 알아보기 위하여, 암-수 랫드에 90일간 경구투여하고 일반증상, 체중 변화, 혈액 및 혈청 생화학적 검사, 부검시 육안소견, 조직병리학적 검사를 실시하여 NOAEL (no-observed-adverse-effect-level)을 구하기 위해 실시하였음.

2. 결과 및 고찰

최종 후보소재 모두 최대 8주간의 효능 시험 기간 동안 마우스 및 랫드에 반복 투여되었음. 투여 기간에 걸쳐 독성임상증상이 관찰되지 않았음. 또한 실험 종료 후 실시한 각 혈액검사 결과 특이한 변화가 관찰되지 않았음. 그럼에도 불구하고 각 단계에 걸친 안전성 연구를 수행하였으며 그 결과 본 과제에서 도출된 기능성식품 소재에 대한 자료를 확보하였음.

가. 마우스를 이용한 독성 스크리닝 실험

선행연구결과 선발된 후보소재에 대하여 본격적인 in vivo 효능 실험을 수행하기에 앞서 ICR mice를 이용한 독성 스크리닝을 실시하였음. 모든 후보소재를 2000 mg/kg 용량으로 5일간 경구투여 하여 임상 증상 및 실험동물의 치사 여부를 관찰하였음. 독성 스크리닝 결과 반수 이상의 실험동물의 사망이 관찰된 후보소재는 효능 실험에서 제외되었으며 나머지 소재는 DIO mice를 이용한 효능 스크리닝에 사용되었음.

나. 랫드를 이용한 단회 독성 시험

최종 후보소재에 대한 랫드에서의 단회독성 시험 결과 5000 mg/kg 투여 후 14일간 관찰시 이상증상 및 사망개체는 관찰되지 않았음.

다. 랫드를 이용한 14일 반복 경구 독성 시험

선발된 후보소재에 대하여 SD rat을 이용한 독성 스크리닝을 실시하였음. 효능이 확인된 개별 후보소재 및 합제된 후보소재에 대하여 14일간 1,000, 2,000 및 4,000 mg/kg의 용량으로 경구투여하면서 임상 증상, 체중, 사료 섭취량 및 장기 무게를 관찰하였고 사람을 대상으로 한 임상 시험의 IRB를 위하여 혈액학적 분석, 혈액생화학적 분석 및 조직병리학적 관찰은 GLP 기관에 의뢰하여 분석하였음. 독성 스크리닝 결과 독성이 의심되는 후보소재는 효능 실험에서 제외되었으며 나머지 소재

는 DIO mice 및 rat을 이용한 효능 스크리닝에 사용되었음.

라. 랫드를 이용한 28일 반복 경구 독성 시험

14일 반복 독성 시험에서 확인된 결과와 효능 시험에서 확인된 결과를 바탕으로 SD rat을 이용한 독성 스크리닝을 실시하였음. 최종 선발된 후보소재에 대하여 28일간 1,000, 2,000 및 4,000 mg/kg의 용량으로 경구투여하면서 임상 증상, 체중, 사료 섭취량 및 장기 무게를 관찰하였고 사람을 대상으로 한 임상 시험의 IRB를 위하여 혈액학적 분석, 혈액생화학적 분석 및 조직병리학적 관찰은 GLP 기관에 의뢰하여 분석하였음. 그 결과 후보소재의 NOAEL이 4,000 mg/kg 이상으로 판단되어 매우 안전한 물질임을 확인하였음.

마. 랫드를 이용한 GLP 90일 반복독성시험

228일 반복 독성 시험에서 확인된 결과를 바탕으로 SD rat을 이용한 독성 시험을 수행하고 있음. 최종 전임상 및 임상시험 후보에 대하여 약 90 일간 1,000, 2,000 및 4,000 mg/kg의 용량으로 경구 투여하면서 임상 증상, 체중, 사료 섭취량 및 장기 무게를 관찰하였고 이와 더불어 혈액학적 분석, 혈액생화학적 분석 및 조직병리학적 관찰도 수행하고 있음. 현재 투여군에 대하여 시료 처리가 종료되어 부검이 완료된 상태로 현재 혈액 마커 및 조직 분석을 위한 준비 중에 있음. 현재까지의 시험 진행 결과에서는 독성이 우려될 만한 소견이 관찰되지 않아 매우 안전할 것으로 예상됨.

제 5 절 기능식품 소재 개발 - 임상시험

1. 재료 및 방법

가. CRO 선정 : Aspireirb

본 과제 신청 시 제품의 상품화 및 사업화에 기재한 바와 같이, 유니젠은 중국, 미국, 유럽 등에 위치한 유니젠, 유니베라, 알로콧 지사를 통하여 국내외로의 생산, 판매 기반을 갖추고 있어 미국 등, 해외 판매를 통한 global 제품으로 사업화를 목표로 하고 있는 바, 비만 시장이 가장 큰 미국을 1차 타겟으로 삼고 미국인을 대상으로 임상시험을 수행하고자, 미국 내 주요 고객사인 Univera와 Basic Research사와의 미팅을 통하여 후보 소재 및 CRO를 선정하였음.

나. 임상시험 개요

(1) 임상시험 Site

Miami Research Associates (MRA)

(2) 임상 시험명

Double blind placebo controlled clinical trial to evaluate the effects of multiple proprietary herbal formulation on body weight and body composition in overweight and mildly obese healthy adults.

(3) 임상 시험 물질

Placebo, UP603(1,500, 2,250 mg/day) 및 UP601 (2250 mg/kg)

(4) 임상 시험 기간

총 12 주

(5) 임상 시험 대상자

20세 이상 65세 이하의 건강한 사람 (중등도의 비만을 가진 자), 총 120명

(6) 시험 진행 및 측정 마커

시험 대상자는 screening 및 randomization 을 위한 방문을 포함하여 전시험기간 중 총 5번의

센타 방문 및 방문 사이에 총 3회의 전화 응답을 통한 임상시험에 임하게 됨. 피험자의 센타 방문시 일반적인 신체상황 측정 및 혈액검사 등을 통한 다양한 마커에 대한 측정을 수행함. 특히 두 번째(시험 개시) 및 마지막 방문차시에는 dual x-ray absorptiometry(DXA) 를 수행하여 체성분을 분석하고자 함.

Table 3-30. Protocol outline for clinical trial

구분	내용
시험 유형	Double Blind Placebo controlled Study
시험 기간	12 weeks (screening -2)
군 구성	Dietary Supplement <ul style="list-style-type: none"> - ARM 1: Product A - ARM 2: Product B - ARM 3: Product C - ARM 4: Identical Placebo
1차 임상시험 마커	<ul style="list-style-type: none"> - % of subjects that achieved an average weight loss of > 5.0% of their body weight, compared to placebo (p<0.05). - Total Body weight changes - Body composition [total body fat (%), fat mass (grams), lean body mass (grams)] as evaluated by DEXA
2차 임상시험 마커	Satiety Evaluation
안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - Complete Chemistry profile - CBC/ PT/INR - UA - BP - Vitals - AEs
인정 기준	<ul style="list-style-type: none"> - body mass index (BMI) => 24.9 and < or = 34.9 at study entry - for females only: without childbearing potential or negative HCG hormone blood test and use of an appropriate form of contraception - signed informed consent form and HIPAA research authorization
제외 기준	<ul style="list-style-type: none"> - current use of fiber supplements - Untreated/unstable metabolic conditions known to influence weight status (e.g., hypothyroidism, type 2 diabetes mellitus, etc.) - gastrointestinal disorders that might cause complications or influence motility or satiety (e.g., diverticulitis, inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome, intestinal narrowing or obstruction, difficulty swallowing) - Stage II hypertension (> or = 160/100 mg Hg) - History of or Current dyslipidemia (fasting LDL cholesterol > or = 160 mg/dL; total cholesterol > or = 240 mg/dL; triglycerides > 200 mg/dL; HDL <

	<p>or = 40 mg/dL)</p> <ul style="list-style-type: none"> - fasting serum glucose > 126 mg/dL - fasting serum insulin outside reference range - acute or unstable cardiovascular, pulmonary, hepatic, renal, or psychiatric disorders - conditions for which weight loss may not be appropriate - use of medications that might affect weight or food absorption (e.g., diuretics, glucocorticoids, anorexigenic agents, Orlistat, laxatives) - use of Complementary Alternative Medicinal therapies that might affect weight - weight change of > 5% body weight within 3 months of entry into the study - active eating disorders or active participation in a weight loss program - renal function impairment as evidenced by a history of renal disease or a serum creatinine > 2.0 mg/dL or abnormal GFR - liver function impairment as evidenced by a history of liver disease or liver enzyme elevations outside the reference range. - Evidence of depression and or history as this may affect eating behavior and adherence to the study protocol - currently consumes > or = 10 alcoholic drinks/week, as determined by self-report - Exclude if recently quit smoking due to effects of nicotine on appetite - use of illicit drugs currently or in the last six months, as determined by self-report - for females only: exclude if pregnant, less than 6 months postpartum or 6 months post-termination of pregnancy, or currently lactating. - Significant psychiatric illness - History of protein wasting diseases or gout - Severe arthritis - Osteoporosis - Recent changes in diet habits (per example recently switch to vegetarian, etc.) - Had gastrointestinal surgery for treatment of obesity. - Are currently using warfarin, digoxin, oral anti-coagulants (other than aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs), oral or injectable corticosteroids (inhaled & intranasal corticosteroids are permitted), or antiretroviral medications.
<p>결과 분석</p>	<p>Data analysis plan to be developed, based on changes from baseline, statistical analysis of safety data and BW changes</p>

(7) IRB 승인

본 임상시험은 2013년 1월 17일에 IRB 승인을 받아 임상시험이 개시되었으며 현재 진행중에 있음.



11491 Lakeside Avenue
Sarasota, GA 32071

T: 813.465.0108
F: 813.469.4168

The difference is service.

STUDY APPROVAL NOTIFICATION

A Double Blind Placebo Controlled Clinical Trial To Evaluate the Effects of Two Proprietary Herbal Formulations on Body Weight and Body Composition in Overweight and Mildly Obese Healthy Adults

Sponsor: Unigen USA
Protocol Number: UNI-WT-2013
January 9, 2013

The new study listed above was reviewed at the **January 17, 2013** meeting of *Aspire IRB*. This study was approved at that time with no additional restrictions added to the conduct of the study.

Diane R. Krieger, MD was approved to conduct this study at the following locations:

**Miami Research Associates
6141 Sunset Drive, Suite 301
Miami, FL 33143**

You must use the enclosed approved Informed consent stamped with "Aspire IRB Approved" located at the bottom of each page.

The IRB has determined that your study is **Minimal** risk and assigned an approval period of **Annual** review. Approximately sixty days before the approval period ends **January 16, 2014**, as a reminder, you will receive a Research Status Report Form.

The Principal Investigator is responsible for providing the IRB with the necessary materials for re-approval by the due date provided on the form. **This form must be received by the due date to allow ample time for adequate review prior to the study's expiration date.** Missed submissions are the responsibility of the Principal Investigator regardless of whether or not the IRB notifies you.

The continuation of research after expiration of IRB approval is a violation of the regulations governing research.

www.aspire-irb.com

Figure 3-102. Study approval notification from IRB

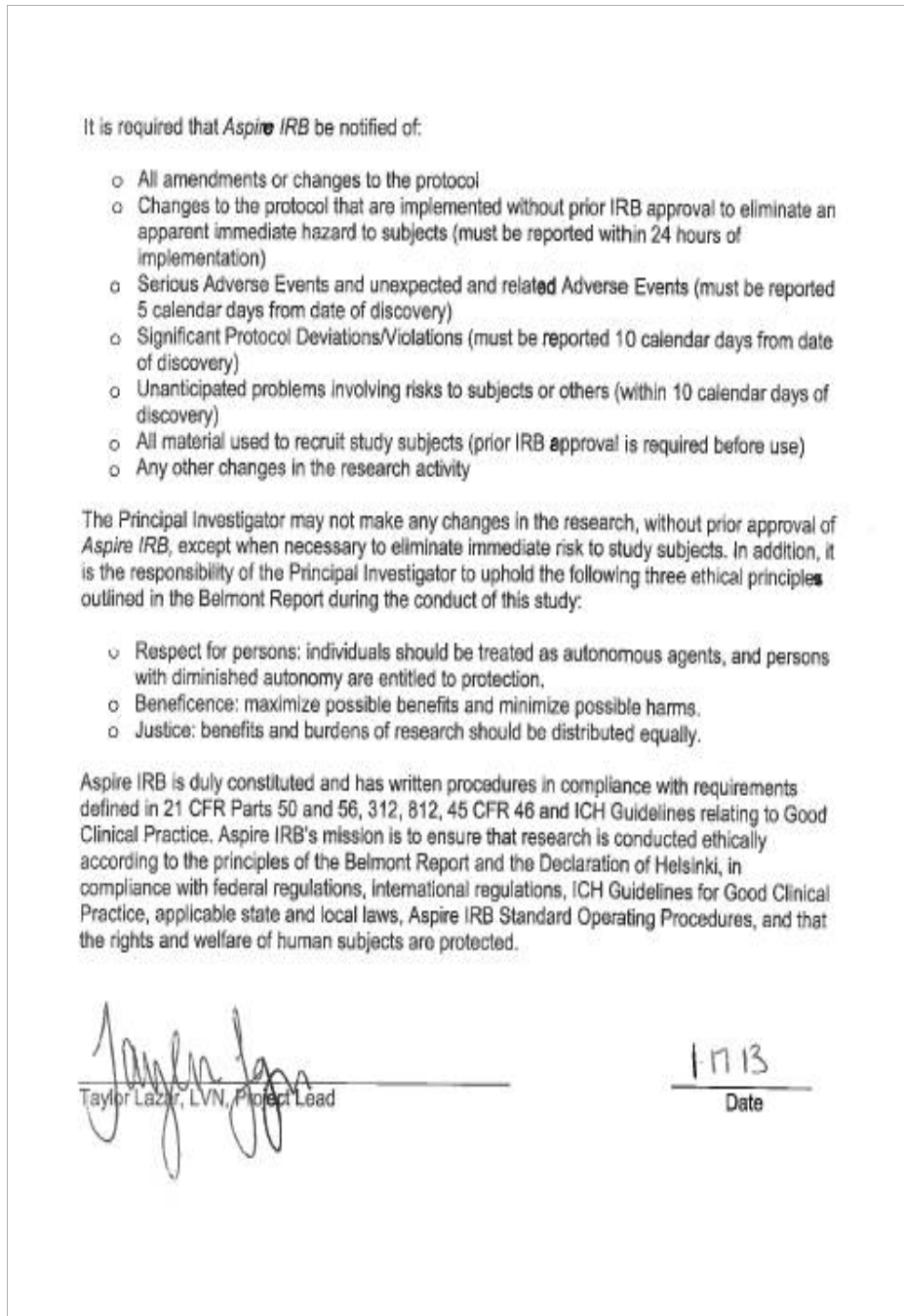


Figure 3-102 (continue). Study approval notification from IRB.

2. 결과 및 고찰

본 임상시험은 2013년 1월부터 시작하여 현재 122명의 환자가 randomized 되어있고 2013년 9월 시험을 종료하였음. 현재 임상시험 결과 분석 및 최종보고서를 작성 중에 있으면 보고서 초안은 2013년 10월 경에 완료될 예정임.

평가위원의 의견을 반영하여 IRB 승인서 및 임상시험 근거 자료로서 모니터링 보고서를 첨부

하였음.

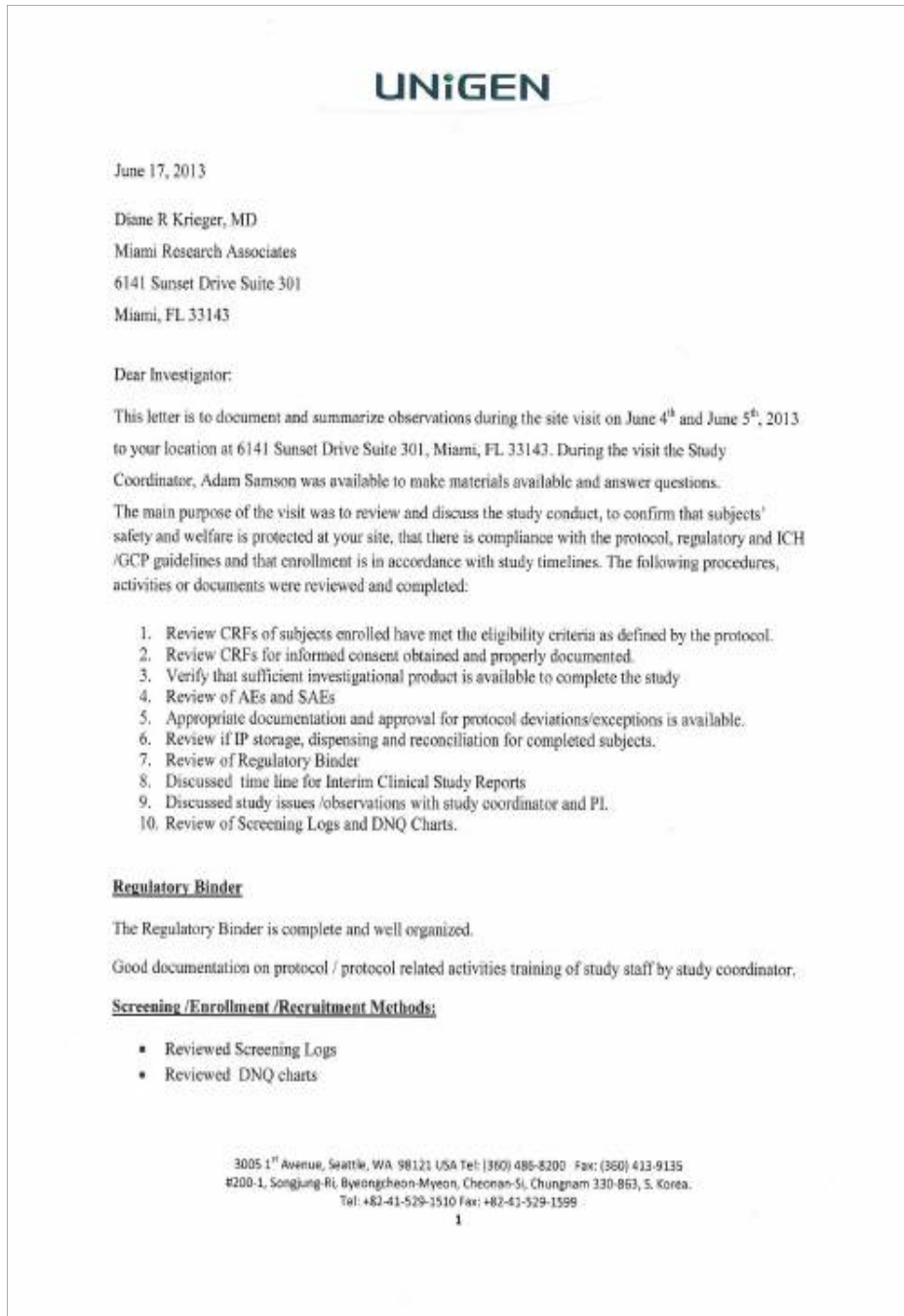


Figure 3-103. Monitoring report of clinical study.

UNiGEN

The following DNO charts were review for proper documentation and DNO rationale; no deficiencies noted for the following charts:

Subject Number	Initials	Subject Number	Initials	Subject Number	Initials
530	M-D	645	C-R	570	PRD
580	YJN	654	YNR	576	ABS
514	I-L	650	CML	607	TEA
577	BIL	642	L-R	610	R-R
595	YAV	644	M-R	575	T-B
567	KMS	641	A-V	563	RAG
571	T-E	635	JAR	552	D-E
568	MLG	638	L-M	616	FRD
520	S-H	540	M-M	633	L-C
507	M-S	547	Y-M	634	RRL
509	LEP	553	EJA	631	N-C
510	TFC	573	LLS	632	LGC
512	DJP	566	LMS	625	JOP
516	REB	583	CEV	651	KML
533	LLE	560	A-S	648	JRP
513	IMR	572	MIS	671	REA
525	G-P	538	YAC		

Informed Consent:

The CRF binders for the subjects reviewed contained the proper version of the ICF, signed by subject and study staff prior to start of any study procedures. A Spanish version of ICF was found when required.

Protocol Compliance:

Compliance with the protocol was good exceptions or deviations were documented.

Adverse Events/ Serious Adverse Events

Adverse Events and changes in health status were all well documented in the CRFs. Essential tracking, reporting , documenting , action taken, procedures performed, etc., were all well captured and documented as required.

Accurate, complete and current record keeping:

The following Randomized subjects CRFs were reviewed, all CRFs contained signed ICF.

3005 1st Avenue, Seattle, WA 98121 USA Tel: (360) 486-8200 Fax: (360) 413-9135
 #200-1, Songjung-Ri, Byeongcheon-Myeon, Cheonan-Si, Chungnam 330-863, S. Korea.
 Tel: +82-41-529-1510 Fax: +82-41-529-1599

Figure 3-103 (continue). Monitoring report of clinical study.

UNiGEN

Initials	Number	Findings
ASC	501-001	Low compliance V2 to V3
MCB	502-002	Low compliance V2- V3, Low compliance V 4-V5
D-L	504-017	None
K-S	506-004	Incorrect BMI calculated at V1. Calculated as 28 in CRF; should be 28.2.
A-P	508-006	No V5 lab data entered on data spreadsheet
A-T	511-008	Inconsistent use of subject number and screen number. Data Spreadsheet is not complete. V1 lab report does not clarify whether or not subject is fasting, however, lab requisition marked as fasting not lab report.
MGM	515-014	No V 5 lab data entered on data spreadsheet. Missing page 5 of 5 from 'Product Accountability'. Missing 'Adverse Events' reporting page.
I-P	517-032	No V5 Lab data entered on data spreadsheet. Missing 'Concurrent Medications' form. Missing page 5 of 5 'Product Accountability' page. Missing 'Adverse Events' page. V2 Insulin labs were done at Quest Diagnostics. Insulin reference ranges differ, discussed with Coordinator. Missing V5 lab report. Missing V5 DEXA
MSC	519-012	None
CVE	521-011	V1 lab report does not clarify whether or not subject is fasting
A-V	523-009	Incorrect BMI on data spreadsheet. No initials on many changes to the V5 lab data on the data spreadsheet.
A-M	524-024	No V5 Lab data entered on data spreadsheet. Missing 'Concurrent Medications' form. Missing page 5 of 5 'Product Accountability' page. Missing 'Adverse Events' page. Missing V5 lab report. Missing V5 DEXA Low compliance V2-V3
E-M	526-013	No V5 DEXA
G-G	527-015	No V5 lab data filled out on 'Data Spreadsheet'
YIH	528-021	No V5 Lab data entered on data spreadsheet. Missing 'Concurrent Medications' form. Missing page 5 of 5 'Product Accountability' page. Missing 'Adverse Events' page. Missing V5 lab report. Missing V5 DEXA ICF check list page 1 of 4 missing not checked
A-O	529-016	Note

3005 1st Avenue, Seattle, WA 98121 USA Tel: (360) 486-8200 Fax: (360) 413-9135
 #200-1, Songjung-Ri, Byeongcheon-Myeon, Cheonan-Si, Chungnam 330-863, S. Korea.
 Tel: +82-41-529-1510 Fax: +82-41-529-1599

Figure 3-103 (continue). Monitoring report of clinical study.

UNiGEN

ICG	531-030	No V5 Lab data entered on data spreadsheet. Missing 'Concurrent Medications' form. Missing page 5 of 5 'Product Accountability' page. Missing 'Adverse Events' page. Missing V5 lab report. Missing V5 DXA No V5 Insulin
A-H	532-018	V2 Low compliance due to missed breakfast No V5 lab data entered on data spreadsheet. Missing 'Adverse Events' page. Missing page 5 of 5 'Product Accountability' page.
SAI	535-019	No v5 lab data entered on the data spreadsheet. Missing page 5 of 5 'Product Accountability' page
HER	537-022	ICF check list page 1 of 4 missing checked No V5 Lab data entered on data spreadsheet. Missing "check-off" on page 1 of 4 of 'Informed Consent Check-off list'. Missing 'Concurrent Medications' form. Missing page 5 of 5 'Product Accountability' page. Missing 'Adverse Events' page. Missing V5 lab report. Missing V5 DEXA
E-G	539-023	No V5 Lab data entered on data spreadsheet. Missing 'Concurrent Medications' form. Missing page 5 of 5 'Product Accountability' page. Missing 'Adverse Events' page. Missing V5 lab report. Missing V5 DEXA
D-A	541-025	No V5 Lab data entered on data spreadsheet. Missing 'Concurrent Medications' form. Missing page 5 of 5 'Product Accountability' page. Missing 'Adverse Events' page. Missing V5 lab report. Missing V5 DEXA
PJS	542-034	Phone contact week 10 not made. Week 10 page1 is noted as ND. Phone call attempt was made and recorded in the notes section. V3 page 4 of 6, Meal plan review both boxes checked. Subject reported using CLA during the study (not clear about use , implicated with changes in body fat and lean muscle but not listed in protocol as excluded) No V5 Lab data entered on data spreadsheet. Missing 'Concurrent Medications' form. Missing page 5 of 5 'Product Accountability' page. Missing 'Adverse Events' page. Missing V5 lab report. Missing V5 DEXA
D-R	543-020	Missing V5 Lab Insulin No V5 lab data entered on data spreadsheet

3005 1st Avenue, Seattle, WA 98121 USA Tel: (360) 486-8200 Fax: (360) 413-9135
#200-1, Songjung-Ri, Byeongcheon-Myeon, Cheonan-Si, Chungnam 330-863, S. Korea
Tel: +82-41-529-1510 Fax: +82-41-529-1599

4

Figure 3-103 (continue). Monitoring report of clinical study.

UNiGEN

P-B	544-029	No V5 Lab data entered on data spreadsheet. Missing 'Concurrent Medications' form. Missing page 5 of 5 'Product Accountability' page. Missing 'Adverse Events' page. Missing V5 lab report. Missing V5 DEXA
LRR	545-026	No V5 Lab data entered on data spreadsheet. Missing 'Concurrent Medications' form. Missing page 5 of 5 'Product Accountability' page. Missing 'Adverse Events' page. Missing V5 lab report. Missing V5 DEXA
RSM	550-033	No V5 Lab data entered on data spreadsheet. Missing 'Concurrent Medications' form. Missing page 5 of 5 'Product Accountability' page. Missing 'Adverse Events' page. Page 2 of 18 at V1 display a '0' on No and a '1' on Yes. Missing V5 lab report. Missing V5 DEXA
A-S	551-126	No V5 Lab data entered on data spreadsheet. Missing 'Concurrent Medications' form. Missing page 5 of 5 'Product Accountability' page. Missing 'Adverse Events' page. Missing V5 lab report. Missing V5 DEXA

Investigational Product:

The Investigational product was stored in a limited access area under the recommended conditions, dispensed and returned product was tracked by the study staff. Product accountability was performed for returned product and discussed with study coordinator, product was left on site and coordinator was instructed to sequester reconciled product away from other in use investigational product until next site visit.

During product reconciliation with study staff at the site the following observations were noted:

UNI-WT-2013 Site Visit 6/4-6/5 BKC
Site Location: Miami Research Associates, 6141 Sunset Drive, Ste. 301 Miami, FL 33143
Subject 002:
Missing 2 V4 bottles.
Subject 010:
V2 bottle qty is not filled in on bottle.
Subject 011:
Incorrect V2 bottle count in CRF, it is correct on bottle. Bottle reads 49 and binder reads 48.
Subject 012:
V2 bottle qty is not filled in on bottle.

3005 1st Avenue, Seattle, WA 98121 USA Tel: (360) 486-8200 Fax: (360) 413-9135
#200-1, Songjung-Rl, Byeongcheon-Myeon, Cheonan-Si, Chungnam 330-863, S. Korea
Tel: +82-41-529-1510 Fax: +82-41-529-1599

Figure 3-103 (continue). Monitoring report of clinical study.

