

# 특 허 법 원

## 제 1 부

## 판 결

사 건 2022허4796 등록무효(특)  
원 고 주식회사 A

대표이사 B

소송대리인 법무법인(유한) 화우

담당변호사 이민걸, 권동주, 김창권, 최정환

소송대리인 특허법인 에이아이피

담당변리사 이수완, 조진태, 이재웅, 윤종섭, 이성규, 김희경,

정현수

피 고 주식회사 C

대표이사 D

소송대리인 특허법인 공간

담당변리사 백경업

변 론 종 결 2023. 7. 11.

판 결 선 고 2023. 11. 23.

## 주 문

1. 원고의 청구를 기각한다.
2. 소송비용은 원고가 부담한다.

## 청 구 취 지

특허심판원이 2022. 8. 1. 2021당1647호 사건에 관하여 한 심결을 취소한다.

## 이 유

### 1. 기초사실

가. 피고의 이 사건 특허발명(갑 제2호증)

1) 발명의 명칭: 다물린 에이 및 다물린 비 함량이 증가된 신규 돌외추출물의 제조 방법 및 이를 이용한 대사질환 치료용 약학 조성물

2) 출원일 / 등록일 / 등록번호: 2009. 7. 17. / 2009. 12. 1. / 특허 제930580호

3) 청구범위

【청구항 1】 돌외잎 에탄올 추출물 농축액을 100~125℃, 1.2~690기압, 0.5~24시간 동안 또는 45~100℃, 690~1100기압, 12~24시간 동안 고온고압반응 처리하여, 돌외잎 추출물 농축액 건조분말의 다물린 A 함량이 0.7~7%(w/w), 다물린 B의 함량이 0.5~6% (w/w)로 증가된 돌외추출물의 제조방법(이하 '이 사건 제1항 발명'이라 하고, 나머지 청구항도 같은 방식으로 부른다).

【청구항 2】 돌외잎 에탄올 추출물 농축액을 100~125℃, 1.2~690기압, 0.5~24시간 동안 또는 45