UNiGEN

Subject 014:
V3 bottle count is wrong on bottle. Bottle reads 8, should read 18 as counted. CRF reads 18.
Missing 1 V4 bottle.
Subject 019:
Inconsistent V4 dispense date. Bottle reads 4/18 and CRF reads 4/19.
Subject 020:
Incorrect V3 bottle count in CRF and on bottle. Bottle reads 43, should read 46 as counted.
Missing 1 V3 bottle.
Subject 022:
Missing 1 V4 bottle.

The majority of the CRF's were reviewed on the 4th of June, lab reports and DEXA reports were available on June 5th and staff was actively filing the reports. For those charts listing missing V5 labs the follow up requested is for the site to verify that labs were collected, tests ordered and reports filed in the subjects binder.

The Investigational product was discussed with the coordinator and corrections were going to be completed by site. Follow up requested, complete corrections where applicable.

It was a pleasure to spend time at your site and with the study staff, and get acquainted with the efforts in place to collect quality data and complete the study.

We value the collaboration with your site, the receptiveness, professionalism and cooperative nature of your staff and we are looking forward to the completion of this project. The next site visit will be at study close out and we will schedule as we get closer to study completion.

Please do not hesitate to contact us if you have any questions about this report.

Sincerely



Lidia Alfaro Brownell
VP, Clinical Research and Regulatory Compliance.

UNiGEN
3005 1st Avenue
Seattle, WA 98121
L.Brownell@unigen.net
360-486-8200 ext 1525
www.Unigen.net

3005 1st Avenue, Seattle, WA 98121 USA Tel: (360) 486-8200 Fax: (360) 413-9135
#200-1, Songjung-Ri, Byeongcheon-Myeon, Cheonan-Si, Chungnam 330-863, S. Korea.
Tel: +82-41-529-1510 Fax: +82-41-529-1599

Figure 3-103 (continue). Monitoring report of clinical study.

제 6 절 기능식품 소재 개발 - 소재의 제품화에 관한 연구

1. 전임상 후보 물질에 대한 유효성분 분석

가. 재료 및 방법

LC/MS를 활용하여 화합물의 분자량을 확인하고, $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 및 2D-NMR을 활용하여 그 화학적 구조를 동정하였음. 입체적 구조는 NOE 및 NOESY를 활용하고, 경우에 따라서는 Mosher ester 분석법 (Nature Protocols 2, - 2451 - 2458, 2007)을 이용하여 반합성 및 NMR상의 Chemical shift변화 분석을 통하여 구조를 확인하였음.

나. 결과 및 고찰

(1) LC/MS 를 활용한 유효성분에 대한 연구

(가) P9071

지표 성분을 LC/MS를 활용하여 화합물의 분자량을 확인한 결과, 표와 같이 Peak 1은 353.0893, Peak 2는 353.0875, Peak 3은 195.0874, Peak4는 515.1194 Peak 5는 515.1202, Peak 6은 609.1480, Peak 7은 515.1193 그리고 Peak 8은 463.0085로 확인되었음.

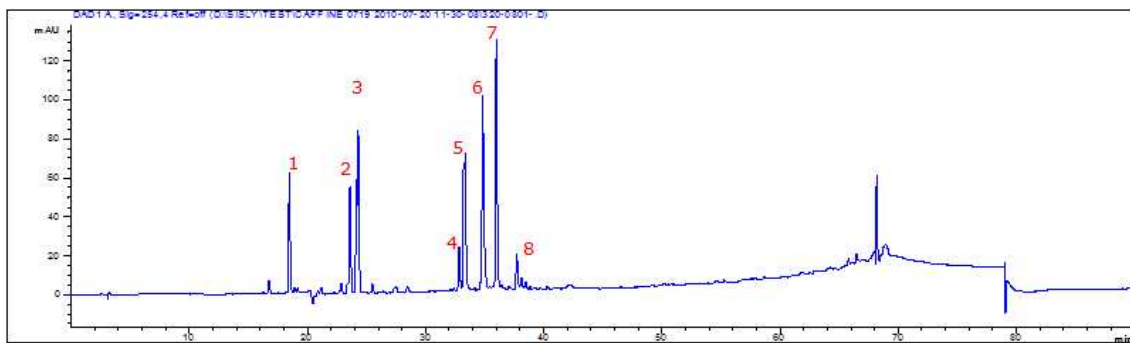


Figure 3-104. HPLC chromatogram of P9071 extract at 210nm.

Table 3-31. LC/MS results of P9071 extract.

Peak No.	Retention time	Observed molecular weight
1	17.264	353.0893
2	21.916	353.0875
3	22.602	195.0874
4	29.913	515.1194
5	30.280	515.1202
6	31.688	609.1480
7	32.671	515.1193
8	34.252	463.0085

(나) UG0602

지표 성분을 LC/MS를 활용하여 화합물의 분자량을 확인한 결과표와 같이 Peak 1은 266.334 그리고 Peak 2는 266.334로 확인되었음.

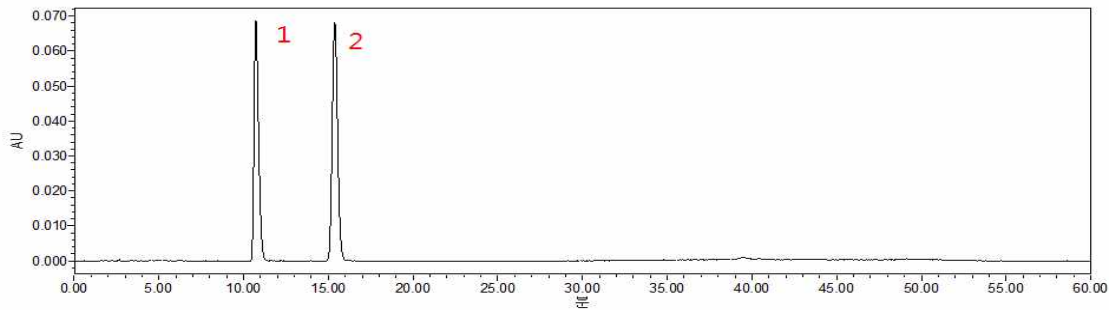


Figure 3-105. HPLC chromatogram of UG0602 extract at 245nm.

Table 3-32. LC/MS results of UG0602.

Peak	Retention time	Observed molecular weight
1	10.971	266.334
2	15.586	266.334

(다) UP438

지표 성분을 LC/MS를 활용하여 화합물의 분자량을 확인한 결과, 표와 같이 Peak 1은 692/18 로 확인되었음.

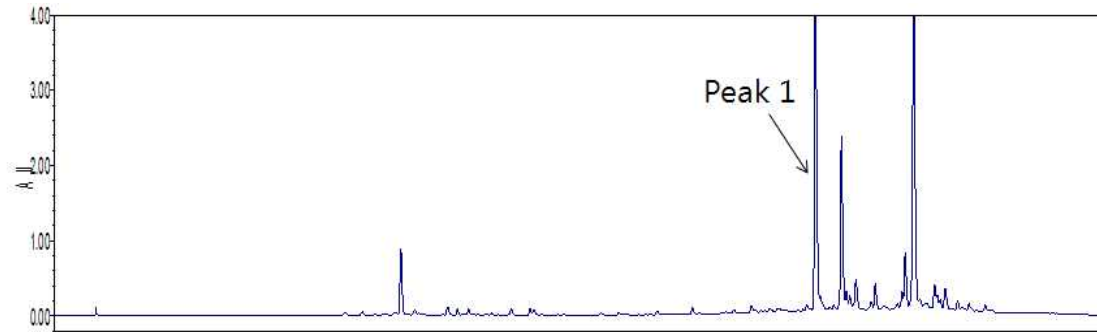


Figure 3-106. HPLC chromatogram of UP438 extract at 285nm.

UP438로부터 분리한 RN367-29-#17의 $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ 분석을 통하여 prenylated flavonoid dimer 계통의 화합물임을 확인하였음.

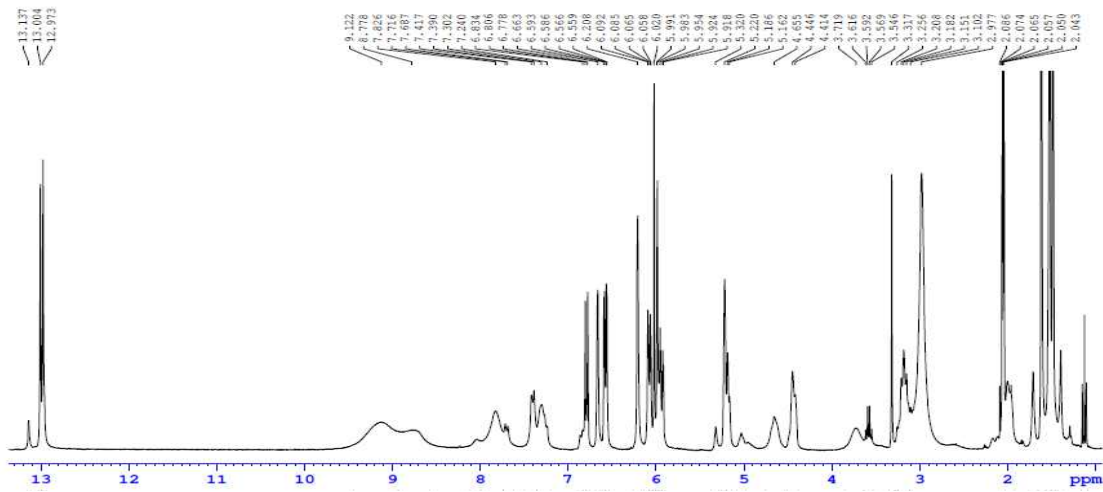


Figure 3-107. $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -acetone, 300MHz) spectrum of RN367-29-#17 from UP438.

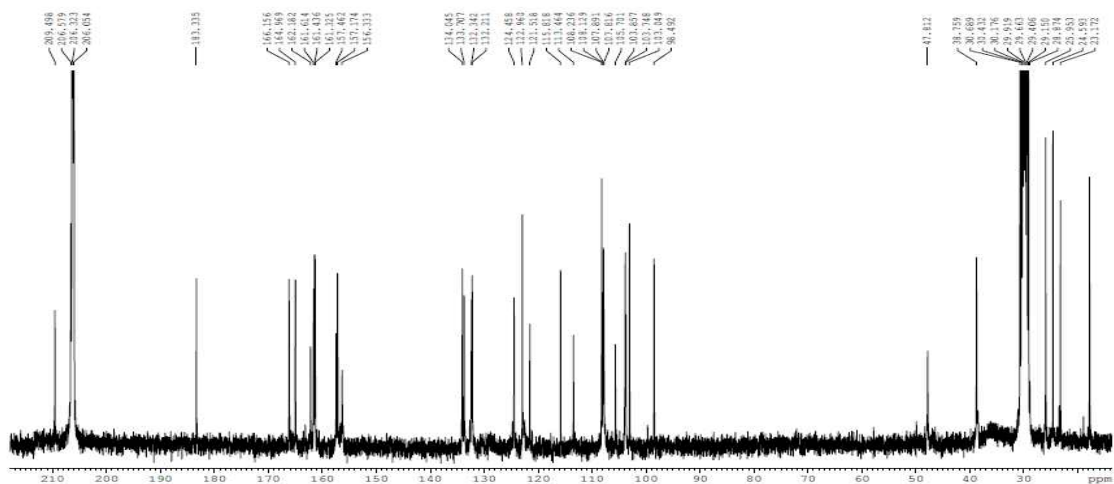


Figure 3-108. $^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -acetone, 75MHz) spectrum of RN367-29-#17 from UP438.

지표 성분을 LC/MS를 활용하여 화합물의 분자량을 확인한 결과, 표와 같이 Peak 1은 692.18로 확인되었음.

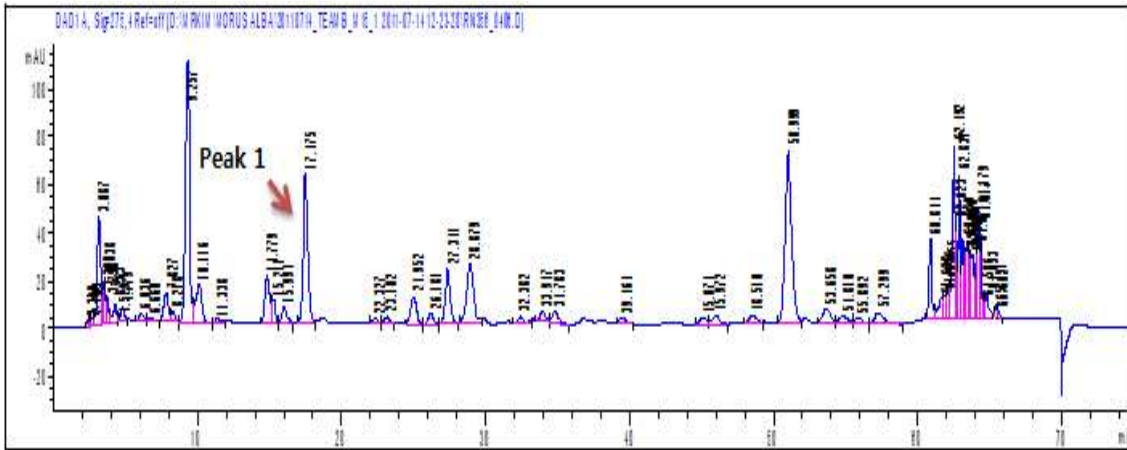


Figure 3-109. HPLC chromatogram of UP438 extract at 275nm.

Table 3-33. LC/MS results of UP438.

Peak	Retention time(min)	Observed molecular weight
1	17.475	692.18

(라) P01999

지표 성분을 LC/MS를 활용하여 화합물의 분자량을 확인한 결과, 표와 같이 Peak 1은 579.1169, Peak 2는 595.1098, Peak 3은 579.1404, Peak4는 291.0805 Peak 5는 867.1974 그리고 Peak 6은 563.1220으로 확인되었음.

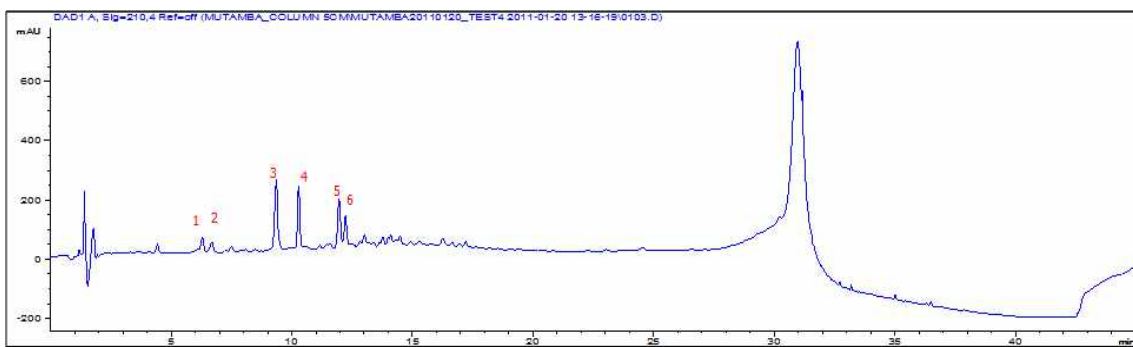


Figure 3-110. HPLC chromatogram of P01999 extract at 210nm.

Table 3-34. LC/MS results of P01999.

Peak	Retention time(min)	Observed molecular weight
1	6.410	579.1169
2	6.785	595.1098
3	9.391	579.1404
4	10.306	291.0805
5	11.976	867.1974
6	12.229	563.1220

(마) UP331

지표 성분을 LC/MS를 활용하여 화합물의 분자량을 확인한 결과, 표와 같이 Peak 1은 330.42, Peak 2는 332.42, Peak 3은 456.7로 확인되었음.

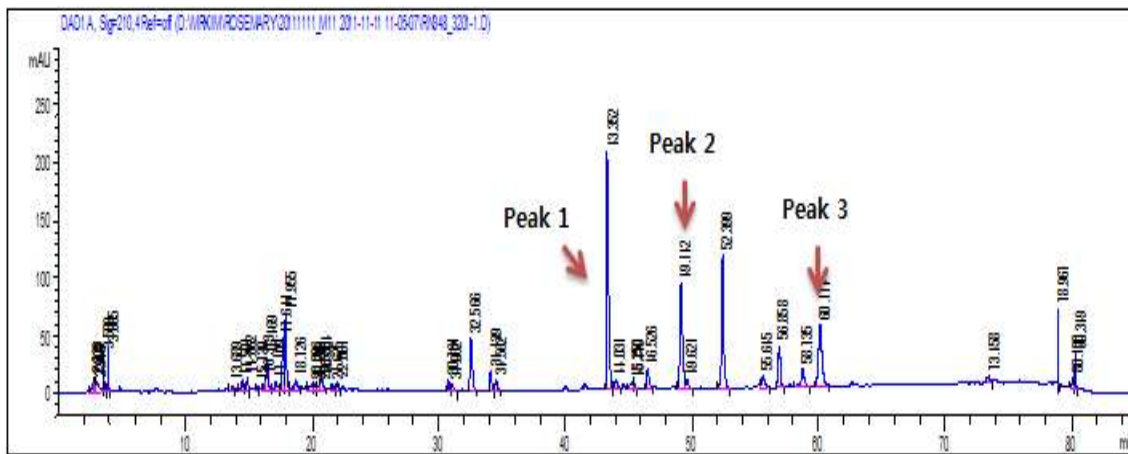


Figure 3-111. HPLC chromatogram of UP331 extract at 210nm.

Table 3-35. LC/MS results of UP331.

Peak	Retention time(min)	Observed molecular weight
1	43.352	330.42
2	49.192	332.42
3	60.174	456.7

(바) UP342

지표 성분을 LC/MS를 활용하여 화합물의 분자량을 확인한 결과, 표와 같이 Peak 1은 342.17, Peak2는 342.17로 확인되었음.

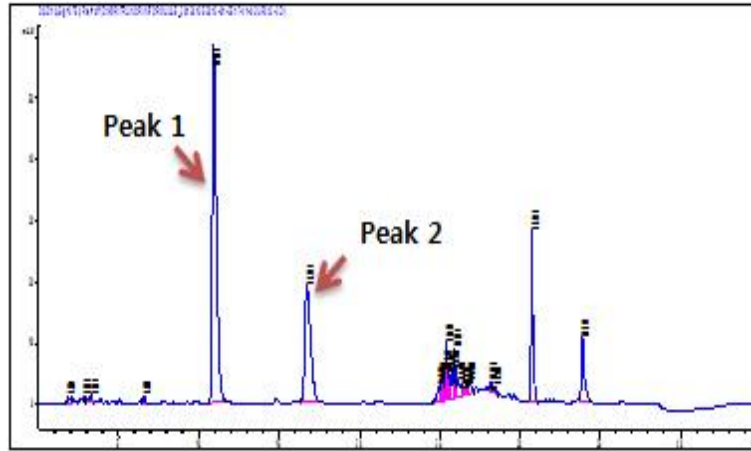


Figure 3-112. HPLC chromatogram of UP342 extract at 275nm.

Table 3-36. LC/MS results of UP342.

Peak	Retention time(min)	Observed molecular weight
1	10.956	342.17
2	16.714	342.17

2. 전임상 및 임상시험 소재에 대한 표준추출물 및 품질관리를 위한 분석법 개발

가. 재료 및 방법

분석법은 HPLC-PDA/UV를 활용하여 분석법 개발을 진행하였고 미량 시료의 분석일 경우 HPLC-RI/MS, GC-FID/MS, HPTLC 등을 활용하기도 함. 신뢰성 있는 분석법을 개발하기 위해 직선성, 정량한계, 검출한계, 정확성, 정밀성에 대하여 Validation을 수행하였음.

(1) 시료

UP9071, UP0602, UP438, UP1999, UP331, 3COM-W17 S1, 3COM-W17 S3, 3COM-W17 S5

(2)시약 및 용매

HPLC grade인 methanol, acetonitril을 사용하였고 3차 증류수를 사용. phosphoric acid, trifluoroacetic acid, acetic acid는 ACS reagent garde를 사용하였으며, 표준품은 시그마에서 구입하였고, 시중에 판매하지 않는 것은 (주)유니젠의 QA에 의해서 COA가 발행된 working 표준품을 사용하였음.

(3) 기구 및 기기

Autosampler vial, autosampler vial cap, C18 column (5um, 4.6*250nm), C18 security guard cartridge, 0.45um nylon syringe filter, 0.45um CA syringe filter, 0.45um PTFE syringe filter
HPLC system: Agilent system - UV/PDA detector, autosampler, column oven, multi-channels pump, vacuum degasser and chemstation data management program.

나. 결과 및 고찰

(1) 전임상 후보 물질에 대한 분석법

(가) P9071에 대한 분석법 개발

P9071 및 Composition 중 P9071의 유효성분을 정량하기 위한 HPLC 분석방법.

① HPLC 분석 조건

- 기기: HPLC/PDA
- 컬럼: C18 column
- 이동상: 100 % methanol, 0.1 % phosphoric acid buffer
- 1 ml/min의 유속으로 275nm에서 gradient 방법으로 분석

Table 3-37. Mobile phase.

시간 (분)	A%	B%
0	5	95
5	5	95
65	100	0
75	100	0
80	5	95
90	5	95

② 시료 및 표준품 준비 조건

- 시료: 100 % methanol을 추출 용매로 사용 하여 30분 동안 sonication 한 다음 0.45 μ m의 PTFE filter로 filter 한 다음 HPLC에 주입.
- 표준품: Peak 1을 sigma-aldrich로 부터 구입하여 3가지 다른 농도의 표준용액을 제조하여 HPLC에 주입.

③ 결과 계산

- 표준용액을 HPLC에 주입하여 얻어진 peak의 면적으로부터 검량선을 작성 한 다음 시료용

액을 HPLC에 주입하여 얻어진 peak의 면적을 검량선을 이용하여 시험용액 중 peak 1 농도를 구한 후 다음 식을 이용하여 시료 중 peak 1 함량을 계산하였음.

$$\text{Peak 1 함량 (mg/g)} = \frac{A}{S} \times \frac{B}{S}$$

A: 시험용액 중 Peak 1의 농도 ($\mu\text{g/mL}$)

B: 시험용액의 전량 (mL), S: 시료 채취량 (mg)

④ 크로마토그램

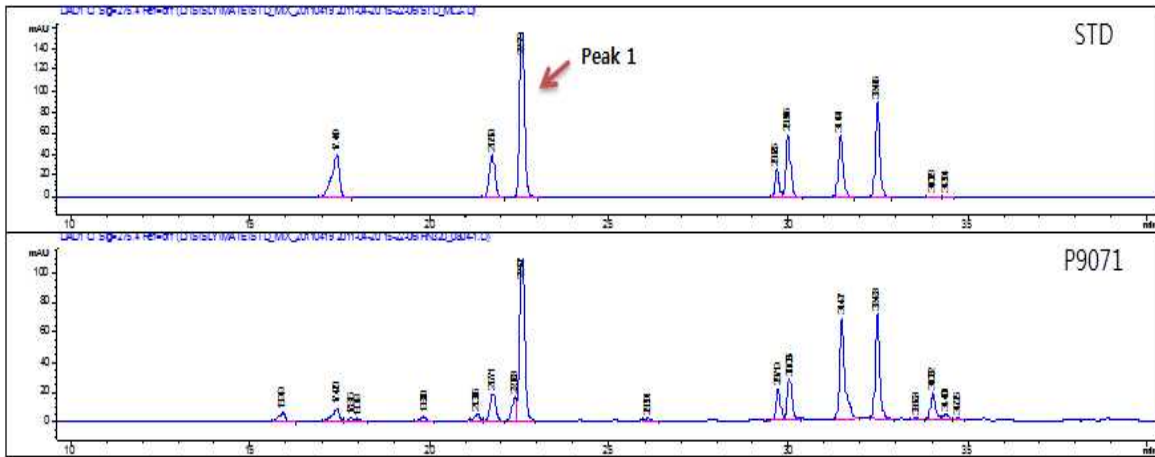


Figure 3-113. HPLC chromatogram of standard and P9071.

(나) UG0602 에 대한 분석법 개발

UG0602 및 Composition 중 UG0602의 유효성분을 정량하기 위한 HPLC 분석방법.

① HPLC 분석 조건

- 기기: HPLC/PDA
- 컬럼: C18 column
- 이동상: 100 % methanol, 100 % water
- 1 ml/min의 유속으로 290 nm에서 gradient 방법으로 분석

Table 3-38. Mobile phase.

시간 (분)	A%	B%
0	23	77
18	23	77
18.1	0	100
25	0	100
25.1	23	77
30	23	77

② 시료 및 표준품 준비 조건

- 시료: 100 % methanol을 추출 용매로 사용 하여 30분 동안 sonication 한 다음 0.45 μm의 PTFE filter로 filter 한 다음 HPLC에 주입.
- 표준품: Peak 1과 2를 3가지 다른 농도의 표준용액을 제조하여 HPLC에 주입.

③ 결과 계산

- 표준용액을 HPLC에 주입하여 얻어진 peak의 면적으로부터 검량선을 작성 한 다음 시료용액을 HPLC에 주입하여 얻어진 peak의 면적을 검량선을 이용하여 시료용액 중 peak 1과 2 농도를 구한 후 다음 식을 이용하여 시료 중 peak 1과 2 함량을 계산하였음.

$$\text{Peak 1 및 2 함량 (mg/g)} = \frac{A}{S} \times \frac{B}{C}$$

A: 시료용액 중 compound B 또는 C의 농도 (μg/mL)

B: 시료용액의 전량 (mL), S: 시료 채취량 (mg)

④ 크로마토그램

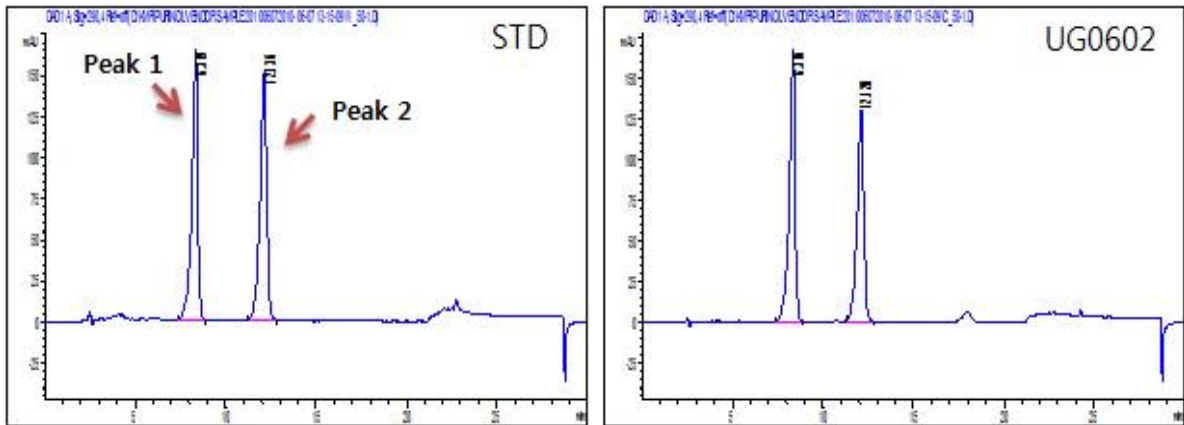


Figure 3-114. HPLC chromatogram of standard and UG0602..

(다) UP438 에 대한 분석법 개발

UP438 및 Composition 중 UP438의 유효성분을 정량하기 위한 HPLC 분석방법.

① HPLC 분석 방법 조건

- 기기: HPLC/PDA
- 컬럼: C18 column
- 이동상: 100 % methanol, 0.1 % phosphoric acid buffer
- 0.8 ml/min의 유속으로 275 nm에서 gradient 방법으로 분석.

Table 3-39. Mobile phase.

시간 (분)	A%	B%
0	50	50
5	50	50
30	80	20
30.5	50	50
35	50	50

② 시료 및 표준품 준비

- 시료: 100 % methanol을 추출 용매로 사용 하여 30분 동안 sonication 한 다음 0.45 μ m의 PTFE filter로 filter 한 다음 HPLC에 주입.
- 표준품: Peak 1, 2 및 3은 시중에서 판매하지 않으므로 표준 추출물을 정량하여 이를 working 표준품으로 사용하였고, 이 working 표준품을 3가지 다른농도의 표준용액으로 제조하여 HPLC에 주입.

③ 결과 계산

- 표준용액을 HPLC에 주입하여 얻어진 peak의 면적으로부터 검량선을 작성 한 다음 시료용액을 HPLC에 주입하여 얻어진 peak의 면적을 검량선을 이용하여 시험용액 중 Peak 1, 2 및 3 농도를 구한 후 다음 식을 이용하여 시료 중 Peak 1, 2 및 3 함량을 계산하였음.

$$\text{Peak 1 및 2 및 3 함량 (mg/g)} = A \times \frac{B}{S}$$

A: 시험용액 중 Peak 1, 2 및 3의 농도 (μ g/mL)

B: 시험용액의 전량 (mL), S: 시료 채취량 (mg)

④ 크로마토그램

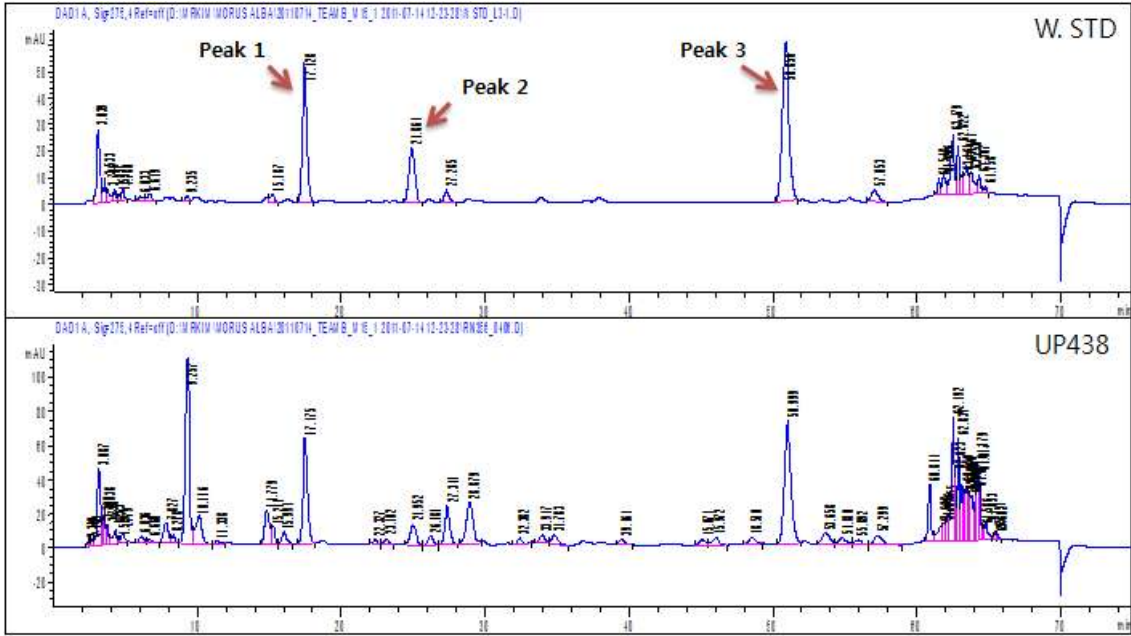


Figure 3-115. HPLC chromatogram of working standard and UP438.

(라) P01999 에 대한 분석법 개발

P01999 및 Composition 중 P01999의 유효성분을 정량하기 위한 HPLC 분석방법.

① HPLC 분석 조건

- 기기: HPLC/PDA
- 컬럼: C18 column
- 이동상: 100 % acetonitril, 0.05 % trifluoroacetic acid buffer
- 0.8 ml/min의 유속으로 275 nm에서 gradient 방법으로 분석

Table 3-40. Mobile phase.

시간 (분)	A%	B%
0	8	92
10	17	83
20	19.4	80.6
25	22.6	77.4
28	29.8	70.2
30	65	35
38	100	0
40	100	0
42	8	92
45	8	92

② 시료 및 표준품 준비 조건

- 시료: 50 % methanol을 추출 용매로 사용 하여 30분 동안 sonication 한 다음 0.45 μm의 nylon filter로 filter 한 다음 HPLC에 주입.
- 표준품: Peak 1 및 2를 3가지 다른 농도의 표준용액을 제조하여 HPLC에 주입.

③ 결과 계산

- 표준용액을 HPLC에 주입하여 얻어진 peak의 면적으로부터 검량선을 작성 한 다음 시료용액을 HPLC에 주입하여 얻어진 peak의 면적을 검량선을 이용하여 시험용액 중 Peak 1 및 2 농도를 구한 후 다음 식을 이용하여 시료 중 Peak 1 및 2 함량을 계산하였음.

$$\text{Peak 1 및 2 함량 (mg/g)} = A \times \frac{B}{S}$$

- A: 시험용액 중 Peak 1 및 2의 농도 (μg/mL)
- B: 시험용액의 전량 (mL), S: 시료 채취량 (mg)

④ 크로마토그램

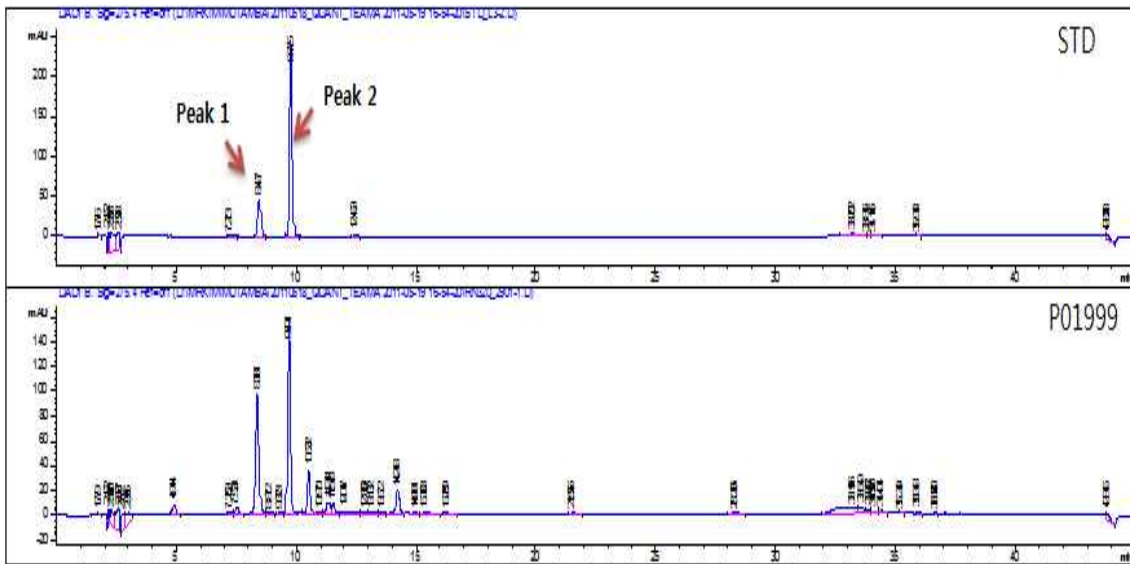


Figure 3-116. HPLC chromatogram of standard and P01999.

(마) UP331 에 대한 분석법 개발

UP331 및 Composition 중 UP331의 유효성분을 정량하기 위한 HPLC 분석방법.

① HPLC 분석 조건

- 기기: HPLC/PDA
- 컬럼: C18 column
- 이동상: 100 % acetonitril, 0.1 % phosphoric acid buffer
- 1 ml/min의 유속으로 275 nm에서 gradient 방법으로 분석

Table 3-41. Mobile phase.

시간 (분)	A%	B%
0	15	85
5	15	85
20	35	65
70	100	0
75	100	0
77	15	85
85	15	85

② 시료 및 표준품 준비 조건

- 시료: 100 % methanol을 추출 용매로 사용 하여 30분 동안 sonication 한 다음 0.45 μm의 PTFE filter로 filter 한 다음 HPLC에 주입.
- 표준품: Peak 1, 2 및 3을 3가지 다른 농도의 표준용액을 제조하여 HPLC에 주입.

③ 결과 계산

- 표준용액을 HPLC에 주입하여 얻어진 peak의 면적으로부터 검량선을 작성 한 다음 시료용액을 HPLC에 주입하여 얻어진 peak의 면적을 검량선을 이용하여 시험용액 중 Peak 1, 2 및 3 농도를 구한 후 다음 식을 이용하여 시료 중 Peak 1, 2 및 3 함량을 계산하였음.

$$\text{Peak 1, 2 및 3 함량 (mg/g)} = \frac{A}{S} \times \frac{B}{S}$$

A: 시험용액 중 Peak 1, 2 및 3의 농도 (μg/mL)

B: 시험용액의 전량 (mL), S: 시료 채취량 (mg)

④ 크로마토그램

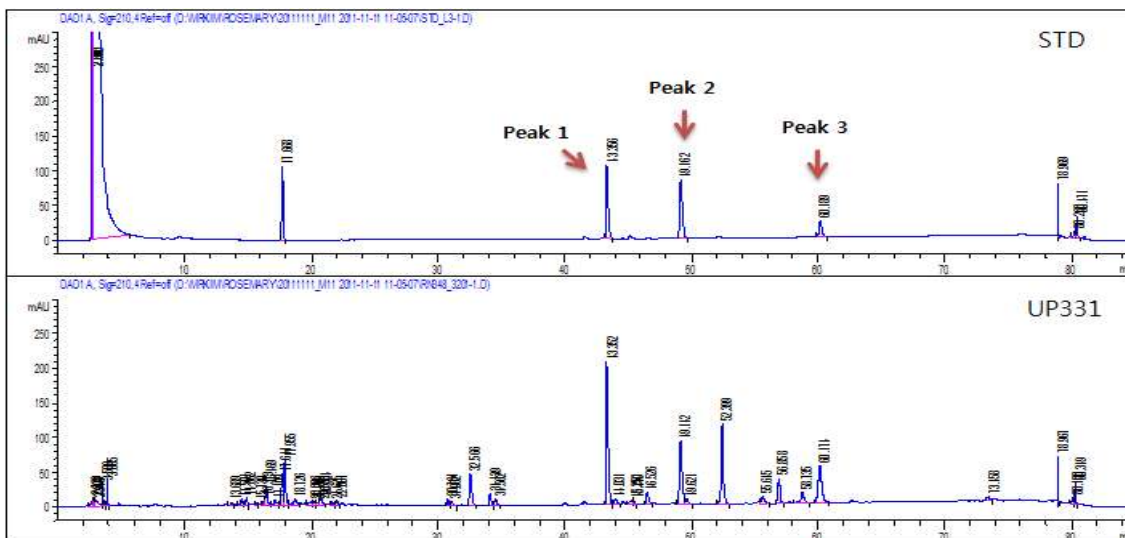


Figure 3-117. HPLC chromatogram of standard and UP331.

(바) UP342 에 대한 분석법 개발

UP342 및 Composition 중 UP342의 유효성분을 정량하기 위한 HPLC 분석방법.

① HPLC 분석 조건

- 기기: HPLC/PDA
- 컬럼: C18 column
- 이동상: 100 % methanol, 0.1 % acetic acid buffer
- 1 ml/min의 유속으로 275 nm에서 gradient 방법으로 분석

Table 3-42. Mobile phase

시간 (분)	A%	B%
0	12	88
20	12	88
20.1	80	20
30	80	20
30.1	12	88
35	12	88

② 시료 및 표준품 준비조건

- 시료: 100 % methanol을 추출 용매로 사용 하여 30분 동안 sonication 한 다음 0.45 μm의 PTFE filter로 filter 한 다음 HPLC에 주입.
- 표준품: Peak 1을 3가지 다른 농도의 표준용액을 제조하여 HPLC에 주입.

③ 결과 계산

- 표준용액을 HPLC에 주입하여 얻어진 peak의 면적으로부터 검량선을 작성 한 다음 시료용액을 HPLC에 주입하여 얻어진 peak의 면적을 검량선을 이용하여 시험용액 중 peak 1 농도를 구한 후 다음 식을 이용하여 시료 중 peak 1 함량을 계산하였음.

$$\text{Peak 1 함량 (mg/g)} = A \times \frac{B}{S}$$

A: 시험용액 중 Peak 1의 농도 (μg/mL)

B: 시험용액의 전량 (mL), S: 시료 채취량 (mg)

④ 크로마토그램

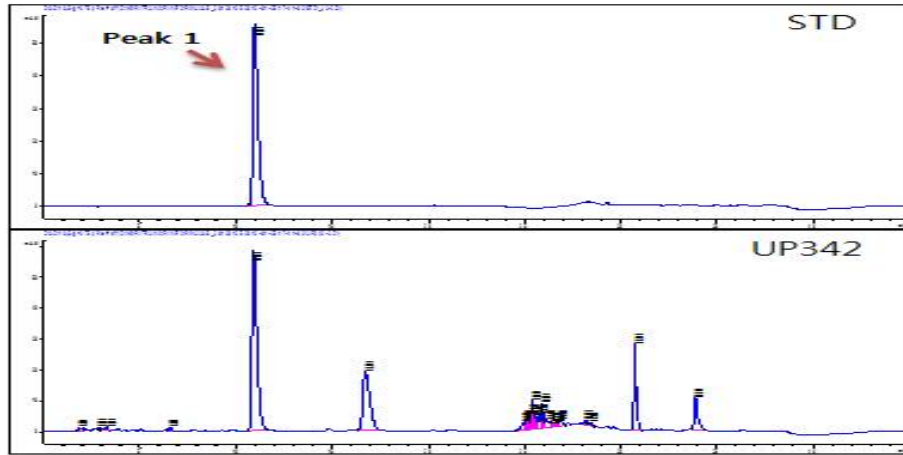


Figure 3-118. HPLC chromatogram of standard and UP342.

(2) 전임상 및 임상시험 물질에 대한 분석법

(가) 3COM-W17S1 (UP601) 에 대한 분석법 개발

3COM-W17S1 (UP601) 의 유효성분을 정량하기 위한 HPLC 분석방법. 이 방법은 제품화 및 상업화를 위한 품질관리분석법으로 활용되었음.

① HPLC 분석 조건

- 기기: HPLC/PDA
- 컬럼: C18 column
- 이동상: 100% acetonitril, 0.1% phosphoric acid buffer
- 1ml/min의 유속으로 270nm에서 gradient 방법으로 분석

Table 3-43. Mobile phase.

시간 (분)	A%	B%
0.0	80	20
10.0	65	35
11.0	55	45
15.0	50	50
16.0	40	60
25.0	30	70
40.0	10	90
40.5	80	20
45.0	80	20

② 시료 및 표준품 준비조건

- 표준품: Peak 1은 시그마에서 구입하였고 Peak 2 및 3은 Honsea Sunshine Biotech 로부터 구입하였음. Peak 4, 5 및 6은 시중에서 판매하지 않으므로 표준 추출물을 정량하여 이를 working 표준품으로 사용하였음. 3개의 표준품과 1개의 working 표준품을 100% methanol을 추출 용매로 사용하여 10분 동안 초음파 추출. 0.45um cellulose acetate (CA) syringe filter로 filter 한 다음 HPLC 주입
- 시료: 100% methanol을 추출 용매로 사용 하여 30분 동안 sonication 한 다음 0.45um의 CA filter로 filter 한 다음 HPLC에 주입

③ 결과 계산

- 표준용액을 HPLC에 주입하여 얻어진 결과로부터 response factors를 구하여 시료의 값을 아래와 같은 식을 이용하여 계산하였음.

* Response factors

$$RF \text{ (response factor)} = \frac{(W/V) \times P/100 \times (1-(LOD/100))}{A}$$

W: 표준품 무게 (mg)

V: 표준용액의 부피 (ml)

P: 표준품의 순도 (%)

LOD: 수분함량 (%)

A: 표준품의 peak area

* 시료 계산

$$Wt\% = \frac{A_{\text{sample}} \times RF}{(W_{\text{sample}}/V_{\text{sample}}) \times (1-(LOD/100))} \times 100$$

A_{sample}: 시료에서의 peak area

W_{sample}: 시료 무게 (mg)

V_{sample}: 시료 부피 (ml)

④ 크로마토그램

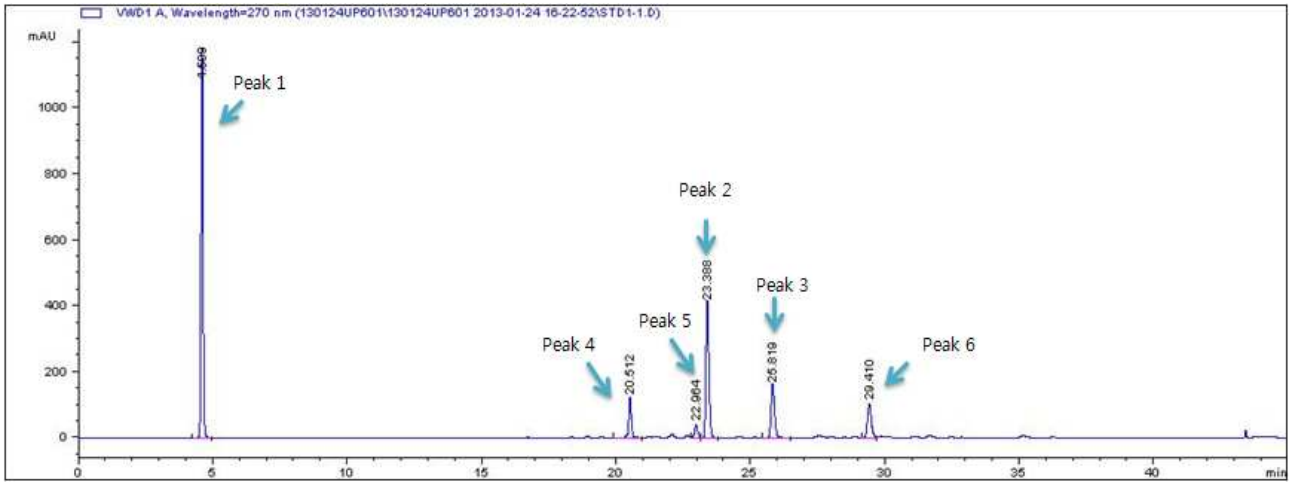


Figure 3-119. HPLC chromatogram of standards.

Peak 1; Caffeine, Peak 2; Honokiol, Peak 3; Magnolol, Peak 4; Kuwanon G, Peak 5; Albanin, Peak 6; Morusin.

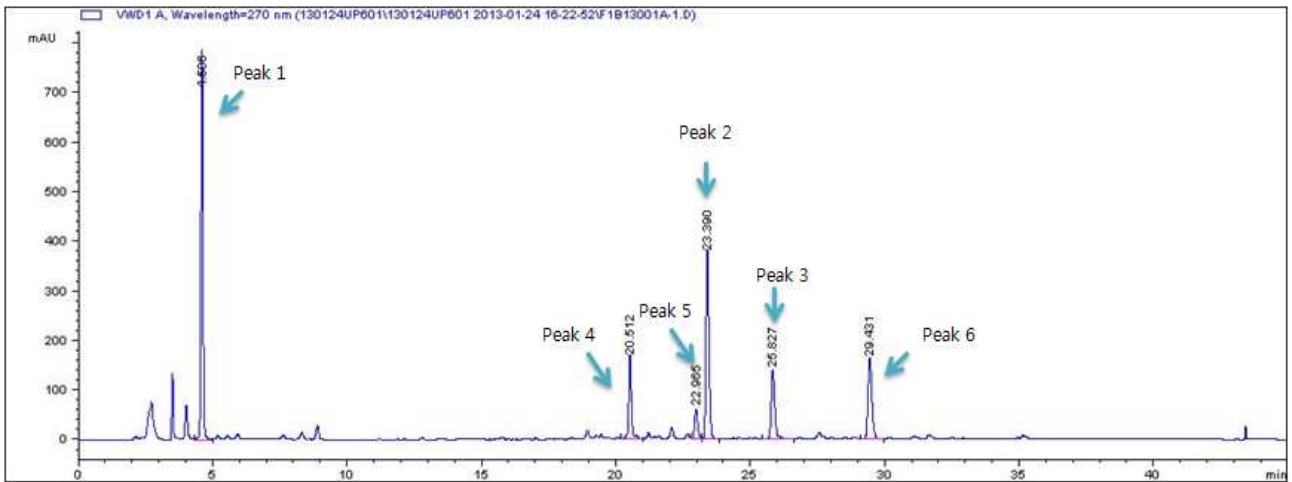


Figure 3-120. HPLC chromatogram of 3COM-W17 S1.

Peak 1; Caffeine, Peak 2; Honokiol, Peak 3; Magnolol, Peak 4; Kuwanon G, Peak 5; Albanin, Peak 6; Morusin.

⑤ 기준 규격




UNIGEN		SPECIFICATION	Doc. #: Spec-075 Rev. #: 001	Effective Date: 12/02/2011
PRODUCT SPECIFICATION				
PRODUCT:	Formula 1			
PRODUCT CODE:	UP601			
ORIGIN:	Proprietary blend of standardized <i>Morus alba</i> , <i>Ilex paraguayensis</i> and <i>Magnolia officinalis</i>			
PLANT PARTS:	Root barks of <i>Morus alba</i> , leaves of <i>Ilex paraguayensis</i> and bark of <i>Magnolia officinalis</i>			
ATTRIBUTE	METHOD	SPECIFICATION		
Color and Appearance	STP-001 or equivalent	Brown powder		
Loss on Drying	STP-002 or equivalent	NMT 5%		
Identification Total of Kuwanon G, Albanin G, Morusin Total of Magnolol & Honokiol Caffeine	STP-062	Match chromatography profiles NLT 1% NLT 7% NLT 1%		
Particle Size	STP-016	NLT 80% pass-80 mesh		
Total Heavy Metals (Pb, Cd, Hg, As) Arsenic	ICP-OES or equivalent	NMT 10 ppm NMT 2 ppm		
Organic Solvent Residues	STP-012	Meet USP <467> limit		
Total Aerobic Plate Count	USP/AOAC/KFDA or equivalent	NMT 10,000 cfu/g		
Mold & Yeast	USP/AOAC/KFDA or equivalent	NMT 1,000 cfu/g		
Total Coliforms	USP/AOAC/KFDA or equivalent	Not detected		
Approved by	 QC	Date	11/22/11	
Approved by	 R & D	Date	11/22/11	
Approved by	 QA	Date	11/22/11	
<small>2660 Wilamette Drive NE, Lacey, WA 98516, USA; Phone: 360.485.8200, Fax: 360.413.9195 #200-1, Songjung-Ri, Byeongcheon-Myeon, Cheonan-Si, Chungnam-Pr, Chungnam 350-563, S. Korea; Phone: 82.41.529.1510, Fax: 82.41.529.1595</small>				

Figure 3-121. Product specification of UP601

⑥ 시생산 제품의 검사 결과

HPLC 정량 분석결과 시생산이 완료된 3COM-W17 S1 시료의 총 유효성분의 함량은 11%로 9% 기준을 통과하였음.

(나) 3COM-W17S3 (UP602) 에 대한 분석법 개발

3COM-W17S3 (UP602) 의 유효성분을 정량하기 위한 HPLC 분석방법. 이 방법은 제품화 및 상업화를 위한 품질관리분석법으로 활용되었음.

① HPLC 분석 조건

- 기기: HPLC/PDA
- 컬럼: C18 column
- 이동상: 100 % acetonitril (A%), 0.1% trifluoroacetic acid buffer (B%)
- 1 ml/min의 유속으로 270 nm에서 gradient 방법으로 분석

Table 3-44. Mobile phase.

시간 (분)	A%	B%
0.0	5	95
15.0	20	80
20.0	60	40
25.0	70	30
40.0	90	10
40.5	5	95
45.0	5	95

② 시료 및 표준품 준비조건

- 표준품: Peak 2, 3은 Honsea Sunshine Biotech 로부터 구입하였고 peak 7은 biopurify에서 구입하였음. Peak 4, 5 및 6은 시중에서 판매하지 않으므로 표준 추출물을 정량하여 이를 working 표준품으로 사용하였음. 3개의 표준품과 1개의 working 표준품을 100% methanol을 추출 용매로 사용하여 10분 동안 초음파 추출. 0.45um CA syringe filter로 filter 한 다음 HPLC 주입

- 시료: 100 % methanol을 추출 용매로 사용 하여 30분 동안 sonication 한 다음 0.45 μ m의 CA filter로 filter 한 다음 HPLC에 주입.

③ 결과 계산

- 표준용액을 HPLC에 주입하여 얻어진 결과로부터 response factors를 구하여 시료의 값을 아래와 같은 식을 이용하여 계산.

* Response factors

$$\text{RF (response factor)} = \frac{(W/V) \times P/100 \times (1 - (\text{LOD}/100))}{A}$$

W: 표준품 무게 (mg)

V: 표준용액의 부피 (ml)

P: 표준품의 순도 (%)

LOD: 수분함량 (%)

A: 표준품의 peak area

* 시료 계산

$$\text{Wt}\% = \frac{A_{\text{sample}} \times \text{RF}}{(W_{\text{sample}}/V_{\text{sample}}) \times (1 - (\text{LOD}/100))} \times 100$$

A_{sample} : 시료에서의 peak area

W_{sample} : 시료 무게 (mg)

V_{sample} : 시료 부피 (ml)

④ 크로마토그램

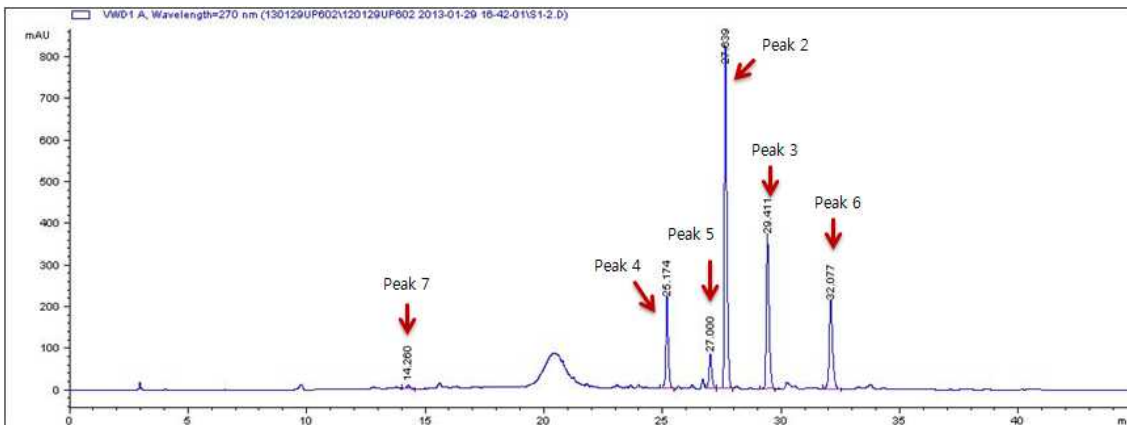


Figure 3-122. HPLC chromatogram of standards.

Peak; 2 Honokiol, Peak 3; Magnolol, Peak 4; Kuwanon G, Peak 5; Albanin, Peak 6; Morusin, Peak 7; Procyanidin B2.

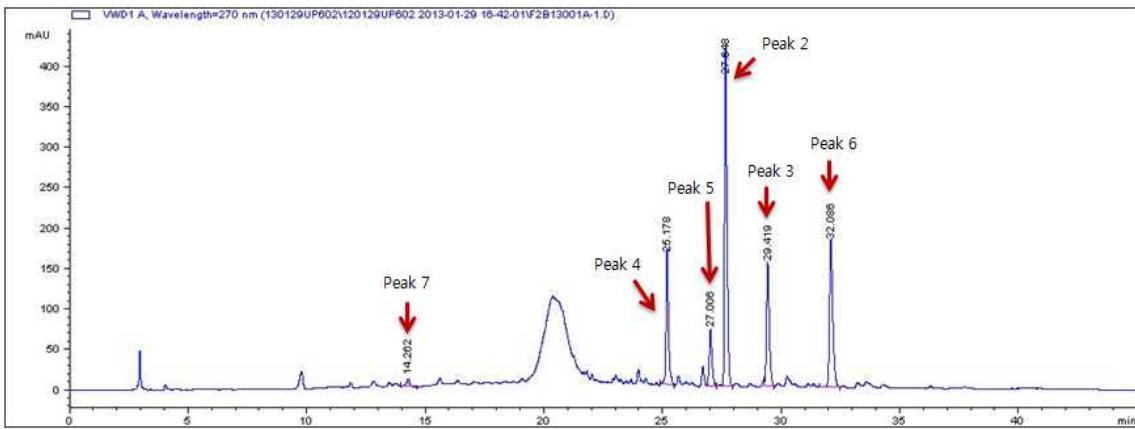


Figure 3-123. HPLC chromatogram of 3COM-W17S3.

Peak; 2 Honokiol, Peak 3; Magnolol, Peak 4; Kuwanon G, Peak 5; Albanin, Peak 6; Morusin, Peak 7; Procyanidin B2.

⑤ 기준 규격



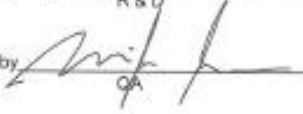
UNiGEN		SPECIFICATION	Doc. #: Spec-076 Rev. #: 001	Effective Date: 12/02/2011
PRODUCT SPECIFICATION				
PRODUCT:	Formula 2			
PRODUCT CODE:	UP602			
ORIGIN:	Proprietary blend of standardized <i>Morus alba</i> , <i>Guazuma ulmifolia</i> and <i>Magnolia officinalis</i>			
PLANT PARTS:	Root barks of <i>Morus alba</i> , stem barks of <i>Guazuma ulmifolia</i> and bark of <i>Magnolia officinalis</i>			
ATTRIBUTE	METHOD	SPECIFICATION		
Color and Appearance	STP-001 or equivalent	Brown powder		
Loss on Drying	STP-002 or equivalent	NMT 5%		
Identification Total of Kuwanon G, Albanin G, Morusin Total of Magnolol & Honokiol	STP-054	Match chromatography profiles NLT 1% NLT 7%		
Particle Size	STP-016	NLT 80% pass-80 mesh		
Total Heavy Metals (Pb, Cd, Hg, As) Arsenic	ICP-OES or equivalent	NMT 10 ppm NMT 2 ppm		
Organic Solvent Residues	STP-012	Meet USP <467> limit		
Total Aerobic Plate Count	USP/ACAC/KFDA or equivalent	NMT 10,000 cfu/g		
Mold & Yeast	USP/ACAC/KFDA or equivalent	NMT 1,000 cfu/g		
Total Coliforms	USP/ACAC/KFDA or equivalent	Not detected		
Approved by 	QC	Date	11/22/11	
Approved by 	R & D	Date	11/22/11	
Approved by 	QA	Date	11/22/11	
<small>2950 Willamette Drive NE, Leech, WA 98516, USA; Phone: 360.495.5200, Fax: 360.413.9135 #200-1, Songjung-Ri, Byeongcheon-Myeon, Cheonan-Si, Chungnam 330-863, S. Korea; Phone: 82.41.529.1510, Fax: 82.41.529.1599</small>				

Figure 3-124. Product specification of UP602.

⑥ 시생산 제품의 검사 결과

HPLC 정량 분석결과 시생산이 완료된 3COM-W17 S3 시료의 총 유효성분의 함량은 10%로 8% 기준을 통과하였음.

(다) 3COM-W17S5 (UP603) 에 대한 분석법 개발

3COM-W17S5 (UP603) 의 유효성분을 정량하기 위한 HPLC 분석방법. 이 방법은 제품화 및 상업화를 위한 품질관리분석법으로 활용되었음.

① HPLC 분석 조건

- 기기: HPLC/PDA
- 컬럼: C18 column
- 이동상: 100% acetonitril (A%), 0.1% phosphoric acid buffer (B%)
- 1 ml/min의 유속으로 206 nm에서 gradient 방법으로 분석

Table 3-45. Mobile phase.

시간 (분)	A%	B%
0.0	20	80
10.0	35	65
11.0	45	55
15.0	50	50
50.0	70	30
50.5	100	0
60.0	100	0
60.5	20	80
65.0	20	80

② 시료 및 표준품 준비조건

- 표준품: Peak 1은 시그마에서 구입하였고 및 4, 5, 6, 9, 10 및 11은 시중에서 판매하지 않거나 가격이 고가이어서 표준 추출물을 정량하여 이를 working 표준품으로 사용하였음. 1개의 표준품과 2개의 working 표준품을 100% methanol을 추출 용매로 사용하여 10분 동안 초음파 추출. 0.45um CA syringe filter로 filter 한 다음 HPLC 주입.
- 시료: 100 % methanol을 추출 용매로 사용 하여 30분 동안 sonication 한 다음 0.45 μm의 CA filter로 filter 한 다음 HPLC에 주입.

③ 결과 계산

- 표준용액을 HPLC에 주입하여 얻어진 결과로부터 response factors를 구하여 시료의 값을 아래와 같은 식을 이용하여 계산.

* Response factors

$$\text{RF (response factor)} = \frac{(W/V) \times P/100 \times (1-(\text{LOD}/100))}{A}$$

W: 표준품 무게 (mg)

V: 표준용액의 부피 (ml)

P: 표준품의 순도 (%)

LOD: 수분함량 (%)

A: 표준품의 peak area

* 시료 계산

$$\text{Wt}\% = \frac{A_{\text{sample}} \times \text{RF}}{(W_{\text{sample}}/V_{\text{sample}}) \times (1-(\text{LOD}/100))} \times 100$$

A_{sample} : 시료에서의 peak area

W_{sample} : 시료 무게 (mg)

V_{sample} : 시료 부피 (ml)

④ 크로마토그램

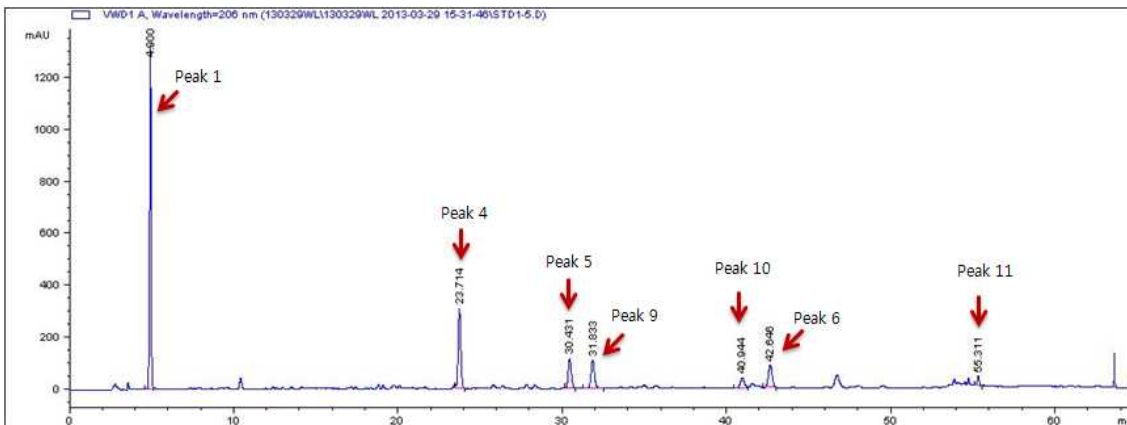


Figure 3-125. HPLC chromatogram of standards.

Peak 1; Caffeine, Peak 4; Kuwanon G, Peak 5; Albanin, Peak 6; Morusin, Peak 9; Carnosol, Peak 10; Carnosic acid, Peak 11; Ursolic acid.

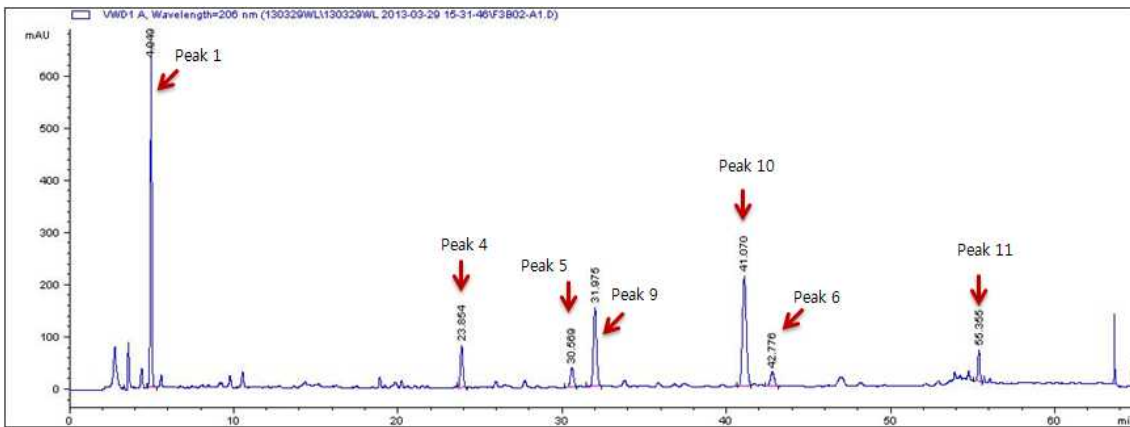


Figure 3-126. HPLC chromatogram of 3COM-W17 S5.

Peak 1; Caffeine, Peak 4; Kuwanon G, Peak 5; Albanin, Peak 6; Morusin, Peak 9; Carnosol, Peak 10; Carnosic acid, Peak 11; Ursolic acid

3. 전임상 및 임상시험 물질의 제품화 연구

가. 재료 및 방법

초기에 수행된 기초연구결과를 바탕으로 제품화의 최종단계를 위한 일련의 공정을 설계함으로써 연구라는 up-stream 단계와 생산이라는 down-stream 단계를 효율적으로 연결, 제품화에 필요한 경제성 및 효율성 등을 고려한 최적의 공정을 개발하였음. 또한 천연물에서 제품생산에 이르기까지의 일반적으로 수행되는 다음의 제조공정 모식도에 의거하여 시장에서의 개발 제품의 경쟁력을 고려한 최종 제품의 순도 및 형상, 그에 따른 공정 개발의 수위를 결정하였음.

(1) 표준 추출 공정 개발

추출하고자 하는 식물의 특성 및 주요 성분 등의 특성을 고려하여 여러 가지 용매를 이용한 추출을 수행하였고 각 추출물의 주요 성분 분석 및 비교를 통하여 각 후보소재 마다 적합한 표준 추출 공정을 개발하였음. 초기에는 lab-scale 에서의 표준 추출물 공정을 설계하였음.

(2) 최적 공정조건 결정

수립된 공정개발 계획에 따라서 초기 공정요소들을 선정하고 그에 따른 lab-scale 실험을 진행하여 scale-up에 필요한 최적의 공정 요소들을 선정하였음. 추출 공정에서는 원물의 절단 또는 파쇄 정도, 추출시 온도 및 시간, 추출 용매의 사용량 및 종류 등이 추출물의 수율을 결정하는 중요한 공정 요소이고 추출 후 여과를 통한 잔류 원물의 제거 과정을 함께 고려하였음. 농축 공정에서는 사용하는 용매의 종류에 따른 농축 온도와 시간, 압력과 함께 농축 종료 시점을 측정할 수 있는 지표 설정을 통하여 농축물의 회수율을 높일 수 있는 방법을 고려하였음. 특정 성분을 enriched 시키는 방법으로는 용매가용성 분획 및 칼럼분획을 사용하며 칼럼분획은 효능성분의 함량, 안전성, 경제성을 고려하여 다양한 조건으로 HTP 분획을 수행하여 제품을 위한 표준추출물의 조건을 설계하였음. 건조 공정은 현재 대량생산에서 사용 중인 열풍건조, 동결건조, spray dry 등의 건조 공정 중에서 제조물의 물리 화학적 특성 및 생산단가를 고려하여 건조법을 선정, 적용하였음.

(3) 대량생산 적용 및 공정 validation

실험실적으로 선정된 공정 요소들의 실제 생산 공정에서의 적용 가능성을 확인하기 위하여 공정 요소들이 반영된 pilot scale 공정을 반복 수행함으로써 최적의 생산 공정조건을 선정하였음. Pilot scale 공정을 통해서 완료된 공정을 실제 생산 라인에 적용하여 개발된 생산 공정을 최종적으로 확인하였음. 이는 시생산 단계를 통해 선정된 공정 요소들의 적정성 여부 및 scale-up에 따른 보완점, 공정 수행자 변경 등의 요소를 확인, 점검함으로써 실제 생산 라인에서 활용되는 제조지시 및 기록서를 작성하였음. 설정된 제조공정의 적합성 확인을 위한 공정 validation 실시 (3 lot 이상). 이후 제품화를 위한 시생산을 본 공정에 따라 실시하였음.

나. 결과 및 고찰

(1) 전임상 후보 물질의 표준 추출공정 개발

(가) P9071

건조된 P9071을 분쇄하여 15배의 증류수, 50% 에탄올, 70% 에탄올 그리고 100% 에탄올을 각각 첨가하여 4시간 동안 환류 추출하여 제조된 추출물의 수율을 확인하였음.

P9071 추출물의 수율을 확인한 결과 물 추출물의 추출수율이 38%로 수율이 가장 높았고, 다음으로 70% 에탄올 추출물의 수율이 34%로 높았음. 하지만 8개 주요 성분 피크 면적은 100% 에탄올 추출물이 73%로 가장 높았고, 다음으로 70% 에탄올 추출물의 8개 주요 성분의 peak 면적의 합이 66%로 높았다. 따라서 추출수율, 주요 성분 peak 면적 및 대량생산공정을 고려하여 lab-scale 표준추출물 제조조건을 70% 에탄올로 결정하였음.

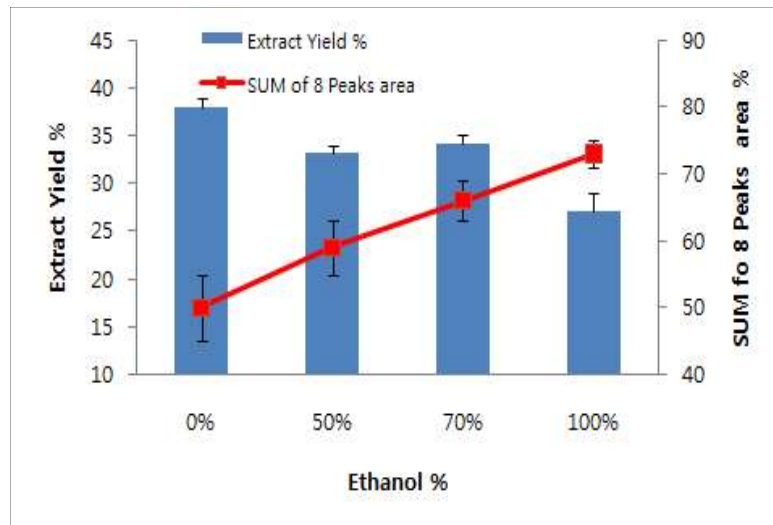


Figure 3-128. P9071 extract yield and major peaks area % according to extraction solvent condition.

(나) UG0602

건조된 UG0602를 분쇄하여 15배의 증류수, 50% 에탄올, 70% 에탄올 그리고 100% 에탄올을 각각 첨가하여 4시간 동안 환류 추출하여 추출수율 및 지표성분의 함량을 확인하였음.

UP0602 추출물의 수율을 확인한 결과 물 추출물의 추출수율이 22%로 수율이 가장 높았고, 다음으로 70% 에탄올 추출물의 수율이 17%로 높았음. 하지만 2개 주요 성분 함량의 합은 100% 에탄올 추출물이 22%로 가장 높았고, 다음으로 70% 에탄올 추출물의 2개 주요 성분의 함량의 합이 17%로 높았음. 따라서 추출수율, 주요 성분 함량 및 대량생산공정을 고려하여 lab-scale 표준추출물 제조조건을 70% 에탄올로 결정하였음.

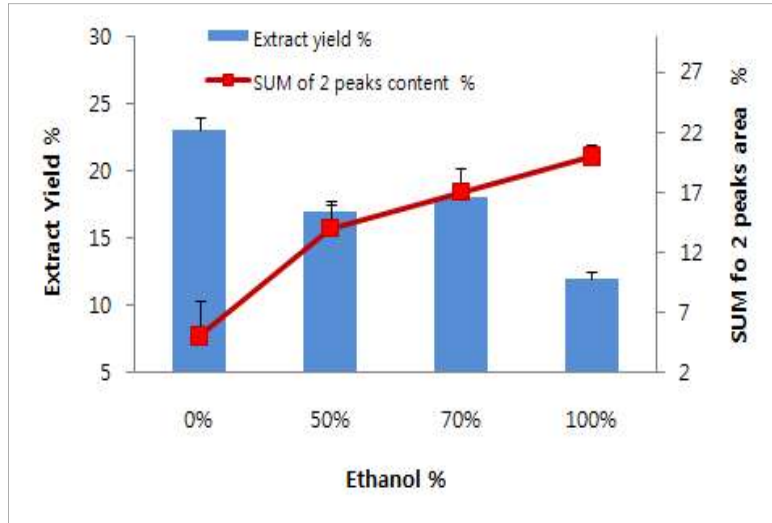


Figure 3-129. UG0602 extract yield and major peaks area content according to extraction solvent condition.

(다) UP438

건조된 UP438 원물을 분쇄하여 만든 분말에 각각 7배의 증류수, 50% 에탄올, 70% 에탄올, 그리고 100% 에탄올을 첨가하여 4시간 동안 환류 추출하였음. 상기 추출물의 수율 및 peak 1의 함량을 확인한 결과 그림과 같았음.

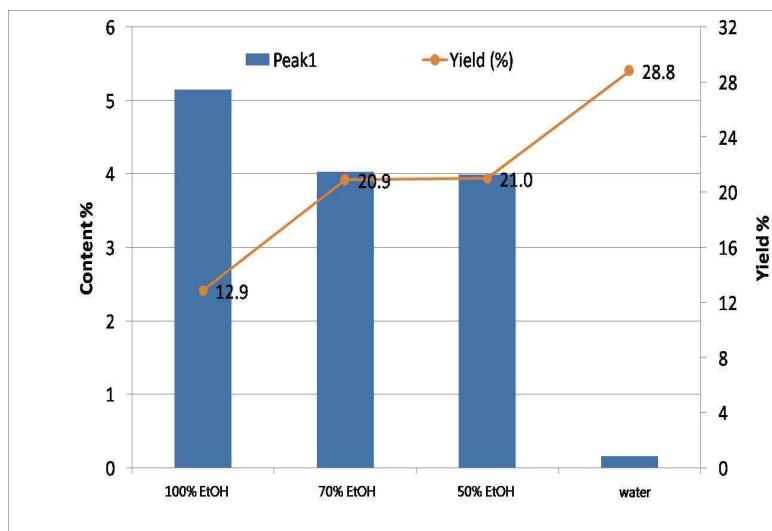


Figure 3-130. UP438 extract yield and major peak area content according to extraction solvent condition.

(라) P01999

건조된 P01999를 분쇄하여 15배의 증류수, 50% 에탄올, 70% 에탄올 그리고 100% 에탄올을 각각 첨가하여 4시간 동안 환류 추출하여 추출수율 및 지표성분의 함량을 확인하였음.

UP0602 추출물의 수율을 확인한 결과 물 추출물의 추출수율이 22%로 수율이 가장 높았고, 다음으로 50%, 70% 에탄올 추출물의 수율이 17%로 높았음. 하지만 4개 주요 성분 피크 면적은 100% 에탄올 추출물이 43%로 가장 높았고, 다음으로 70% 에탄올 추출물의 4개 주요 성분의 peak 면적의 합이 38%로 높았다. 따라서 추출수율, 주요 성분 peak 면적 및 대량생산공정을 고려하여 lab-scale 표준추출물 제조조건을 70% 에탄올로 결정하였음.

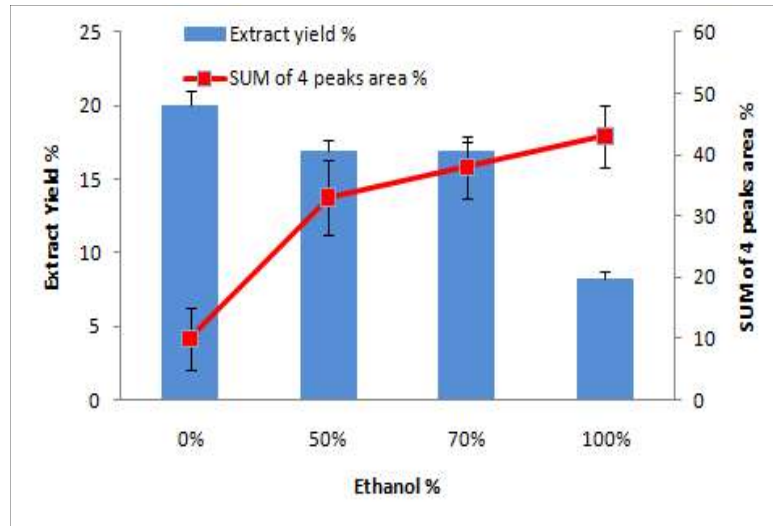


Figure 3-131. P01999 extract yield and major peaks area % according to extraction solvent

(2) 대량생산 및 제품화를 위한 생산 공정 개발

기 확립된 lab-scale 의 표준추출물 제조법을 바탕으로 대량 생산 및 제품화를 위한 생산 공정을 개발하였음. 각 후보소재별로 표준제로 방법을 개발하였으며 향후 최종소재는 각소재를 특정비율로 혼합하여 제조되기 때문에 이 또한 별도의 공정을 확립하고 validation 하여 최종 제품 시생산을 위한 준비를 하였음.

(가) P9071 표준제조 방법 개발

수집된 원물을 분쇄한 후 발효주정/정제수로 가운하여 4시간 동안 2회 추출하여 여과한 후 여과액을 감압 농축하여 얻은 고형 분을 동결건조기를 통하여 건조하여 분말형태의 P9071을 얻음. 예비실험을 통하여 결정된 lab scale 표준추출물 제조조건을 바탕으로 대량생산을 위한 Pilot scale 의 표준제조공정법을 개발 완료하였음.

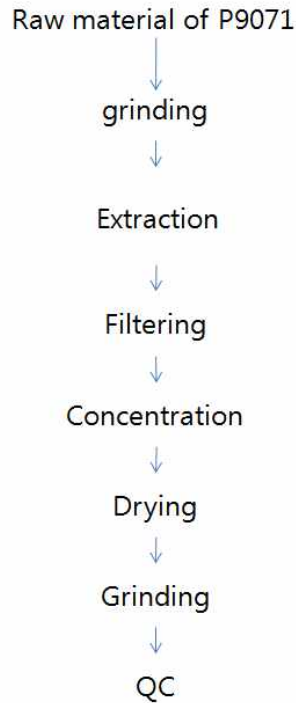


Figure 3-132. Standardized manufacturing process of P9071.

(나) UG0602 표준제조 방법 개발

수집된 원물을 분쇄한 후 발효주정/정제수로 가온하여 4시간 동안 2회 추출하여 여과한 후 여과액을 감압 농축하여 얻은 농축액을 비누화 반응을 통해 지방산을 제거하고 유기용매를 이용하여 추출한 액을 농축 및 재결정을 통하여 UG0602를 확보하였음. 예비실험을 통하여 결정된 lab scale 표준추출물 제조조건을 바탕으로 대량생산을 위한 Pilot scale 의 표준제조공정법을 개발 완료하였음.

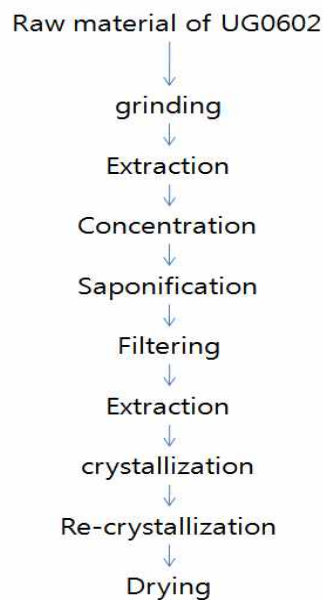


Figure 3-133. Standardized manufacturing process of UG0602.

(다) UP438 표준제조 방법 개발

수집된 원물을 분쇄한 후 발효주정/정제수로 가온하여 4시간 동안 2회 추출하여 여과한 후 여과액을 감압농축 및 상온에서 24시간 방치하여 얻은 침전물을 건조기를 통하여 건조하여 분말형태의 UP438을 확보하였음. 예비실험을 통하여 결정된 lab scale 표준추출물 제조조건을 바탕으로 대량생산을 위한 Pilot scale 의 표준제조공정법을 개발 완료하였음.

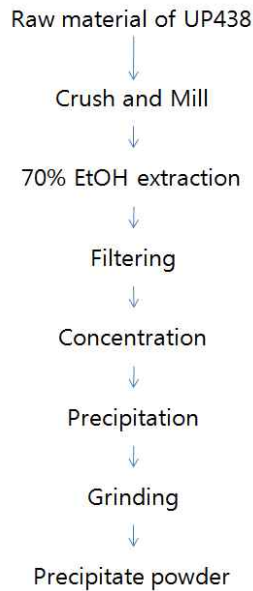


Figure 3-134. Standardized manufacturing process of UP438.

(라) P01999 표준제조 방법 개발

수집된 원물을 분쇄한 후 발효주정/정제수로 가온하여 4시간 동안 2회 추출하여 여과한 후 여과액을 감압 농축하여 얻은 고형 분을 동결건조기를 통하여 건조하여 분말형태의 P01999를 얻었음. 예비실험을 통하여 결정된 lab scale 표준추출물 제조조건을 바탕으로 대량생산을 위한 Pilot scale 의 표준제조공정법을 개발 완료하였음.

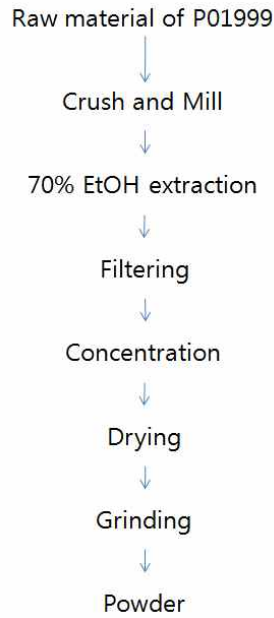


Figure 3-135. Standardized manufacturing process of P01999.

(마) UP331 표준제조 방법 개발

수집된 원물을 분쇄한 후 정제수 및 발효주정을 사용하여 4시간 동안 2회 추출하여 여과한 후 여과액을 감압 농축하여 얻은 고형 분을 동결건조기를 통하여 건조하여 분말형태의 UP331을 얻었음. 예비실험을 통하여 결정된 lab scale 표준추출물 제조조건을 바탕으로 대량생산을 위한 Pilot scale 의 표준제조공정법을 개발 완료하였음.

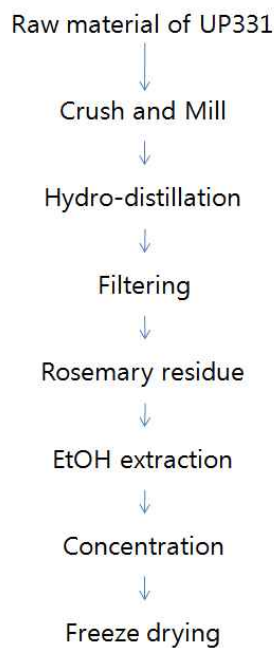


Figure 3-136. Standardized manufacturing process of UP331.

(바) UP342 표준제조 방법 개발

수집된 원물을 분쇄한 후 발효주정/정제수로 가온하여 4시간 동안 2회 추출하여 여과한 후 여과액을 감압농축 및 상온에서 24시간 방치하여 얻은 침전물을 건조기를 통하여 건조하여 분말형태의 UP342를 얻었음. 예비실험을 통하여 결정된 lab scale 표준추출물 제조조건을 바탕으로 대량생산을 위한 Pilot scale 의 표준제조공정법을 개발 완료하였음.

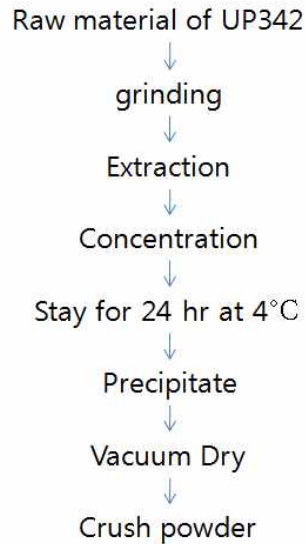


Figure 3-137. Standardized manufacturing process of UP342

(3) 최종 소재의 시생산

앞서 확립된 생산 공정에 따라 각 최종 소재를 생산하고 품질관리를 위해 개발된 분석법으로 분석을 하여 최종 생산 물질이 적합하게 생산되었는지를 확인하였음. 이에 따라 시 생산된 모든 소재는 최종 제품으로서 각각의 COA 발행하여 활용하였음.

(가) 3COM-W17S1 (UP601)

최종 후보소재 및 임상시험 물질 중 하나로 개발된 3COM-W17S1의 경우 최종 제품화 단계에서 제품 코드가 UP601로 변경되었음. 이 코드는 향후 생산될 제품 및 제품의 COA 에 활용될 것임.

수집된 원물을 분쇄한 후 발효주정/정제수로 가온하여 4시간 동안 2회 추출하여 여과한 후 여과액을 감압 농축하여 얻은 농축액을 비누화 반응을 통해 지방산을 제거하고 유기용매를 이용하여 추출한 액을 농축 및 재결정을 통하거나 여과액을 감압농축 및 상온에서 24시간 방치하여 얻은 침전물을 건조기를 통하여 건조하여 분말형태의 UP438 표준 추출물을 확보하였으며, 제조된 각각의 표준 추출물을 리본 혼합기를 이용하여 소재가 잘 혼합 될 수 있도록 40rpm의 속도로 30분간 혼합한 다음, 80 메쉬의 체과망을 이용하여 불순물을 여과함. 여과한

로 30분간 혼합한 다음, 80 메쉬의 채과망을 이용하여 불순물을 여과함. 여과한 혼합물을 미생 물이나 다른 불순물이 혼입되지 않도록 포장하여 제조함 (별첨: 성적서 참조).


UNiGEN

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Name: Formula 2
Product Code: UP602
Description: Proprietary blending
Manufacture address: Unigen, #200-1, Songjung-Ri, Byeongcheon-Myeon, Cheonan-Si, Chungnam 330-863, S. Korea
Lot Number: F2B12001
Manufacture Date: November 1, 2012

Test	Specification	Results
Color and Appearance	Brown powder	Complies
Loss on Drying	NMT 5%	2%
Identification	Match HPLC chromatographic profiles	Match
Total Chemical Markers	NLT 8%	10%
Particle size	NLT 80% pass-80 mesh	99%
Total Heavy Metals (Pb, Cd, Hg, As)	NMT 10 ppm	0.2 ppm
Arsenic	NMT 2 ppm	0.1 ppm
Organic Solvent Residues	Meet USP <467> limits	Complies
Total Aerobic Plate Count	NMT 10,000 cfu/g	< 10 cfu/g
Mould and Yeast	NMT 1,000 cfu/g	< 10 cfu/g
Total Coliforms	Not detected	Not detected

Store in tightly closed containers at room temperature. Keep away from heat, moisture and light.

Signed:  Date: Nov. 7, 2012

#200-1, Songjung-Ri, Byeongcheon-Myeon, Cheonan-Si, Chungnam 330-863, S. Korea, Tel: 82-41-528-1510, Fax: 82-41-529-1099
 3005 1st Ave., Seattle, WA 98121 Tel: 360-466-8200 Fax: 360-413-9135
 www.unigen.net

Figure 3-139. COAs for UP602.

(다) 3COM-W17S5 (UP603)

최종 후보소재 및 임상시험 물질 중 하나로 개발된 3COM-W17S5의 경우 최종 제품화 단계에서 제품 코드가 UP603으로 변경되었음. 이 코드는 향후 생산될 제품 및 제품의 COA 에 활용될 것임.

4. 최종 생산 물질의 안정성 시험

임상시험에 사용되는 물질은 앞으로 상업화 및 제품화 될 소재와 동일한 방법으로 제조 및 관리 되어야 함. 이에 최종 제품의 유통기한 및 조건 등을 설정하기 위한 안정성 시험을 수행하여 그 결과를 확보하였음. 안정성시험은 실제 보존시험기간내에서 설정하는 것을 원칙으로 하며 안정성 시험항목은 기능성분함량, 미생물, 기타 원료의 특성에 따라 설정하여 시험함. 안정성시험은 최종 후보소재 3개에 대하여 실시되었으며 12개월간의 장기보존 시험 및 가속시험으로 구분되어 수행되었음.

가. 재료 및 방법

(1) 장기보존시험기준

(가) 검체 수

시판할 제품과 동일한 처방, 제형 및 포장용기를 사용하여 3개 로트 이상으로 함.

(나) 보존조건

$25\pm 2^{\circ}\text{C}$ /상대습도 $60\pm 5\%$ 로 한다. 다만, 저장온도가 설정된 경우에는 그 설정온도로 함.

(다) 시험기간

12개월 이상을 원칙으로 하며 적어도 설정한 사용기간 이상 시험하여야 함.

(라) 측정시기

시험개시 때와 첫 1년간은 3개월마다, 그 후 2년까지는 6개월마다, 2년 이후부터는 1년에 1회 시험함.

(마) 시험항목

기준 및 시험방법에 설정한 전 항목을 원칙으로 함.

(바) 시험회수

각 시험항목 별로 3회 이상 실시하여 그 평균치를 기재함.

(2)가속시험기준

(가) 검체 수

시판할 제품과 동일한 처방, 제형 및 포장용기를 사용하여 3개 로트 이상으로 함.

(나) 보존조건

40±2℃/상대습도 75±5% 또는 장기보존시험 지정저장온도+15℃ 이상(온도에 따른 적절한 상대습도 고려)으로 함.

(다) 시험기간

6개월 이상을 원칙으로 함.

(라) 측정시기

시험개시 때를 포함하여 일정한 간격의 4개 시점 이상으로 함.

(마) 시험항목 및 회수

장기보존시험기준에 따름.

① 추가시험

가속시험에서 유의성 있는 변화가 발생하면 중간조건(예를 들면 30±2℃/상대습도 60±5%)에서 1년간의 추가가속시험이 이루어져야 함. 가속시험에서의 유의성 있는 변화란 다음과 같다.

- 한 로트에서 품목별 시험기준보다 5% 이상의 함량변화가 있는 경우
- 규격치를 초과하는 변성물질이 검출된 경우
- pH 범위를 초과하는 경우

나. 결과 및 고찰

(1) 3COM-W17S1 (UP601)

(가) 장기보존시험 결과

최종 개발된 건강기능식품원료인 UP601의 12개월 장기보존조건(25℃/RH 60%)에서의 안정성 시험을 수행하였음. Lot F1B12001의 검체에 대한 12개월의 장기보존조건(25℃/RH 60%)에서의 안정성시험 결과 시험기간 동안 성분 및 기능성분들의 기준규격에 적합하였음.

Table 3-46. Results for UP601.

Months	Appearance	LOD (%)	Peak 1 (%)	Total of Peak 4, 5, 6 (%)	Total of 2, 3 (%)	Water Activity
0	Confirmed	3.5	3.1	1.9	8.1	0.334
3	Confirmed	3.4	3.1	1.9	8.0	0.397
6	Confirmed	3.8	3.2	1.8	7.9	0.404
9	Confirmed	3.7	3.0	1.7	7.8	0.360
12	Confirmed	3.9	3.2	1.6	7.8	0.395

(나) 가속시험 결과

UP601의 6개월 가속조건(40℃/RH 75%)에서의 안정성시험을 수행하였음. Lot F1B12001의 검체에 대한 6개월의 가속조건(40℃/RH 75%)에서의 안정성시험 결과 시험기간 동안 정상 및 기능성분들의 기준규격에 적합하였음.

Table 3-47. Results for UP601.

Months	Appearance	LOD (%)	Peak 1 (%)	Total of Peak 4, 5, 6 (%)	Total of 2, 3 (%)	Water Activity
0	Confirmed	3.5	3.1	1.9	8.1	0.334
1	Confirmed	3.6	2.9	1.8	7.8	0.420
3	Confirmed	3.9	3.2	1.8	7.3	0.449
6	Confirmed	4.0	3.2	1.6	7.8	0.498

(2) 3COM-W17S3 (UP602)

(가) 장기보존시험 결과

최종 개발된 건강기능식품원료인 UP602의 12개월 장기보존조건(25℃/RH 60%)에서의 안정성 시험을 수행하였음. Lot F2B12001의 검체에 대한 12개월의 장기보존조건(25℃/RH 60%)에서의 안정성시험 결과 시험기간 동안 정상 및 기능성분들의 기준규격에 적합하였음.

Table 3-48. Results for UP602.

Months	Appearance	LOD (%)	Peak 7 (%)	Total of 4, 5, 6 (%)	Total of 2, 3 (%)	Water Activity
0	Confirmed	3.7	0.6	1.9	8.2	0.294
3	Confirmed	3.6	0.6	1.8	8.0	0.345
6	Confirmed	3.9	0.6	1.8	7.9	0.367
9	Confirmed	4.0	0.6	1.7	7.7	0.343
12	Confirmed	3.9	0.6	1.6	7.6	0.374

(나) 가속시험 결과

UP602의 6개월 가속조건(40℃/RH 75%)에서의 안정성시험을 수행하였음. Lot F2B12001의 검

체에 대한 6개월의 가속조건(40℃/RH 75%)에서의 안정성시험 결과 시험기간 동안 정상 및 기능성분들의 기준규격에 적합하였음.

Table 3-49. Results for UP602.

Months	Appearance	LOD (%)	Peak 7 (%)	Total of 4, 5, 6 (%)	Total of 2, 3 (%)	Water Activity
0	Confirmed	3.7	0.6	1.9	8.2	0.294
1	Confirmed	3.8	0.6	1.7	7.8	0.395
3	Confirmed	3.9	0.5	1.6	7.4	0.432
6	Confirmed	4.0	0.4	1.5	7.5	0.468

(3) 3COM-W17S5 (UP603)

(가) 장기보존시험 결과

최종 개발된 건강기능식품원료인 UP603의 12개월 장기보존조건(25℃/RH 60%)에서의 안정성 시험을 수행하였음. Lot F3B12001의 검체에 대한 12개월의 장기보존조건(25℃/RH 60%)에서의 안정성시험 결과 시험기간 동안 정상 및 기능성분들의 기준규격에 적합하였음.

Table 3-50. Results for UP603.

Months	Appearance	LOD (%)	Peak 1 (%)	Total of 4, 5, 6 (%)	Total of 9, 10, 11 (%)	Water Activity
0	Confirmed	3.7	2.5	1.4	8.3	0.339
3	Confirmed	3.6	2.4	1.4	8.1	0.434
6	Confirmed	3.9	2.6	1.3	7.9	0.453
9	Confirmed	4.0	2.4	1.2	7.8	0.432
12	Confirmed	3.9	2.3	1.3	7.6	0.425

(나) 가속시험 결과

건강기능식품원료인 UP603의 6개월 가속조건(40℃/RH 75%)에서의 안정성시험을 수행하였음. Lot F3B12001의 검체에 대한 6개월의 가속조건(40℃/RH 75%)에서의 안정성시험 결과 시험기간 동안 정상 및 기능성분들의 기준규격에 적합하였음.

Table 3-51. Results for UP603.

Months	Appearance	LOD (%)	Peak 1 (%)	Total of 4, 5, 6 (%)	Total of 9, 10, 11 (%)	Water Activity
0	Confirmed	3.7	2.5	1.4	8.3	0.339
1	Confirmed	3.8	2.3	1.3	7.9	0.384
3	Confirmed	3.9	2.3	1.2	7.4	0.441
6	Confirmed	4.0	2.1	1.2	7.2	0.458

5. 전임상 및 임상시험 물질의 원물 소싱

효율적인 공정개발 및 생산을 위해서는 경제적이고 안정적인 원물 공급이 필요하며 이를 위해서는 최적의 원물 선정을 위한 원물 소싱 연구가 선행되어야 함. 시기별 및 지역별로 원물을 수집하여 함량변이를 측정 하는 것이 기본적인 방법으로 두 가지 결과를 바탕으로 최적의 원물을 안정적으로 공급할 수 있는 방법을 선택하였음.

가. 재료 및 방법

원물 소싱 연구를 위하여 수집된 각 소재들을 분쇄한 후, 메틸렌클로라이드와 메탄올 1:1을 추출용매로 하여 ASE 추출기로 추출물을 제조한 후, 유효성분 함량을 평가하였음.

나. 결과 및 고찰

(1) P9071의 원물소싱 연구 결과

(가) 제품화를 위한 원물 확보

P9071 소재의 원산지는 연중 비슷한 기후를 보이므로 계절별 함량 변이 자료 확보는 필요하지 않은 것으로 사료되었음. 이에 국가별 함량변이에 대한 연구를 진행하였음. 남아메리카의 3개국으로부터 P9071 소재를 수집하여 유효성분 함량을 평가한 결과 1차 수집된 시료들은 모두 표준시료와 유사하였음.

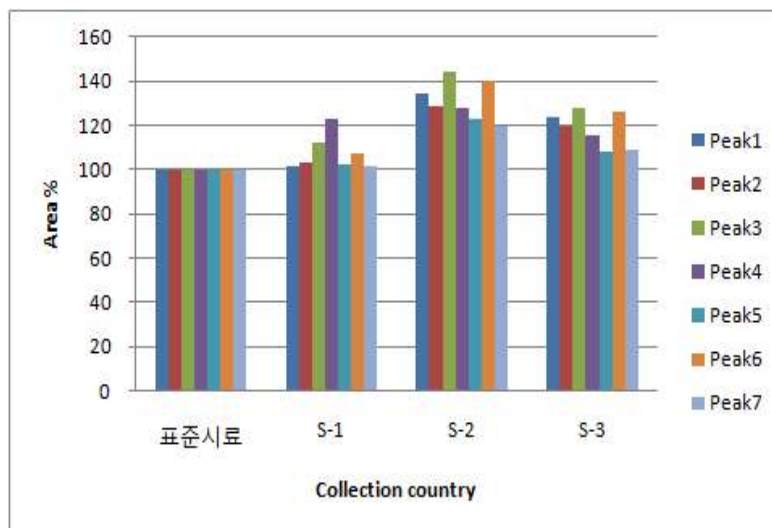


Figure 3-141. Peaks area % of raw material sourcing samples for P9071.

7개의 compound 중 1개를 유효성분으로 최종 결정한 후 1차 수집된 시료들의 유효성분 함량을 표준시료와 비교한 결과 S-1로부터 수집된 시료가 표준 시료와 가장 유사하고 가격이 저렴하여 최적의 수집지역으로 선정하였음.

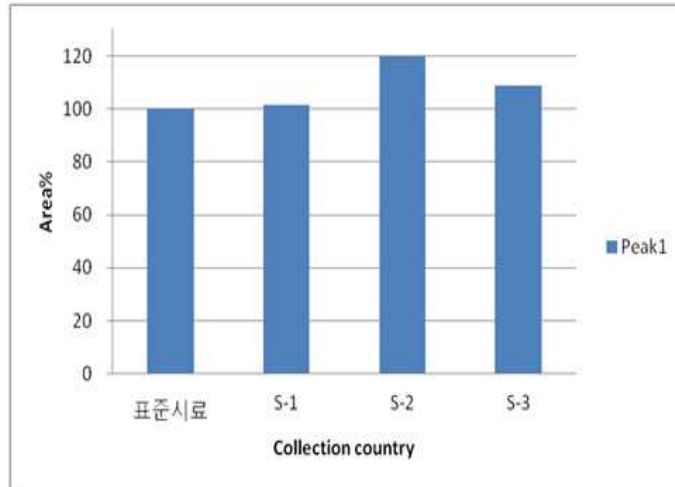


Figure 3-142. Peaks area % of raw material sourcing samples from various collection area for P9071.

(나) 대량생산 및 제품화를 위한 원물 소싱 연구

원물 소싱 연구결과로부터 도출된 최적의 원물 정보를 바탕으로, 선정된 수집지역으로 부터 최적 원물의 안정적 공급을 위한 소싱 연구를 진행하였음.

선정된 수집지역으로 부터 P9071 소재를 5회 수집하여 유효성분 함량을 평가한 결과 수집된 5시료들 간의 함량변이는 표준시료대비 95~120%를 보이고 있어 최적 원물의 안정적인 공급이 가능할 것으로 예상되었음.

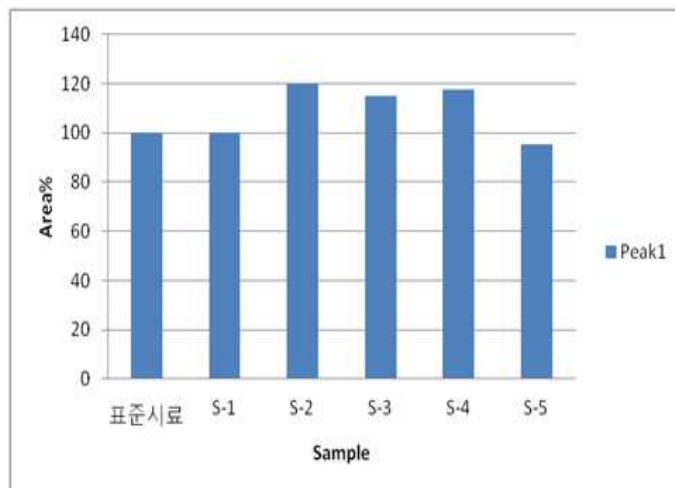


Figure 3-143. Peaks area % of raw material sourcing samples from selected collection area for P9071.

(다) 시생산용 대량 원물 확보 및 제 2차 원물 공급처 선정을 위한 연구

원물 소싱 연구 결과로 선정된 최적의 원물 수집지역으로부터 Clinical trial 시료 준비를 위한 pilot 생산에 필요한 대량 원물을 확보하였음. 확보된 대량 원물의 품질을 평가하기 위

하여 입고된 3 packages의 전수 검사를 실시하였음. 3 packages의 P9071 원물의 일부를 sampling 하여 유효성분 함량을 평가한 결과 확보된 3 package 시료들은 모두 표준시료 대비 87~97%를 보이고 있어 Clinical trial 시료 준비를 위한 pilot 생산에 적합하였음.

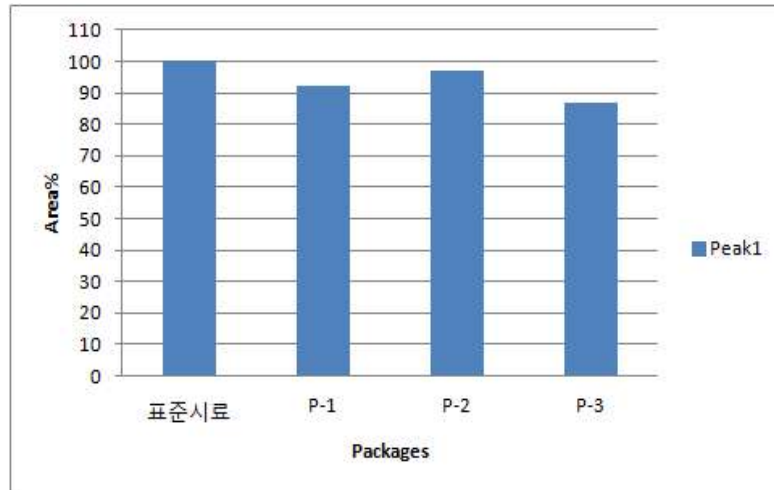


Figure 3-144. Peaks area % of Bulk materials (3 packages) secured for Clinical trial.

원물 소싱 연구 결과로 선정된 최적의 원물 수집지역 외에 2차 수집지역을 선정하기 위하여 추가적인 소싱 연구를 진행하였음. 남아메리카의 3개 지역으로부터 P9071 소재를 수집하여 유효성분 함량 및 가격을 고려하여 평가한 결과 S-3으로부터 수집된 시료가 표준 시료와 가장 유사하고 가격이 저렴하여 S-3을 2차 수집지역으로 선정하였음.

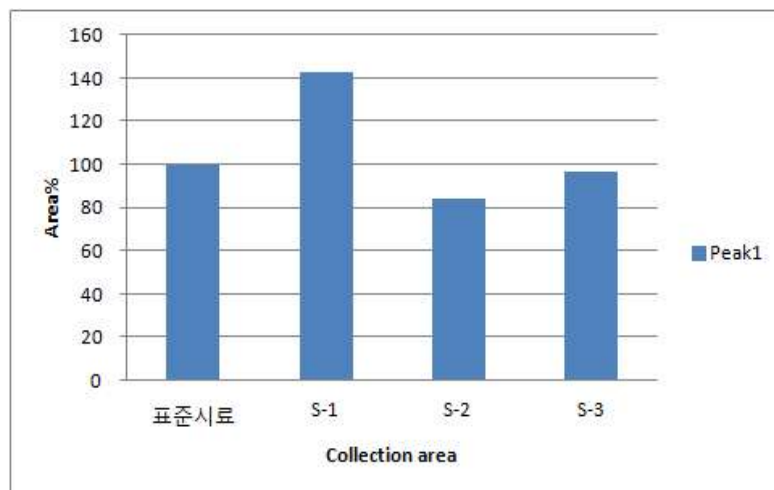


Figure 3-145. Peaks area % of raw material sourcing samples from various collection area for P9071.

(2) UG0602의 원물 소싱 결과

(가) 제품화를 위한 원물 확보

국내 외 5개 지역으로부터 UG0602 소재를 수집하여 유효성분 함량을 평가한 결과 1차 수집된 시료 중 S-1로부터 수집된 시료가 표준시료와 가장 유사하나 전체적으로 다양한 함량 변이를 보였음. 이에 안정적인 원물 공급을 위한 지속적 연구가 필요하였음.

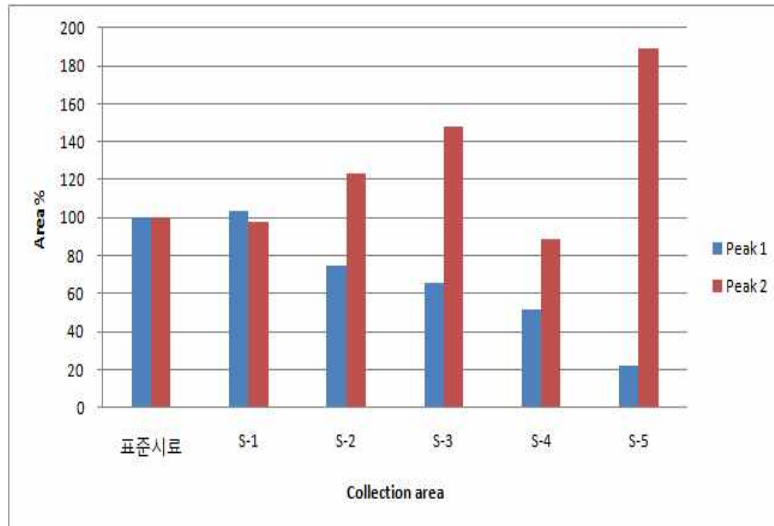


Figure 3-146. Peaks area % of raw material sourcing samples for UG0602.

한국 및 중국의 여러 지역으로부터 UG0602의 4소재를 추가 수집하여 유효성분 함량 및 가격을 고려하여 평가한 결과 1차 수집에서 S-1로부터 수집된 시료가 표준시료와 가장 유사하여 최적의 후보소재 수집지역으로 선정하였음.

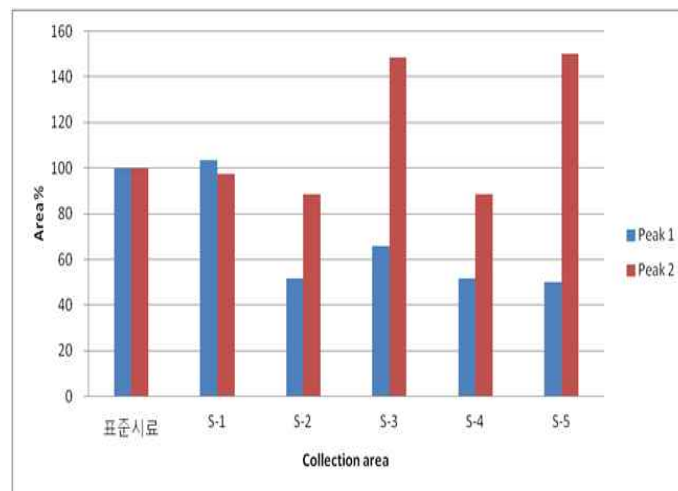


Figure 3-147. Peaks area % of raw material sourcing samples from various collection area for UG0602.

(나) 대량생산 및 제품화를 위한 원물 소싱 연구

원물 소싱 연구결과로부터 도출된 최적의 원물 정보를 바탕으로, 선정된 수집지역으로 부터 최적 원물의 안정적 공급을 위한 소싱 연구를 진행하였음. 선정된 수집지역으로 부터

UG0602 소재를 5회 수집하여 유효성분 함량을 평가한 결과 수집된 5시료들 간의 함량변이는 표준시료대비 88~118%를 보이고 있어 최적 원물의 안정적인 공급이 가능할 것으로 예상되었음.

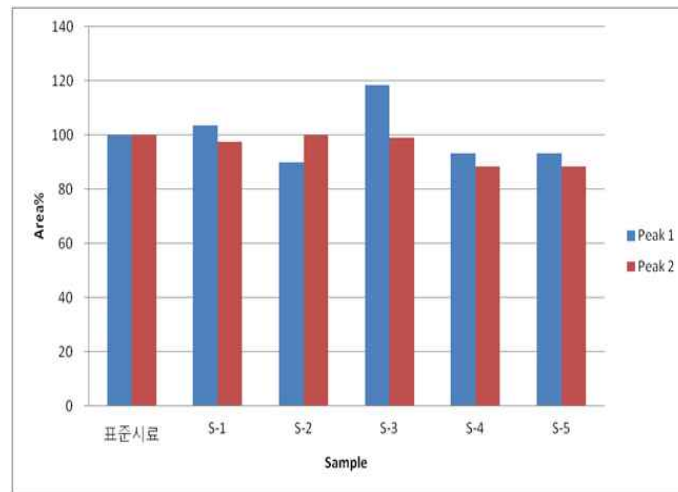


Figure 3-148. Peaks area % of raw material sourcing samples from selected collection area for UG0602.

(다) 시생산용 대량 원물 확보 및 제 2차 원물 공급처 선정을 위한 연구

원물 소싱 연구 결과로 선정된 최적의 원물 수집지역으로부터 Clinical trial 시료 준비를 위한 pilot 생산에 필요한 대량 원물을 확보하였음. 확보된 대량 원물의 품질을 평가하기 위하여 입고된 4 packages의 전수 검사를 실시하였음. 4 packages의 UG0602 원물의 일부를 sampling 하여 유효성분 함량을 평가한 결과 확보된 4 package 시료들은 모두 표준시료 대비 99~108%를 보이고 있어 Clinical trial 시료 준비를 위한 pilot 생산에 적합하였음.

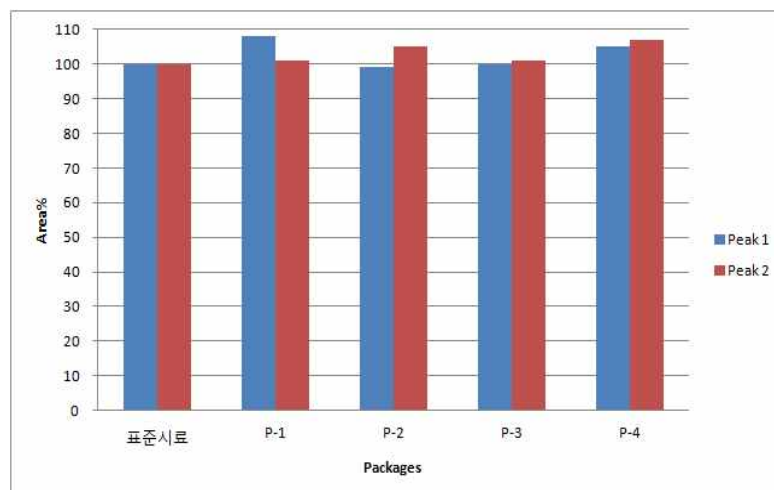


Figure 3-149. Peaks area % of Bulk materials (4 packages) secured for Clinical trial.

원물 소싱 연구 결과로 선정된 최적의 원물 수집지역 외에 2차 수집지역을 선정하기 위하여 추가적인 소싱 연구를 진행하였음. 중국내 3개 지역으로부터 UG0602 소재를 수집하여

유효성분 함량 및 가격을 고려하여 평가한 결과 S-1로부터 수집된 시료가 표준 시료와 가장 유사하고 가격이 저렴하여 S-1을 2차 수집지역으로 선정하였음.

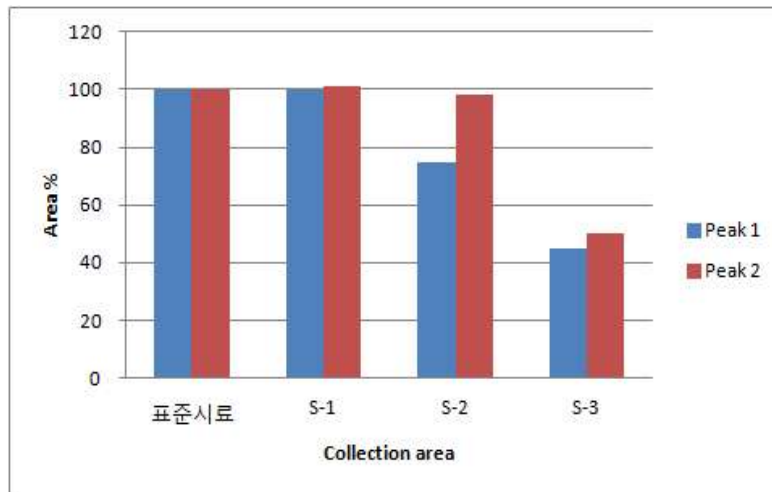


Figure 3-150. Peaks area % of raw material sourcing samples from various collection area for UG0602.

(3) UP438의 원물 소싱 결과

(가) 제품화를 위한 원물 확보

UP438 소재의 경우, 매년 특정시기에 채집이 이루어지기 때문에 시기별 원료채집이 원활하지 않았음. 이에 지역별 함량변이에 대한 연구를 우선 진행하였음.

국내외 10개 지역으로부터 UP438 소재 5개를 수집하여 유효성분 함량을 평가한 결과 1차 수집된 시료 중 S-5로부터 수집된 시료의 함량이 가장 높은 것으로 확인되었으나 표준시료에 비해 약간 낮은 유효성분 함량을 나타내었음.

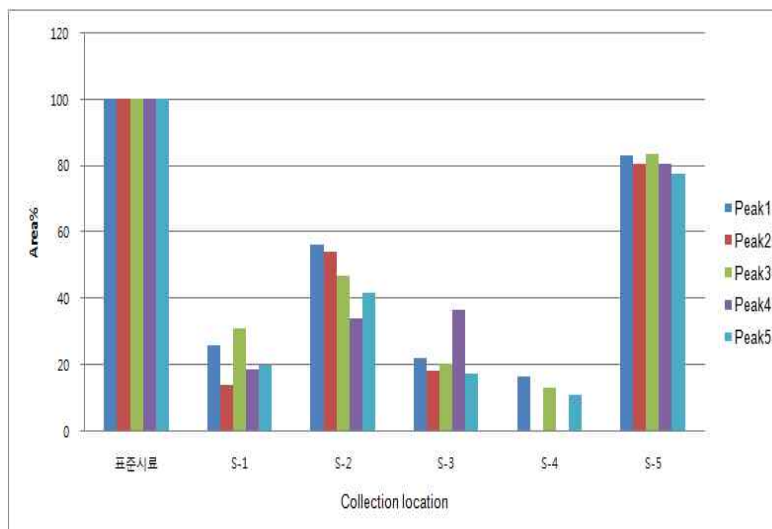


Figure 3-151. Peaks area % of raw material sourcing samples for UP438.

한국과 중국의 10개 지역으로부터 UP438 소재 6개를 추가로 수집하였음. 5개의 compound 중 3개를 유효성분으로 최종 결정한 후 1차 수집된 시료들과 함께 2차 수집시료들의 유효성분 함량을 표준시료와 비교한 결과 S-6으로부터 수집된 시료가 표준 시료와 가장 유사하고 가격이 저렴하여 최적의 후보소재 수집지역으로 선정하였음.

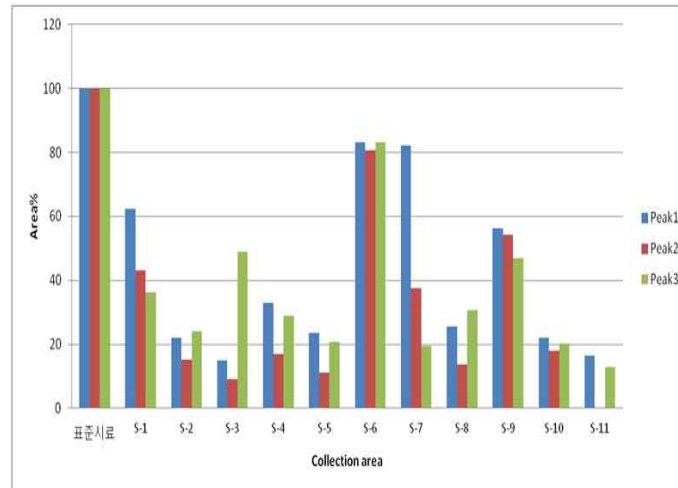


Figure 3-152. Peaks area % of raw material sourcing samples from various collection area for UP438.

(나) 대량생산 및 제품화를 위한 원물 소싱 연구

원물 소싱 연구결과로부터 도출된 최적의 원물 정보를 바탕으로, 선정된 수집지역으로부터 최적 원물의 안정적 공급을 위한 소싱 연구를 진행하였음.

선정된 수집지역으로부터 UP438 소재를 7회에 걸쳐 각 3시료씩 수집하여 유효성분 함량을 평가한 결과 수집된 19시료들 간의 함량변이는 표준시료 대비 82~117%를 보이고 있어 최적 원물의 안정적인 공급이 가능할 것으로 예상되었음.

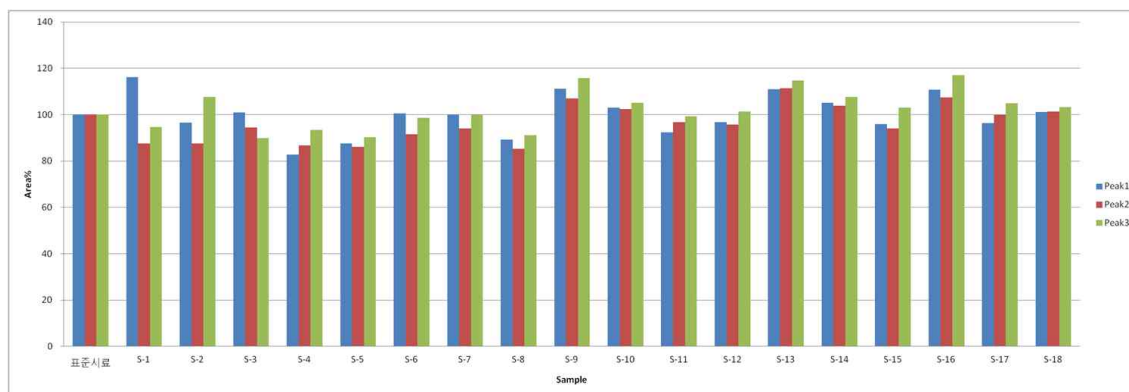


Figure 3-153. Peaks area % of raw material sourcing samples from selected collection area for UP438.

(다) 시생산용 대량 원물 확보 및 제 2차 원물 공급처 선정을 위한 연구

원물 소싱 연구 결과로 선정된 최적의 원물 수집지역으로부터 Clinical trial 시료 준비를 위한 pilot 생산에 필요한 대량 원물을 확보하였음. 확보된 대량 원물의 품질을 평가하기 위하여 입고된 4 packages의 전수 검사를 실시하였음. 4 packages의 UP438 원물의 일부를 sampling 하여 유효성분 함량을 평가한 결과 확보된 4 package 시료들은 모두 표준시료 대비 92~104%를 보이고 있어 Clinical trial 시료 준비를 위한 pilot 생산에 적합하였음.

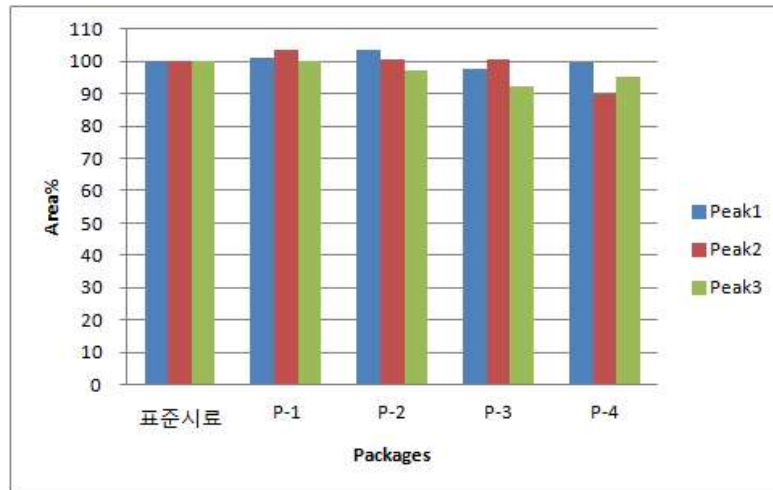


Figure 3-154. Peaks area % of Bulk materials (4 packages) secured for Clinical trial.

원물 소싱 연구 결과로 선정된 최적의 원물 수집지역 외에 2차 수집지역을 선정하기 위하여 추가적인 소싱 연구를 진행하였음. 중국내 4개 지역으로부터 UP438 소재를 수집하여 유효성분 함량 및 가격을 고려하여 평가한 결과 S-2로부터 수집된 시료가 표준 시료와 가장 유사하고 가격이 저렴하여 S-2를 2차 수집지역으로 선정하였음.

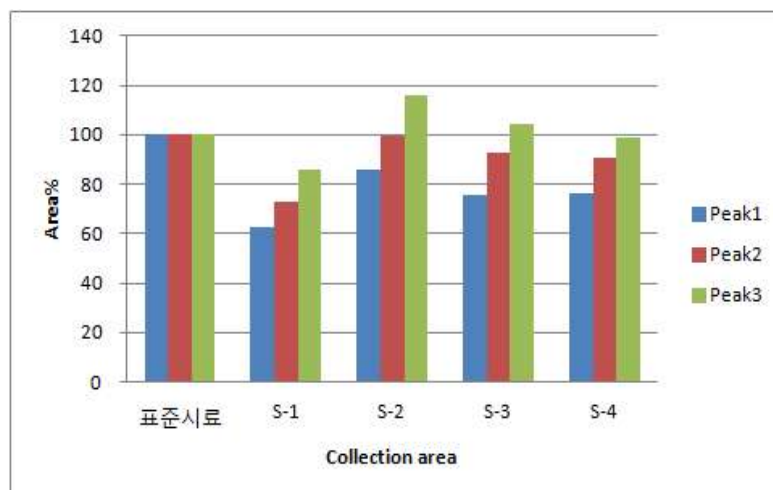


Figure 3-155. Peaks area % of raw material sourcing samples from various collection area for UP438.

(4) P01999의 원물 소싱 결과

(가) 제품화를 위한 원물 확보

P01999 소재의 원산지는 연중 비슷한 기후지역으로 시기에 따른 함량 변이보다 지역에 따른 소재에 관한 연구가 우선시되었음. 이에 산지에 따른 소재의 함량변이 연구를 진행하였음.

남아메리카의 2개국으로부터 P01999 소재를 수집하여 유효성분 함량을 평가한 결과 1차년도 수집된 시료 중 S-2로부터 수집된 시료가 표준시료와 가장 유사하였음.

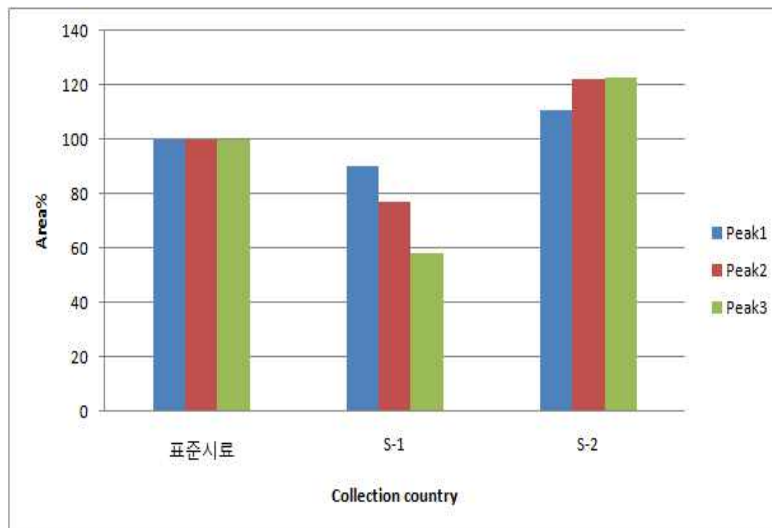


Figure 3-156. Peaks area % of raw material sourcing samples for P01999.

각 지역으로부터 P01999의 3소재를 추가로 추가로 수집하였음. 3개의 compound 중 2개를 유효성분으로 최종 결정한 후 1차 수집된 시료들과 함께 2차 수집시료들의 유효성분 함량을 표준시료와 비교한 결과 S-3으로부터 수집된 시료가 표준 시료와 가장 유사하고 가격이 저렴하여 최적의 후보소재 수집지역으로 선정하였음.

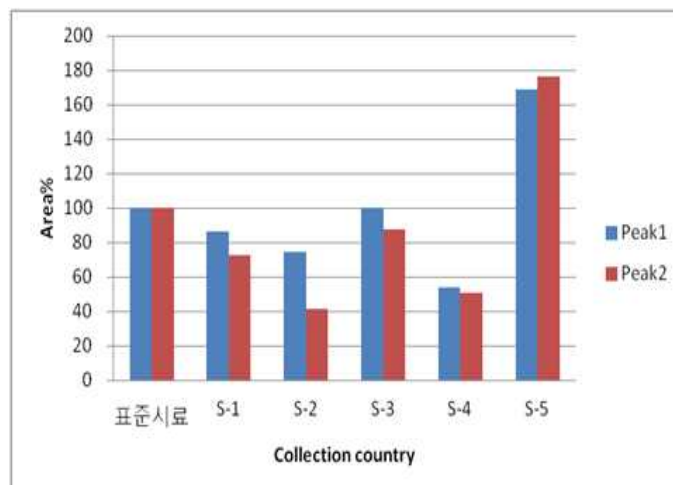


Figure 3-157. Peaks area % of raw material sourcing samples from various collection area for P01999.

(나) 대량생산 및 제품화를 위한 원물 소싱 연구

원물 소싱 연구결과로부터 도출된 최적의 원물 정보를 바탕으로, 선정된 수집지역으로 부터 최적 원물의 안정적 공급을 위한 소싱 연구를 진행하였음.

선정된 수집지역으로 부터 P01999 소재를 5회 수집하여 유효성분 함량을 평가한 결과 2차년도 수집된 5시료들의 함량변이는 표준시료대비 83~120%를 보이고 있어 최적 원물의 안정적인 공급이 가능할 것으로 예상되었음.

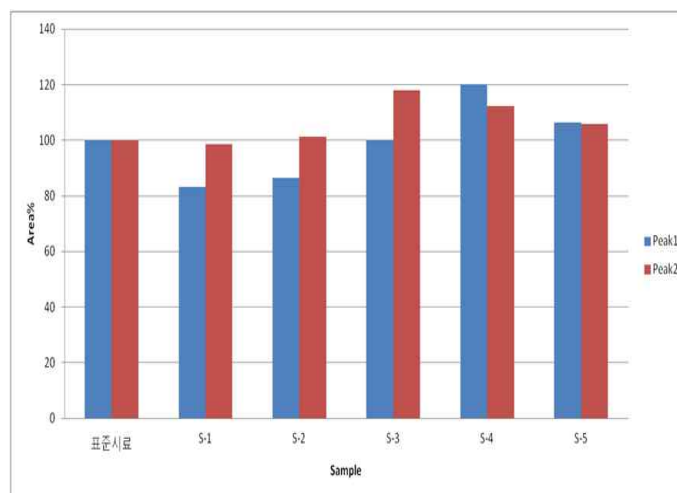


Figure 3-158. Peaks area % of raw material sourcing samples from selected collection area for P01999.

(다) 시생산용 대량 원물 확보 및 제 2차 원물 공급처 선정을 위한 연구

원물 소싱 연구 결과로 선정된 최적의 원물 수집지역으로부터 Clinical trial 시료 준비를 위한 pilot 생산에 필요한 대량 원물을 확보하였음. 확보된 대량 원물의 품질을 평가하기 위하여 입고된 3 packages의 전수 검사를 실시하였음. 3 packages의 P01999 원물의 일부를 sampling 하여 유효성분 함량을 평가한 결과 확보된 3 package 시료들은 모두 표준시료 대비 95~117%를 보이고 있어 Clinical trial 시료 준비를 위한 pilot 생산에 적합하였음.

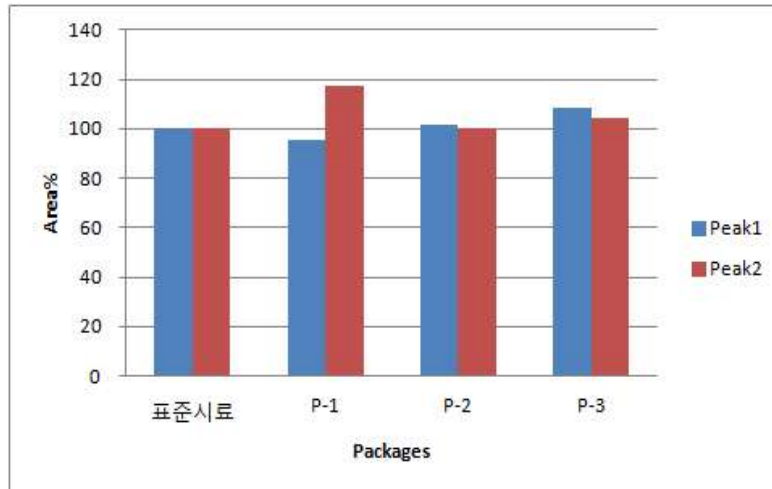


Figure 3-159. Peaks area % of Bulk materials (3 packages) secured for Clinical trial.

원물 소싱 연구 결과로 선정된 최적의 원물 수집지역 외에 2차 수집지역을 선정하기 위하여 추가적인 소싱 연구를 진행하였음. 남아메리카 3개 지역으로부터 P01999 소재를 수집하여 유효성분 함량 및 가격을 고려하여 평가한 결과 S-2로부터 수집된 시료가 표준 시료와 가장 유사하고 가격이 저렴하여 S-2를 2차 수집지역으로 선정하였음.

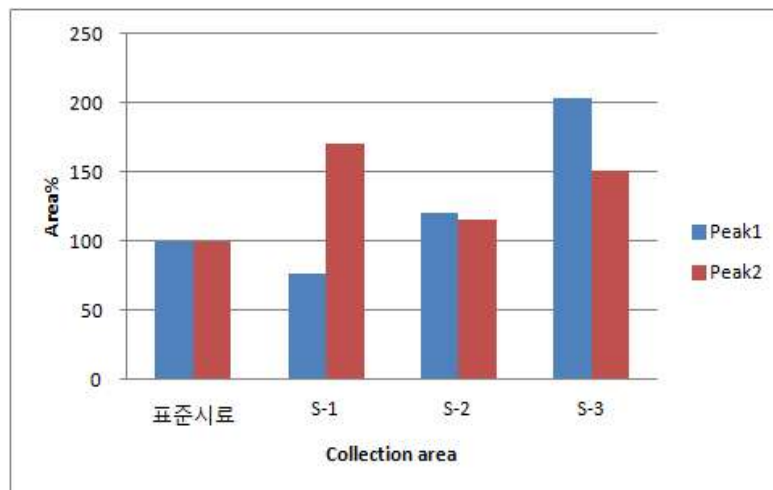


Figure 3-160. Peaks area % of raw material sourcing samples from various collection area for P01999.

(5) UP331 의 원물 소싱 결과

(가) 제품화를 위한 원물 확보

한국과 중국의 5개 지역으로부터 UP331 소재를 수집하여 유효성분 함량 및 가격을 고려하여 평가한 결과 S-2로부터 수집된 시료가 표준 시료와 가장 유사하고 가격이 저렴하여 최적의 후보소재 수집지역으로 선정하였음.

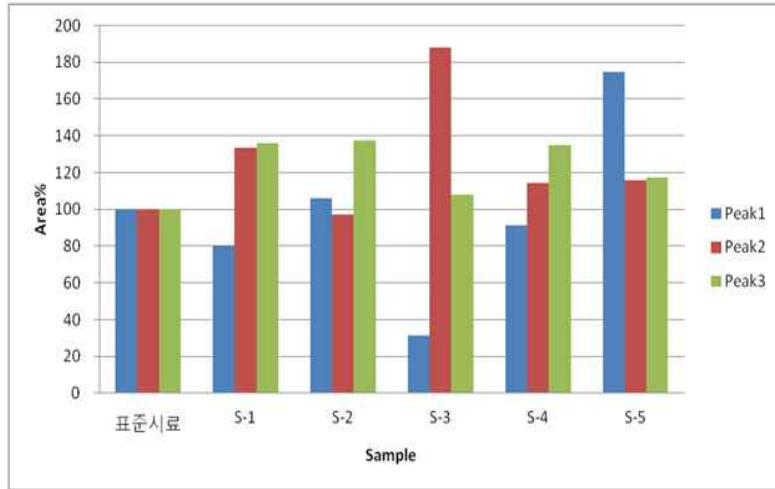


Figure 3-161. Peaks area % of raw material sourcing samples from various collection area for UP331.

(나) 대량생산 및 제품화를 위한 원물 소싱 연구

원물 소싱 연구결과로부터 도출된 최적의 원물 정보를 바탕으로, 선정된 수집지역으로 부터 최적 원물의 안정적 공급을 위한 소싱 연구를 진행하였음.

선정된 수집지역으로 부터 UP331 소재를 6회에 걸쳐 2시료씩 수집하여 유효성분 함량을 평가한 결과 수집된 12시료들 간의 함량변이는 표준시료대비 89~118%를 보이고 있어 최적 원물의 안정적인 공급이 가능할 것으로 예상되었음.

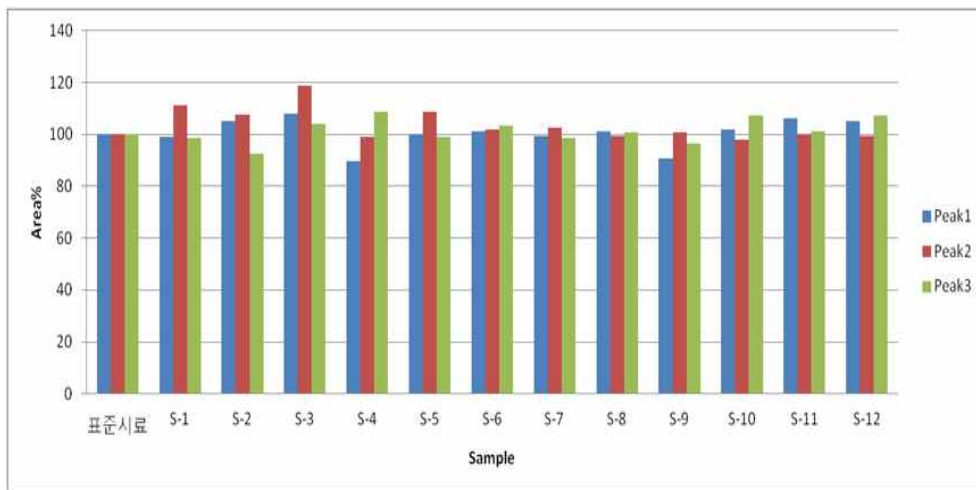


Figure 3-162. Peaks area % of raw material sourcing samples from selected collection area for UP331.

(다) 시생산용 대량 원물 확보 및 제 2차 원물 공급처 선정을 위한 연구

원물 소싱 연구 결과로 선정된 최적의 원물 수집지역으로부터 Clinical trial 시료 준비를 위한 pilot 생산에 필요한 대량 원물을 확보하였음. 확보된 대량 원물의 품질을 평가하기 위

하여 입고된 3 packages의 전수 검사를 실시하였음. 3 packages의 UP331 원물의 일부를 sampling 하여 유효성분 함량을 평가한 결과 확보된 3 package 시료들은 모두 표준시료 대비 95~108%를 보이고 있어 Clinical trial 시료 준비를 위한 pilot 생산에 적합하였음.

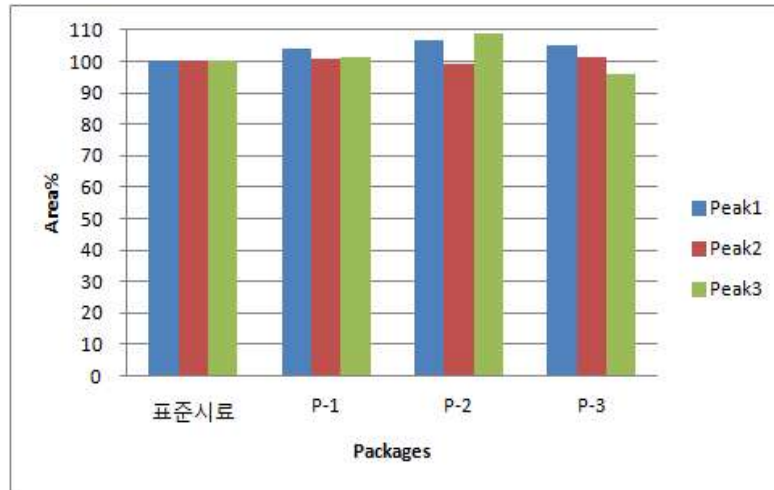


Figure 3-163. Peaks area % of Bulk materials (3 packages) secured for Clinical trial.

원물 소싱 연구 결과로 선정된 최적의 원물 수집지역 외에 2차 수집지역을 선정하기 위하여 추가적인 소싱 연구를 진행하였음. 중국내 2개 지역으로부터 UP331 소재를 수집하여 유효성분 함량 및 가격을 고려하여 평가한 결과 S-2로부터 수집된 시료가 표준 시료와 가장 유사하고 가격이 저렴하여 S-2를 2차 수집지역으로 선정하였음.

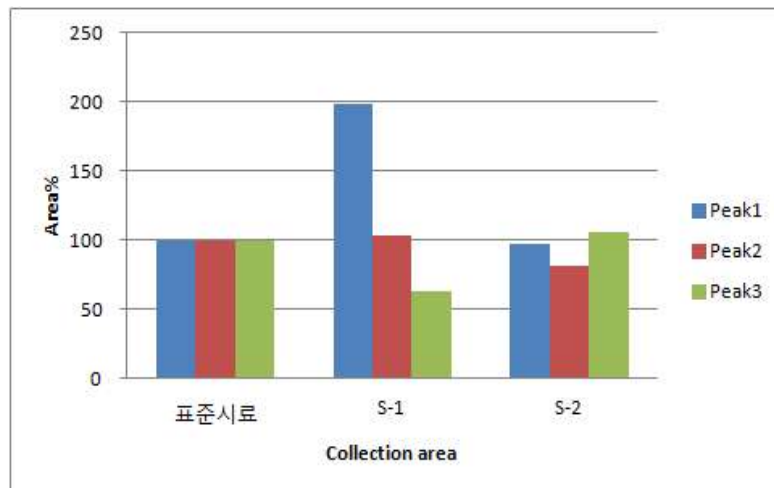


Figure 3-164. Peaks area % of raw material sourcing samples from various collection area for UP331.

(6) UP342 의 원물 소싱 결과

(가) 제품화를 위한 원물 확보

한국과 미국의 4개 지역으로부터 UP342 소재를 수집하여 유효성분 함량을 평가한 결과 S-1로 부터 수집된 시료가 표준시료와 가장 유사하여 최적의 후보소재 수집지역으로 선정 하였음.

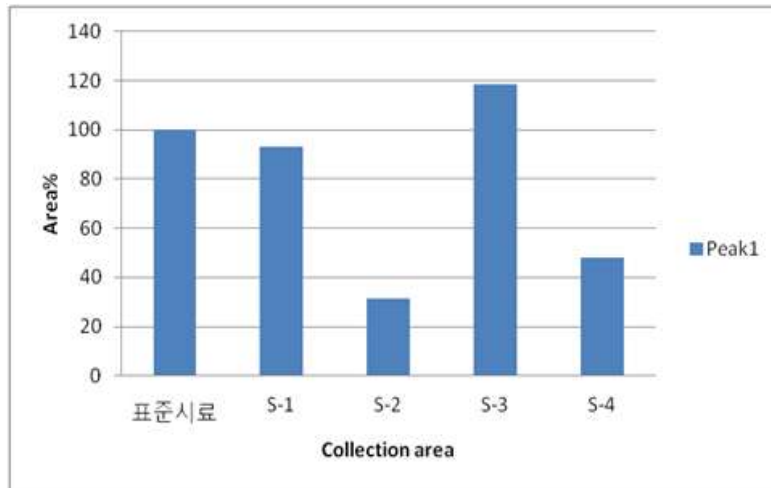


Figure 3-165. Peaks area % of raw material sourcing samples from various collection area for UP342.

(나) 대량생산 및 제품화를 위한 원물 소싱 연구

원물 소싱 연구결과로부터 도출된 최적의 원물 정보를 바탕으로, 선정된 수집지역으로 부터 최적 원물의 안정적 공급을 위한 소싱 연구를 진행하였음.

선정된 수집지역으로 부터 UP342 소재를 5회 수집하여 유효성분 함량을 평가한 결과 수집 된 5시료들 간의 함량변이는 표준시료대비 88~109%를 보이고 있어 최적 원물의 안정적인 공급이 가능할 것으로 예상되었음.

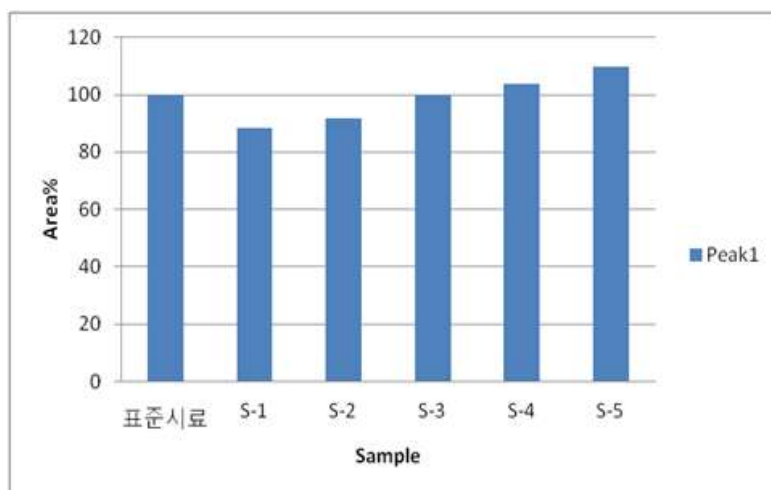


Figure 3-166. Peaks area % of raw material sourcing samples from selected collection area for UP342.

(다) 시생산용 대량 원물 확보 및 제 2차 원물 공급처 선정을 위한 연구

원물 소싱 연구 결과로 선정된 최적의 원물 수집지역으로부터 Clinical trial 시료 준비를 위한 pilot 생산에 필요한 대량 원물을 확보하였음. 확보된 대량 원물의 품질을 평가하기 위하여 입고된 2 packages의 전수 검사를 실시하였음. 2 packages의 UP342 원물의 일부를 sampling 하여 유효성분 함량을 평가한 결과 확보된 2 package 시료들은 모두 표준시료 대비 108~113%를 보이고 있어 Clinical trial 시료 준비를 위한 pilot 생산에 적합하였음.

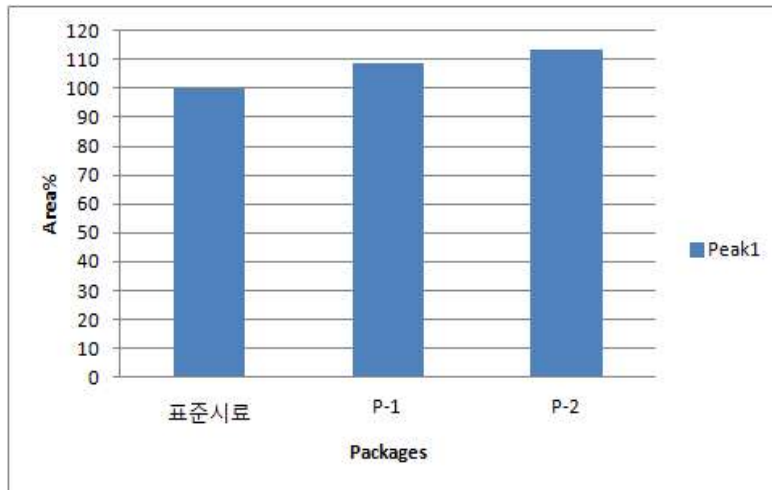


Figure 3-167. Peaks area % of Bulk materials (2 packages) secured for Clinical trial.

원물 소싱 연구 결과로 선정된 최적의 원물 수집지역 외에 2차 수집지역을 선정하기 위하여 추가적인 소싱 연구를 진행하였음. 미국 2개 지역으로부터 UP342 소재를 수집하여 유효 성분 함량 및 가격을 고려하여 평가한 결과 S-2로부터 수집된 시료가 표준 시료와 가장 유사하고 가격이 저렴하여 S-2를 2차 수집지역으로 선정하였음.

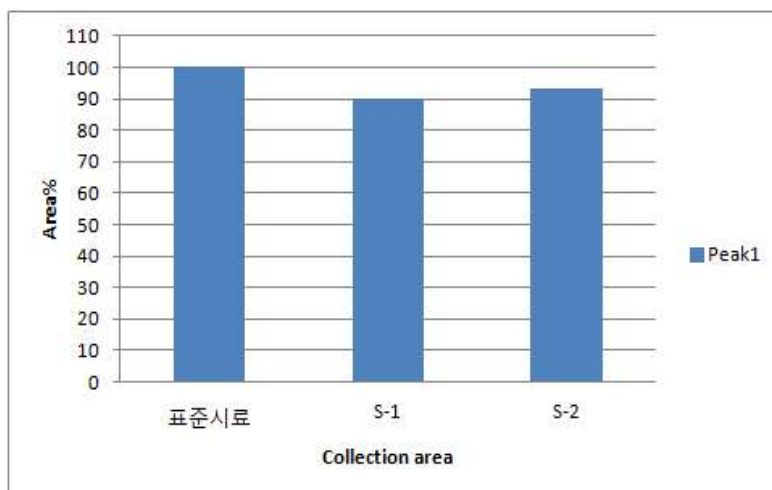


Figure 3-168. Peaks area % of raw material sourcing samples from various collection area for UP342.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2010.07 ~2011.04)	제1협동	확보자원의 CB1 signaling 특성 분석, in vitro 연구	120	<ul style="list-style-type: none"> - , 세포주를 이용한 CB-1 발현모델 확립 - , 세포주를 이용한 CRE Luc activity 발현모델 확립 - , 기 도출된 후보소재의 cAMP 생성 억제에 대한 길항작용 평가 완료 - , 기 도출된 후보소재의 CRE Luc activity에 대한 길항작용 평가 완료 - , 추가 기전연구; 혈소판응집억제능 평가 수행완료
	주관 (제1세부)	전임상 예상 후보물질에 대한 in vitro 기전연구	110	<ul style="list-style-type: none"> - , 3T3-L1 preadipocyte 를 이용한 지방세포 분화 및 지방축적모델 확립 - , 기 도출된 후보소재에 대한 지방생성 억제능 확인 - , Preadipocyte 및 adipocyte 를 이용한 세포 독성 확인 - , 추가 효능 연구; 기준규격 설정을 위한 유효 성분의 지방 생성 억제능 확인
		전임상 예상 후보물질에 대한 In vivo 효능 평가	120	<ul style="list-style-type: none"> - , 기 선정된 소재에 대한 DIO mice에서의 효능 평가 완료 및 4종의 최종 후보소재 선정 완료 - , 1차 도출된 8 개 소재에 대한 DIO rat에서 효능 확인 및 최종 후보소재 선정 완료 - , 최종 후보소재에 대한 비만실험동물에서 용량 결정시험 실시 완료 - , 1차 도출된 후보소재의 안전성 평가를 통한 후보소재 선정 완료 - , 추가 효능 연구; 식욕억제 효능 평가를 위한 Acute feed intake test
		전임상 예상 후보물질에 대한 유효성분 분석 및 제품화를 위한 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> - , 최종 도출 후보소재에 대한 LC/MS 분석완료 - , 기준규격 설정을 위한 유효성분 구조 동정 완료 - , Lab-scale 생산방법 확립완료 - , 차기 년도 연구수행을 위한 표준추출물 확보완료 - , 최종 도출 후보소재에 대한 원물 소싱

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2011.0 7~2012. 04)	제1협동	Forskolin-유도 생성된 cAMP의 억제에 대한 길항작용 점검 및 CB1 수용체 활성화에 의한 Ca ²⁺ signaling 억제작용에 대한 길항작용 점검	110	- , 후보물질의 캐너비노이드수용체 신호전달작용에 대한 길항작용 유무를 조사하기 위하여 CB1 수용체에 대한 마리화나 수용체 agonist를 단독 처리 및 후보물질과 함께 처리하여 길항작용을 조사함 - , 캐너비노이드 수용체 CB1을 활성화 시키면 세포질 내 Ca ²⁺ 의 농도가 증가하므로 후보물질이 CB1 agonist로 유도된 Ca ²⁺ 를 억제시키는 지 여부를 조사함 - , 비만 치료효능을 갖는 후보물질이 혈소판 응집 반응을 억제하므로 복합적인 대사성질환에 대한 - , 치료효과를 보이는지 여부를 조사함 - , 전임상 물질의 NO억제능 확인 및 염증 마커 발현 확인
		3T3 L1 preadipocyte를 이용한 in vitro 작용 기전 연구	100	- , 전임상 물질에 의한 3T3 L1 preadipocyte에서 비만 작용 확인
	주관 (제1세부)	임상시험자료 확보를 위한 in vivo 효능 확인 평가	120	- , DIO model 을 이용하여 전임상물질의 효능 및 용량 확인 실험 수행 - , 추가 연구: 임상시험 CRO 선정 완료 및 프로토콜 협의 진행 중
		임상시험자료 확보를 위한 안전성 시험	100	- , 전임상물질의 임상시험 진행을 위한 안전성 자료 확보 시험 수행
		대량생산 및 제품화를 위한 생산 공정 개발	100	- , 확립된 표준 추출물 제조법을 바탕으로 대량생산 및 제품화를 위한 생산 공정을 개발함
		표준 추출물 및 품질관리를 위한 분석법 개발	100	- , 표준 추출물 및 품질 관리를 위한 분석법을 개발하고 확립함
		소재의 장기보관 및 가속조건에서 안정성 시험	100	- , 최종 제품의 저장방법 및 사용기간을 설정하기 위한 안정성시험을 실시함.
		원물 소싱	100	- , 대량생산 및 제품화를 위한 원활한 원물 소싱
		원물의 분광학적 패턴 연구	100	- , 전임상 물질의 유효 및 지표 성분에 대한 분광학적 연구를 수행함

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2012 .07~201 2.06)	제1협동	Forskolin-유도 생성된 cAMP의 억제에 대한 길항작용 점검 CB1 수용체 활성화에 의한 Ca ²⁺ signaling 억제작용에 대한 길항작용 점검	100	- , 임상 시험 물질의 캐너비노이드 수용체 신호 전달작용에 대한 길항작용을 조사함 - , 기능성분에 대한 혈소판 응집 억제능 확인 - , 기능성분의 작용기전 확인
	주관 (제1세부)	3T3 L1 preadipocyte를 이용한 in vitro 작용 기전 연구	110	- , 임상시험 물질의 지방 축적 억제능/분해능 확인 - . 임상시험물질에 대한 TG 억제능 확인 - , 임상 시험 물질에 대한 lipolysis능 확인 - , 임상 시험물질의 항산화능 확인 - , 임상시험 물질에 대한 leptin, Ghrelin 그리고 Insulin의 발현 확인
		임상시험자료 확보를 위한 in vivo 효능 확인 평가	110	- , DIO model을 이용한 임상시험 물질의 효능 확인 - , 비만 관련 혈액 마커 발현 확인 - , 임상시험과 연계된 결과 확보를 위하여 DEXA를 이용한 체성분 분석결과 확보함.
		임상시험 프로토콜 작성 및 임상시험 진행	100	- , 관계사 요청에 의하여 두 가지 소재에 대한 임상시험을 계획하고 진행 중에 있음. - , 12주 이중 맹검 임상시험 프로토콜 작성 및 IRB 승인 완료 / 시험 진행 중
		임상시험자료 확보를 위한 안전성 시험	110	- , 임상시험 후보 물질에 대한 랫드에서의 28일 반복 경구 독성 시험 결과 확보함. - , 추가 안전성 시험 연구: 미국 고객사의 요청에 의하여 GLP 90일 독성 시험 수행 중
		소재의 장기보관 및 가속조건에서 안정성 시험	100	- , 최종 제품에 대한 장기보관 및 가속조건에서의 안정성 시험 결과를 확보함.
		원물소싱	100	- , 대량생산 및 제품화를 위한 원물 소싱 완료함.
		표준 추출물 및 품질관리를 위한 분석법 개발	100	- , 최종 도출된 임상시험 소재의 표준 분석법 개발을 완료하고 기준규격을 설정하여 최종 제품에 대한 품질관리법을 확립함.
		상업화 연구	110	- , 최종 제품에 대한 대량생산공정을 확립하고 시생산 완료 제품에 대한 COA확보 완료 - , 당초 계획 대비 3개 소재를 발굴하고 현재 2개 소재 임상 진행 중 - , 2013년 11월 미국 Supply Side show 출시 예정

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

* 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

본 연구과제는 주관 연구기관인 (주)유니젠에서 자체 기술실시를 목표로 하였음. 과제 진행 결과 확보된 핵심기술인 ‘천연물 유래 체중조절 건강기능식품 소재 개발’에 대하여 기술실시를 완료하였음.

기술실시 거래명	기술실시 대상기관	발생일	기술료(원)	성과발생년도
천연물 유체 체중조절 건강기능식품 소재	(주)유니젠	2013-07-17	50,400,000	2012

또한 개발 완료된 UP601 및 UP603 소재에 대하여 2013년 11월 미국에서 개최되는 Supply Side West, 2013(The Venetian, Las Vegas, USA, 2013.11.12~16)에 제품을 출시하여 판매하고자 함.

현재는 자사 기준규격에 맞는 기존재배 농가 원물을 구매하여 생산하고 있으나 원료재배단계부터의 표준화를 하기 위하여 향후 유니젠 중국 해남도 농장에서의 시험재배를 계획하고 있음. 이에 필요한 재배기술은 우리나라의 농업기술을 이용하여 진행 할 예정임. 이에 따른 농업기술 수품에 따른 부가가치 창출 및 고용증대 효과를 기대할 수 있음.

본과제 완료에 따른 산업화 완료시 기대 실적을 아래와 같음.

기간	수입대체효과 (백만원/년)	수출증대효과 (백만원/년)	생산성 향상 효과 (백만원/년)	고용창출 효과 (인력양성인원수)	그 밖의 효과
과제 종료 후 1년	300	1000	30	1	
향후 기대효과	600	10,000	200	3	

* 교육·지도·홍보 등 기술 확산 계획 등

교육 성과 : 본 연구과제를 통하여 박사 1명 및 석사 2명의 인력 개발 성과를 달성하였음.

* 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

본 연구 개발 결과 2건의 특허를 출원하였으며 총 3건의 논문을 국외에 게재하였고 국내외 총 8 회 이상 연구결과를 학회에서 발표하였음. 연구진행 중에는 특허출원이전에 논문지표달성이 어려웠음. 특허출원이 완료됨에 따라 임상시험 물질인 UP601 및 UP603에 대하여 이미 확보한 in vitro와 in vivo 실험 결과를 바탕으로 논문 작성을 진행 중에 있음. 또한 성공적인 임상시험 결과 확보 시 이에 대한 논문 작성도 진행 할 예정임.

<특허 성과>

번호	출원국	출원 번호	제목
1	미국	13904851	COMPOSITIONS AND METHODS FOR MANAGING WEIGHT
2	PCT	PCT/US13/43188	COMPOSITIONS AND METHODS FOR MANAGING WEIGHT

<논문 게재 성과>

발행년도	제목	저자	잡지	상세정보	SCI 등급	
2012	Pistacia chinensis Methanolic Extract Attenuated MAPK and Akt Phosphorylations in ADP Stimulated Rat Platelets In Vitro	박지영 외	Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine	Volume 2012, Article ID 895729, 7 pages	국외	SCIE
2012	Pistacia chinensis Inhibits NO Production and Upregulates HO-1 Induction via PI-3K/Akt Pathway in LPS Stimulated Macrophage Cells	Taddesse Yayeh 외	Am. J. Chin. Med	2012.40:1085-1097	국외	SCIE
2013	Chlorin e6 prevents ADP-induced platelet aggregation by decreasing PI3K/Akt phosphorylation and promoting cAMP production	박지영 외	Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine	Volume 2013, Article ID 569160, 10 pages	국외	SCIE

<연구결과 발표 성과>

No.	학술대회 발표 내용
1	2011 대한수의학회 추계국제학술대회 The inhibitory activity of CE6 in ADP-induced platelet aggregation 박지영 외 6인 (2011.10.27.)
2	2011 대한의생명과학회 (The 17th annual meeting of the korean society for biomedical laboratory sciences) Anti-platelet activity of ethanol extract from Petasites japonicus 지현동 외 5인 (2011.10.28.)
3	2011 대한의생명과학회 (The 17th annual meeting of the korean society for biomedical laboratory sciences) Pistacia methanolic extract attenuates proinflammatory mediators and upregulates HO-1 induction in lipopolysaccharide stimulated murine macrophage RAW264.7 cells 타데세야웨이훈 외3인 (2011.10.28.)
4	2012 한국실험동물학회 동계심포지움 Stellera chamaejasme methanolic extract attenuates NO release and upregulates HO-1 induction in lipopolysaccharide stimulated murine macrophage RAW264.7 cells 타데세야웨이훈 외 6인 (2012.02.16.)
5	2012 한국실험동물학회 동계심포지움 Antidiabetic effects of extracts from Acanthopanax senticosus in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats 박지영 외 6인 (2012.02.16.)
6	2012 한국실험동물학회 동계심포지움 The anti-thrombotic activity of Petasites japonicus ethanol extract 지현동 외 5인 (2012.02.16.)
7	2013 Bangkok Internatinal Conference on Biological Engineering & Natural Science Pistacia chinensis inhibits NO production via PI-3K/Akt pathway in LPS-activated RAW264.7 cells 지현동 외 1인 (2013.01.206.)
8	2012 International Congress on Natural Products Research High throughput huaman pancreatic lipase screening of natural product library for lipase inhibition activity. Planta Med 2012; 78 - PI187 P Jiao 외 12인 (2012.07.18-8.1)

* 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

본연구과제의 핵심 기술 인 ‘천연물 유래 체중조절 건강기능식품 소재개발’ 연구 결과에 대하여 상업화 및 제품화에 요구되는 마케팅 자료 등의 확보를 위한 연구를 지속적으로 수행할 예정입니다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 과제 수행 중 수집한 해외과학기술 정보는 주로 2012년 연말에 미국 FDA에서 승인된 두 개의 비만치료제관련 정보가 있음. 그중 주요한 정보를 아래와 같이 간략히 기술하였음.

1) New obesity agents: lorcaserin and phentermine/topiramate.

Ann Pharmacother. 2013 Jul;47(7-8):1007-16. doi: 10.1345/aph.1R779. Epub 2013 Jun 25.

Fleming JW, McClendon KS, Riche DM.

Lorcaserin과 phentermine/topiramate 이 두 가지 약물은 비만(BMI $\geq 30\text{kg/mg}^2$) 혹은 과체중(BMI $\geq 27\text{kg/mg}^2$)과 동시에 고혈압, 지질대사이상, 당뇨를 앓고 있는 환자들을 대상으로 다이어트, 신체활동 증진에 대한 효능을 인정받아 최근 FDA에서 승인을 받음. Lorcaserin은 selective serotonin 5-HT_{2C} agonist로, 식이 섭취를 조절하며, phentermine/topiramate는 식욕을 억제하고 포만감을 증가시킴. 3가지 Phase 3 randomized, placebo-controlled trials의 연구보고에 따르면 약 75%, 45%의 환자들이 phentermine/topiramate 과 lorcaserin 각각의 약물을 섭취한 뒤 5% 이상, 그리고 5%의 체중 감량에 성공하였음.

종합해보면 생활습관의 개선과 동시에 phentermine/topiramate를 섭취하는 것은 체중감량에 가장 효과적이며, lorcaserin은 적당한 효능을 나타내는 것으로 판단됨. 향후 Long-term cardiovascular outcomes study에서 이 새로운 obesity agents의 효능과 안전성을 확인할 필요가 있음.

2) Lorcaserin: an investigational serotonin 2C agonist for weight loss.

Am J Health Syst Pharm. 2011 Nov 1;68(21):2029-37. doi: 10.2146/ajhp100638.

Hurren KM, Berlie HD.

이 논문은 selective serotonin (5-HT) agonist인 lorcaserin의 약리학, 약물동태학, 부작용에 대한 review논문으로, Phase III clinical trials로부터 효능과 안전성 data를 요약하였음.

Lorcaserin은 식욕 조절에 중요한 5-HT receptors의 한 subtype에 선택적으로 반응하며 심혈관계 부작용의 밑바탕이 되는 다른 5-HT-receptor subtypes에는 낮은 친화력을 가짐. 2 가지 Phase III trials에서 12달 후 5%의 체중감소를 보인 환자 비율은 Lorcaserin군이 47%, Placebo군이 20~25% 가량이었음($p < 0.0001$ for both trials). Lorcaserin은 임상시험에서 안전하게 투여되었으며, 가장 흔한 부작용으로는 메스꺼움, 구토, 두통, 현기증이 보고되었음. 현재까지의 3개의 Phase III trials중 2개는 심장 판막질환의 위험이 증가하지 않았으나, 당뇨에 초점을 두었던 다른 1개의 실험에서는 lorcaserin의 사용과 심장판막질환의 발병이 관련이 있는 것으로 추측됨. 요약하면, Lorcaserin은 5-HT(2C) agonist로서 비만 혹은 과체중에 다른 질병을 동반하고 있는 환자에 대한 효능을 검토하였는데 Phase III trials에서는 35%의 환자가 5% 이상의 체중감량을 나타냄.

3) Lorcaserin for weight management.

Diabetes Metab Syndr Obes. 2013 Jun 13;6:209-16. doi: 10.2147/DMSO.S36276

Taylor JR, Dietrich E, Powell J.

제 2형 당뇨병과 비만은 함께 동반되는 흔한 질병임. 비만은 인슐린저항성에 기여하며 제2형 당뇨병의 주요한 원인임. 체중 감량은 혈당, 지질, 혈압을 낮추며 심혈관계 질환의 위험을 낮춤. 체중 감량을 위해서는 생활습관 개선, 수술, 약물치료 등의 다양한 접근 방법이 있음. Lorcaserin은 항 비만약제로 central serotonin subtype 2A receptors에 영향을 주어 결과적으로 식이섭취를 감소시키고 포만감을 증가시킴. 제 2형 당뇨병을 가지는 비만 환자를 대상으로 1년간 실험한 결과 평균적으로 5.5kg의 체중감량이 있었음. Lorcaserin 섭취 후 두통, 요통, 비인두염, 메스꺼움이 가장 흔하게 나타나는 부작용임. 임상시험에서 고혈당증이 lorcaserin 그룹에서 흔하게 보였으나 심하지 않았음. 연구 결과들을 토대로 lorcaserin은 비만(BMI $\geq 30\text{kg}/\text{mg}^2$) 혹은 과체중(BMI $\geq 27\text{kg}/\text{mg}^2$)과 동시에 고혈압, 지질대사이상, 당뇨병 앓고 있는 환자들을 대상으로 하루에 두 번 10mg 섭취할 수 있도록 승인 받음. Lorcaserin은 당뇨병 동반 혹은 동반하지 않은 비만 환자의 체중 감량에 효과적임.

4) Phentermine/topiramate for the treatment of obesity.

Ann Pharmacother. 2013 Mar;47(3):340-9.

Smith SM, Meyer M, Trinkley KE.

3개의 Phase 3 trials (EQUIP, CONQUER, and SEQUEL)에서 PHEN/TPM을 섭취한 그룹은 placebo와 비교하여 지속적인 체중감량이 관찰됨. 56주간 PHEN/TPM을 15/92 mg, 7.5/46 mg, 그리고 3.75/23 mg 섭취한 결과 환자의 체중이 10.6%, 8.4%, 5.1% 감소하였음 ($p < 0.0001$). 52주간의 확장실험 (SEQUEL)에서는 7.5/46 mg, 15/92 mg PHEN/TPM군이 각각 9.3%, 10.5%의 체중감소효과가 지속되었음 ($p < 0.0001$). 상당수의 환자들이 5%, 10%, 15%보다 높은 체중감량효과를 얻었음. 허리둘레, 공복 중성지방, 공복 혈당 수치 또한 유의적으로 감소하였음. 이 약물은 안전하게 투여되었으며 이상감각, 어지럼증, 미각장애, 불면증, 변비, 구강건조증을 포함하는 부작용이 피실험자의 5% 혹은 그 이상 발생하였음. 즉, PHEN/TPM은 비만 혹은 과체중에 다른 질병을 동반하는 환자들을 대상으로 만성적인 비만 개선에 대해 승인을 받은 제품이며, 체중감량을 원하는 환자들이 선택할 수 있는 대안으로 여겨짐.

5) Two-year sustained weight loss and metabolic benefits with controlled-release phentermine/topiramate in obese and overweight adults (SEQUEL): a randomized, placebo-controlled, phase 3 extension study.

Am J Clin Nutr. 2012 Feb;95(2):297-308. doi: 10.3945/ajcn.111.024927. Epub 2011 Dec 7.

Garvey WT, Ryan DH, Look M, Gadde KM, Allison DB, Peterson CA, Schwierts M, Day WW, Bowden CH.

이 실험은 비만 혹은 과체중과 복합적 질환을 동시에 앓고 있는 환자들을 대상으로 phentermine/topiramate (PHEN/TPM CR)의 장기간 효능과 안전성을 평가하기 위해 설계 되었음. 실험은 placebo-controlled, double-blind로 진행되었으며 기간은 56주간 실험 후 52주간 확장실험을 하여 총 108주간 수행됨. 각 그룹과 섭취 농도는 다음과 같음 [placebo, 7.5 mg phentermine/46 mg controlled-release topiramate (7.5/46), 15 mg phentermine/92 mg controlled-release topiramate (15/92)]. 866명의 피실험자들 가운데 676명(78%)이 확장실험에 참가하였으며 84% 이상이 실험 종료까지 동원되었음. 108주째에 PHEN/TPM CR이 체중감량에 유의적인 영향을 미쳤음 (intent-to-treat with last observation carried forward; $P <$

0.0001 compared with placebo). 또한 least-squares mean percentage가 baseline 대비 -1.8%, -9.3%, -10.5% 변화하였음 (각각 placebo, 7.5/46, 15/92에 대한 수치). PHEN/TPM CR를 투여 받은 피실험자들은 placebo와 비교하여 $\geq 5\%$, $\geq 10\%$, $\geq 15\%$, 그리고 $\geq 20\%$ 의 체중감량 효과 보임 ($P < 0.001$). PHEN/TPM CR는 심혈관 및 대사 변수가 개선되었으며 당뇨병의 비율이 감소시켰음. 108주간 이 약물은 안전하게 투여되었으며, 실험 0주~56주와 비교하여 56~108주 동안의 부작용 비율 또한 줄었음. 생활습관의 개선과 동시에 PHEN/TPM CR를 섭취하면 안전하고 효과적인 비만 치료를 할 수 있을 것이라 결론지을 수 있음.

6) Controlled-release phentermine/topiramate in severely obese adults : a randomized controlled trial (EQUIP).

Obesity (Silver Spring). 2012 Feb;20(2):330-42. doi: 10.1038/oby.2011.330

Allison DB, Gadde KM, Garvey WT, Peterson CA, Schwierts ML, Najarian T, Tam PY, Troupin B, Day WW.

Phentermine/topiramate (PHEN/TPM CR)의 비만과 대사 증진에 대한 효능 및 안전성 평가 실험이 56주간 randomized controlled trial로 수행되어짐. class II and III 비만 단계(BMI ≥ 35 kg/m²)의 남성과 여성을 무작위로 placebo 그룹과 PHEN/TPM CR 3.75/23 mg, PHEN/TPM CR 15/92 mg 그룹으로 선별. 첫 번째 end points는 일부 환자가 체중감량 5% 도달을 기준으로 삼았으며 두 번째 end points는 허리둘레와 심장 수축기 확장기 혈압, 공복혈당과 지질 분석 수치를 포함. 56주 후 첫 번째 분석에서 placebo, 3.75/23, 15/92 그룹에서 각각 1.6%, 5.1%, 10.9% 체중이 감소하였음 ($P < 0.0001$). (In categorical analysis) 실험 56주 후에 placebo군이 17.3%, 3.75/23군이 44.9%, 15/92군이 66.7%의 비율로 baseline 체중의 최소 5% 감소하였음. 15/92군은 placebo군과 비교하여 허리둘레, 수축기 확장기 혈압, 공복 혈당, 중성지방, 총 콜레스테롤, LDL, HDL 수치가 현저하게 변화하였음. 가장 흔한 부작용은 감각 이상증, 구강 건조증, 변비, 미각장애, 불면증임. Placebo 환자들 가운데 47.1%가 중도 포기하였으며, 3.75/23 그룹 환자는 39.0%, 15/92환자는 33.6% 포기하였음. PHEN/TPM CR은 체중감량에 있어 dose-dependent effects를 나타내었으며 심각한 부작용 없이 치료에 이로울 것으로 기대됨.

7) 기타 수집한 자료

1. A new pyrroline compound selective for I1-imidazoline receptors improves metabolic syndrome in rats. J Pharmacol Exp Ther. 2013 Jul 1.
2. New obesity agents: lorcaserin and phentermine/topiramate. Ann Pharmacother. 2013 Jul;47(7-8):1007-16. doi: 10.1345/aph.1R779.
3. LXR is a negative regulator of glucose uptake in human adipocytes. Diabetologia. 2013 Jun 15.
4. Reducing the Risk of Obesity: Defining the Role of Weight Loss Drugs. Pharmacotherapy. 2013 May 26. doi: 10.1002/phar.1277.
5. pRb is an obesity suppressor in hypothalamus and high-fat diet inhibits pRb in this location. EMBO J. 2013 Mar 20;32(6):844-57. doi: 10.1038/emboj.2013.25.
6. Nonreceptor tyrosine phosphatase Shp2 promotes adipogenesis through inhibition of p38 MAP kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jan 2;110(1):E79-88. doi:

10.1073/pnas.1213000110.

7. Clinical utility of phentermine/topiramate (Qsymia™) combination for the treatment of obesity. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2013 Apr 8;6:131–9. doi: 10.2147/DMSO.S43403.
8. Obesity pharmacotherapy: current perspectives and future directions. *Curr Cardiol Rev.* 2013 Feb 1;9(1):33–54.
9. Phentermine and topiramate extended release (Qsymia™): first global approval. *Drugs.* 2012 Oct 22;72(15):2033–42.
10. Efficacy and tolerability of a novel herbal formulation for weight management in obese subjects: a randomized double blind placebo controlled clinical study. *Lipids Health Dis.* 2012 Sep 20;11:122. doi: 10.1186/1476-511X-11-122.
11. Lorcaserin: an investigational serotonin 2C agonist for weight loss. *Am J Health Syst Pharm.* 2011 Nov 1;68(21):2029–37. doi: 10.2146/ajhp100638.
12. Lorcaserin: an investigational serotonin 2C agonist for weight loss. *Am J Health Syst Pharm.* 2011 Nov 1;68(21):2029–37. doi: 10.2146/ajhp100638.
13. Rare variants in single-minded 1 (SIM1) are associated with severe obesity. *The Journal of Clinical Investigation* Volume 123 Number 7 July 2013
14. New mechanisms and the anti-inflammatory role of curcumin in obesity and obesity-related metabolic diseases. *Eur J Nutr.* 2011 Apr;50(3):151–61. doi: 10.1007/s00394-011-0188-1.
15. The roles of transforming growth factor- β and Smad3 signaling in adipocyte differentiation and obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Apr 1;407(1):68–73. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.02.106.
16. Phentermine/topiramate for the treatment of obesity. *Ann Pharmacother.* 2013 Mar;47(3):340–9.
17. Two-year sustained weight loss and metabolic benefits with controlled-release phentermine/topiramate in obese and overweight adults (SEQUEL): a randomized, placebo-controlled, phase 3 extension study. *Am J Clin Nutr.* 2012 Feb;95(2):297–308. doi: 10.3945/ajcn.111.024927.
18. Controlled-release phentermine/topiramate in severely obese adults: a randomized controlled trial (EQUIP). *Obesity (Silver Spring).* 2012 Feb;20(2):330–42. doi: 10.1038/oby.2011.330.
19. The FDA's Assessment of Two Drugs for Chronic Weight Management. *N Engl J Med.* 2012 Oct 25;367(17):1577–9. doi: 10.1056/NEJMp1211277.
20. Pharmacotherapy of obesity: clinical treatments and considerations. *Am J Med Sci.* 2013 Apr;345(4):284–8. doi: 10.1097/MAJ.0b013e31828abcfd. Review.
21. Lorcaserin for weight management. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2013 Jun 13;6:209–16. doi: 10.2147/DMSO.S36276.
22. Lorcaserin: a review of its use in chronic weight management. *Drugs.* 2013 Apr;73(5):463–73. doi: 10.1007/s40265-013-0035-1.
23. Inhibitory activities of *Ulva lactuca* polysaccharides on digestive enzymes related to

- diabetes and obesity. *Arch Physiol Biochem*. 2013 May;119(2):81-7. doi: 10.3109/13813455.2013.775159.
24. Combined treatment of betulinic acid, a PTP1B inhibitor, with *Orthosiphon stamineus* extract decreases body weight in high-fat-fed mice. *J Med Food*. 2013 Jan;16(1):2-8. doi: 10.1089/jmf.2012.2384.
 25. Green tea polyphenols reduced fat deposits in high fat-fed rats via erk1/2-PPAR γ -adiponectin pathway. *PLoS One*. 2013;8(1):e53796. doi: 10.1371/journal.pone.0053796.
 26. Triphala and its constituents ameliorate visceral adiposity from a high-fat diet in mice with diet-induced obesity. *Altern Ther Health Med*. 2012 Nov-Dec;18(6):38-45.
 27. Green tea for weight loss and weight maintenance in overweight or obese adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Dec 12;12:CD008650. doi: 10.1002/14651858.CD008650.pub2.
 28. Differential effects of grape powder and its extract on glucose tolerance and chronic inflammation in high-fat-fed obese mice. *J Agric Food Chem*. 2012 Dec 26;60(51):12458-68. doi: 10.1021/jf3028107.
 29. Anti-obesity effects of onion extract in Zucker diabetic fatty rats. *Nutrients*. 2012 Oct 22;4(10):1518-26. doi: 10.3390/nu4101518.
 30. *Aristolochia manshuriensis* Kom inhibits adipocyte differentiation by regulation of ERK1/2 and Akt pathway. *PLoS One*. 2012;7(11):e49530. doi: 10.1371/journal.pone.0049530.
 31. Black soybean anthocyanins inhibit adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Nutr Res*. 2012 Oct;32(10):770-7. doi: 10.1016/j.nutres.2012.06.008.
 32. *Alpinia officinarum* inhibits adipocyte differentiation and high-fat diet-induced obesity in mice through regulation of adipogenesis and lipogenesis. *J Med Food*. 2012 Nov;15(11):959-67. doi: 10.1089/jmf.2012.2286.
 33. Anti-obesity effects of chitosan and psyllium husk with L-ascorbic acid in guinea pigs. *Int J Vitam Nutr Res*. 2012 Apr;82(2):113-20. doi: 10.1024/0300-9831/a000100.
 34. Anti-obesity effects of glabridin-rich supercritical carbon dioxide extract of licorice in high-fat-fed obese mice. *Food Chem Toxicol*. 2013 Jan;51:439-45. doi: 10.1016/j.fct.2012.08.048.
 35. *Lithospermum erythrorhizon* suppresses high-fat diet-induced obesity, and acetylshikonin, a main compound of *Lithospermum erythrorhizon*, inhibits adipocyte differentiation. *J Agric Food Chem*. 2012 Sep 12;60(36):9089-96. doi: 10.1021/jf3017404.
 36. Consumption of *Pueraria* flower extract reduces body mass index via a decrease in the visceral fat area in obese humans. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2012;76(8):1511-7.
 37. *Buddleja officinalis* Maximowicz extract inhibits lipid accumulation on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells and high-fat mice. *Molecules*. 2012 Jul 23;17(7):8687-95. doi: 10.3390/molecules17078687.
 38. Anti-obese activity of *Butea monosperma* (Lam) bark extract in experimentally

- induced obese rats. *Indian J Exp Biol.* 2012 Jul;50(7):476–83.
39. Serviceberry [*Amelanchier alnifolia* (Nutt.) Nutt. ex. M. Roem (Rosaceae)] leaf extract inhibits mammalian α -glucosidase activity and suppresses. *J Ethnopharmacol.* 2012 Sep 28;143(2):481–7. doi: 10.1016/j.jep.2012.06.054.
 40. Extracts of *Scutellaria baicalensis* reduced body weight and blood triglyceride in db/db Mice. *Phytother Res.* 2013 Feb;27(2):244–50. doi: 10.1002/ptr.4691.
 41. Antiobesity effects of Chinese black tea (Pu-erh tea) extract and gallic acid. *Phytother Res.* 2012 Apr;26(4):475–81. doi: 10.1002/ptr.3602
 42. Anti-obesity properties of a *Sasa quelpaertensis* extract in high-fat diet-induced obese mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012;76(4):755–61.
 43. Tetrahydro iso- α acids from hops improve glucose homeostasis and reduce body weight gain and metabolic endotoxemia in high-fat diet-fed mice. *PLoS One.* 2012;7(3):e33858. doi: 10.1371/journal.pone.0033858.
 44. Effects of lotus root (the edible rhizome of *Nelumbo nucifera*) on the development of non-alcoholic fatty liver disease in obese diabetic db/db mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012;76(3):462–6.
 45. Anti-obesity effect of a standardised ethanol extract from *Curcuma longa* L. fermented with *Aspergillus oryzae* in ob/ob mice and primary mouse adipocytes. *J Sci Food Agric.* 2012 Jul;92(9):1833–40. doi: 10.1002/jsfa.5592.
 46. Beneficial effects of catechin-rich green tea and inulin on the body composition of overweight adults. *Br J Nutr.* 2012 Mar;107(5):749–54. doi: 10.1017/S0007114511005095.
 47. Effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate on newly developed high-fat/Western-style diet-induced obesity and metabolic syndrome in mice. *J Agric Food Chem.* 2011 Nov 9;59(21):11862–71. doi: 10.1021/jf2029016.
 48. Anti-obesity and antioxidative effects of purple sweet potato extract in 3T3-L1 adipocytes in vitro. *J Med Food.* 2011 Oct;14(10):1097–106. doi: 10.1089/jmf.2010.1450.
 49. Effect of garlic on high fat induced obesity. *Acta Biol Hung.* 2011 Sep;62(3):244–54. doi: 10.1556/ABiol.62.2011.3.4.
 50. Anti-obesity and anti-diabetic effects of ethanol extract of *Artemisia princeps* in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *Food Funct.* 2011 Jan;2(1):45–52. doi: 10.1039/c0fo00129e.
 51. Improvements of mean body mass index and body weight in preobese and overweight Japanese adults with black Chinese tea (Pu-Erh) water extract. *Nutr Res.* 2011 Jun;31(6):421–8. doi: 10.1016/j.nutres.2011.05.004.
 52. Antiobesity effect of oil extract of ginseng. *J Med Food.* 2011 Jun;14(6):573–83. doi: 10.1089/jmf.2010.1313.
 53. The anti-angiogenic herbal composition Ob-X from *Morus alba*, *Melissa officinalis*, and *Artemisia capillaris* regulates obesity in genetically obese ob/ob mice. *Pharm Biol.* 2011 Jun;49(6):614–9. doi: 10.3109/13880209.2010.539617.

54. *Salacia reticulata* inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Ethnopharmacol.* 2011 Jun 14;136(1):67–74. doi: 10.1016/j.jep.2011.04.012.
55. Anti-obesity activity of *Allium fistulosum* L. extract by down-regulation of the expression of lipogenic genes in high-fat diet-induced obese mice. *Mol Med Rep.* 2011 May–Jun;4(3):431–5. doi: 10.3892/mmr.2011.451.
56. Antiobesity activities of indole-3-carbinol in high-fat-diet-induced obese mice. *Nutrition.* 2011 Apr;27(4):463–70. doi: 10.1016/j.nut.2010.09.006.
57. Mulberry water extracts possess an anti-obesity effect and ability to inhibit hepatic lipogenesis and promote lipolysis. *J Agric Food Chem.* 2011 Mar 23;59(6):2663–71. doi: 10.1021/jf1043508.
58. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. *Mol Cell Endocrinol.* 2011 Mar 30;335(2):110–5. doi: 10.1016/j.mce.2011.01.003.
59. Oleanolic acid reduces markers of differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *Nutr Res.* 2010 Dec;30(12):831–9. doi: 10.1016/j.nutres.2010.10.001.
60. Inhibition of adipocyte differentiation and adipogenesis by the traditional Chinese herb *Sibiraea angustata*. *Exp Biol Med (Maywood).* 2010 Dec;235(12):1442–9. doi: 10.1258/ebm.2010.010167.
61. Coffee polyphenols suppress diet-induced body fat accumulation by downregulating SREBP-1c and related molecules in C57BL/6J mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011 Jan;300(1):E122–33. doi: 10.1152/ajpendo.00441.2010.
62. Puerarin improves insulin resistance and modulates adipokine expression in rats fed a high-fat diet. *Eur J Pharmacol.* 2010 Dec 15;649(1–3):398–402. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.09.054.
63. Fucoxanthin-rich seaweed extract suppresses body weight gain and improves lipid metabolism in high-fat-fed C57BL/6J mice. *Biotechnol J.* 2010 Sep;5(9):961–9. doi: 10.1002/biot.201000215.
64. Effects of an extract obtained from fruits of *Euterpe oleracea* Mart. in the components of metabolic syndrome induced in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010 Dec;56(6):619–26. doi: 10.1097/FJC.0b013e3181f78da4.
65. Antiobesity and hypolipidemic effects of lotus leaf hot water extract with taurine supplementation in rats fed a high fat diet. *J Biomed Sci.* 2010 Aug 24;17 Suppl 1:S42. doi: 10.1186/1423-0127-17-S1-S42.
66. Antiobesity effects of *Kaempferia parviflora* in spontaneously obese type II diabetic mice. *J Nat Med.* 2011 Jan;65(1):73–80. doi: 10.1007/s11418-010-0461-2.
67. Water extract of *Houttuynia cordata* Thunb. leaves exerts anti-obesity effects by inhibiting fatty acid and glycerol absorption. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2010;56(2):150–6.
68. Improvement in high-fat diet-induced obesity and body fat accumulation by a *Nelumbo nucifera* leaf flavonoid-rich extract in mice. *J Agric Food Chem.* 2010 Jun

- 9;58(11):7075-81. doi: 10.1021/jf101415v.
69. Anti-obesity and hypolipidemic effects of ethanolic extract from *Alpinia officinarum* Hance (Zingiberaceae) in rats fed high-fat diet. *J Med Food*. 2010 Aug;13(4):785-91. doi: 10.1089/jmf.2009.1235.
 70. Anti-obesity and antihyperlipidaemic effect of *Hunteria umbellata* seed extract in experimental hyperlipidaemia. *J Ethnopharmacol*. 2010 Jul 20;130(2):307-14. doi: 10.1016/j.jep.2010.05.009.
 71. Metabolic disease prevention and suppression of fat accumulation by *Salacia reticulata*. *J Nat Med*. 2010 Jul;64(3):266-74. doi: 10.1007/s11418-010-0401-1.
 72. Prevention of diet-induced obesity by safflower oil: insights at the levels of PPARalpha, orexin, and ghrelin gene expression of adipocytes in mice. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2010 Mar 15;42(3):202-8.
 73. Suppression of murine preadipocyte differentiation and reduction of visceral fat accumulation by a *Petasites japonicus* ethanol extract in mice fed a high-fat diet. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010;74(3):499-503.
 74. Ethanolic extracts of *Brassica campestris* spp. rapa roots prevent high-fat diet-induced obesity via beta(3)-adrenergic regulation of white adipocyte lipolytic activity. *J Med Food*. 2010 Apr;13(2):406-14. doi: 10.1089/jmf.2009.1295.

제 7 장 참고문헌

1. Schemmer P. et al. Glycine reduces platelet aggregation. *Amino Acids*. 44, 925-931 (2013).
2. Martin H, McGhie TK, Bentley Hewitt, K, Christeller, J. PPARgamma as a sensor of lipase activity and a target for the lipase inhibitor orlistat. *Lipids Health Dis*. 12(1):48 (2013)
3. Proceedings of the 2013 Annual Meeting of the House of Delegates Council on Science and Public Health Reports. American Medical Association (2013).
4. Campbell D & Malik S. Obesity crisis: doctors demand soft drinks tax and healthier hospital food.
<http://www.guardian.co.uk/society/2013/feb/18/doctors-soft-drinks-tax-obesity?INTCMP=SRCH>. The Guardian (2013).
5. Blackett P, Tryggstad J, Krishnan S, Li S, Xu W, Alaupovic P, Quiroga C, Copeland K. Lipoprotein abnormalities in compound heterozygous lipoprotein lipase deficiency after treatment with a low-fat diet and orlistat. *J Clin Lipidol*. 7(2):132-9 (2013)
6. Nagaraju R, Joshi AK, Rajini PS. Estimation of plasma triglycerides with correction for free glycerol by orlistat inhibition of lipoprotein lipase activity. *Anal Biochem*. 439(1):44-6. (2013)
7. 영양안전정책과, 식. 12년 건강기능식품 생산실적 분석결과 발표. (2012).
8. 보건복지부. 2012 보건복지통계연보. 58호 (2012).
9. 장영식 et al. 2012 OECD 등 국제기구 통계 생산 및 관리. (2012).
10. 식품의약품안전청. 건강기능식품 기능성 원료 및 기준 규격 인정에 관한 규정. (2012).
11. Ma F, Gao Y, Qiao H, Hu X & Chang J. Antiplatelet activity of 3-butyl-6-bromo-1(3H)-isobenzofuranone on rat platelet aggregation. *J Thromb Thrombolysis*. 33, 64-73 (2012).
12. Kim G. et al. Citrus aurantium flavonoids inhibit adipogenesis through the Akt signaling pathway in 3T3-L1 cells. *BMC complementary and alternative medicine* 12, 31, doi:10.1186/1472-6882-12-31 (2012).
13. Kumar DJ & Santhi RJ. Antioxidant and cytotoxic effects of hexane extract of *Morinda pubescens* leaves in human liver cancer cell line. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 5, 362-366, doi:10.1016/s1995-7645(12)60060-1 (2012).
14. Chandarana, K. et al. Diet and Gastrointestinal Bypass-Induced Weight Loss. The Roles of Ghrelin and Peptide YY. *Diabetes* 60, doi:10.2337/db10-0566/-/DC1 (2011).
15. Khedidja, B. Abderrahman, L. Selection of orlistat as a potential inhibitor for lipase from *Candida* species. *Bioinformation*. 7(3):125-9.(2011)
16. 비만시장: 파이프라인 및 산업전망. *BioINdustry* 12 (2010).

17. Dolenc A, Govedarica B, Dreu R, Kocbek P, Srcic S, Kristl J. Nanosized particles of orlistat with enhanced in vitro dissolution rate and lipase inhibition. *Int J Pharm.* 396(1-2):149-55. (2010)
18. Mølhøj, S. et al. Effect of the cannabinoid receptor-1 antagonist rimonabant on lipolysis in rats. *Eur J Pharmacol.* 646, 38-45 (2010).
19. Hadcock, J. et al. In vitro and in vivo pharmacology of CP-945,598, a potent and selective cannabinoid CB(1) receptor antagonist for the management of obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 394, 366-371, doi:10.1016 (2010).
20. Woo M, Bok S & Choi M. Hypolipidemic and body fat-lowering effects of Fatclean in rats fed a high-fat diet. *Food Chem Toxicol.* 47, 2076-2082 (2009).
21. Chan KW, Leung WS, Fung YS, Hung HF, Tsui P, Chu H, Chan YW, Ko GT, Yeung VT. The effects of diet and orlistat on body weight and lipid profiles in high risk Chinese patients with coronary artery disease, obesity and hypercholesterolemia. *Ir J Med Sci.* 178(2):173-8.(2009)
22. Arcari D. et al. Antiobesity effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity* 17, 2127-2133, doi:10.1038/oby.2009.158 (2009).
23. Kim S, Jung J, Kim H & Park T. Anti-obesity effects of *Juniperus chinensis* extract are associated with increased AMP-activated protein kinase expression and phosphorylation in the visceral adipose tissue of rats. *Biol Pharm Bull.* 31, 1415-1421 (2008).
24. NBJ supplement report 2008. *Nutritional Business Journal* (2008).
25. Kocełak P, Zahorska-Markiewicz B, Jonderko K, Olszanecka-Glinianowicz M, Zak-Gołab A, Holecki M, Kamińska M, Szymuszal M Long-term effects of lipase inhibition by orlistat on gastric emptying and orocecal transit time of a solid meal. *J Gastroenterol.* 43(8):609-17.(2008)
26. Mancini MC, Halpern A. Orlistatin the prevention of diabetes in the obese patient. *Vasc Health Risk Manag.* 4(2):325-36. (2008)
27. Xie L, O'Reilly C, Chapes S & Mora S. Adiponectin and leptin are secreted through distinct trafficking pathways in adipocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1782, 99-108, doi:10.1016 (2008).
28. Zhang J, Liu J, Li L & Xia W. Dietary chitosan improves hypercholesterolemia in rats fed high-fat diets. *Nutr Res.* 28, 383-390 (2008).
29. Pallasch CP, Schwamb J, Königs S, Schulz A, Debey S, Kofler D, Schultze JL, Hallek M, Ultsch A, Wendtner CM. Targeting lipid metabolism by the lipoprotein lipase inhibitor orlistat results in apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia.* 22(3):585-92. (2008)
30. Schäfer A et al. The cannabinoid receptor-1 antagonist rimonabant inhibits platelet activation and reduces pro-inflammatory chemokines and leukocytes in Zucker rats. *Br J Pharmacol.* 154, 1047-1054, doi:10.1038 (2008).

31. HSU CL. & YEN GC. Effects of Flavonoids and Phenolic Acids on the Inhibition of Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8404-8410 (2007).
32. Tsujit T, Takaichi H, Takaku T, Aoyama S & Hiraki J. Antiobesityaction of epsilon-polylysine, a potent inhibitor of pancreatic lipase. *Journal of lipid research* 47, 1852-1858, doi:10.1194/jlr.M600168-JLR200 (2006).
33. Gary-Bobo M. et al. The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant (SR141716) inhibits cell proliferation and increases markers of adipocyte maturation in cultured mouse 3T3 F442A preadipocytes. *Mol Pharmacol.* 69, 471-478 (2006).
34. Xie L. et al. Intracellular trafficking and secretion of adiponectin is dependent on GGA-coated vesicles. *J Biol Chem.* 281, 7253-7259 (2006).
35. Lee J. et al. Supplementation of whole persimmon leaf improves lipid profiles and suppresses body weight gain in rats fed high-fat diet. *Food Chem Toxicol.* 44, 1875-1883 (2006).
36. Kleiner D. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 41, 1313-1321 (2005).
37. Pertwee R. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci.* 76, 1307-1324 (2005).
38. Frank JW, Mellencamp MA, Carrol JA, Boyd RD, Allee GL. Acute feed intake and acute-phase protein responses following a lipopolysaccharide challenge in pigs from two dam lines. *Vet Immunol Immunopathol.* 15, 179-87 (2005)
39. Jbilo O. et al. The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotypethrough the regulation of lipolysis and energy balance. *FASEB J.* 19, 1567-1569 (2005).
40. Haslam D. & James W. Obesity. *Lancet.* 366, 1197-1209 (2005).
41. Kim S. et al. Hypolipidemic effects of crude extract of adlay seed (*Coix lachrymajobi* var. *mayuen*) in obesity rat fed high fat diet: relations of TNF-alpha and leptin mRNA expressions and serum lipid levels. *Life Sci.* 75, 1391-1404 (2004).
42. Collins S, Martin T, Surwit R. & Robidoux, J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav.* 81, 243-248 (2004).
43. Rossmeisl M, Rim JS, Koza RA & Kozak LP. Variation in Type 2 diabetes-Related Traits in Mouse Strains Susceptible to Diet-Induced Obesity. *Diabetes* 52 (2003).
44. Ravinet Trillou, C. et al. Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 284, R345-353 (2003).
45. Bensaid M. et al. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol.* 63, 908-914 (2003).
46. Rhee M, Nevo I, Avidor-Reiss T, Levy R & Vogel Z. Differential superactivation of adenylyl cyclase isozymes after chronic activation of the CB(1) cannabinoid receptor.

- Mol Pharmacol. 57, 746-752 (2000).
47. Calandra B. et al. Dual intracellular signaling pathways mediated by the human cannabinoid CB1 receptor. *Eur J Pharmacol.* 374, 445-455 (1999).
 48. Ross R. et al. Agonist-inverse agonist characterization at CB1 and CB2 cannabinoid receptors of L759633, L759656, and AM630. *Br J Pharmacol.* 126, 665-672 (1999).
 49. Parekh P, Petro A, Tiller J, Feinglos M & SurwitR. Reversal of diet-induced obesity and diabetes in C57BL/6J mice. *Metab.* 47, 1089-1096 (1998).
 50. Felder C. et al. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol.* 48, 443-450 (1995).
 51. JAX laboratories: JAX® Diet-induced Obesity (DIO) Models
<http://jaxservices.jax.org/dio>

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.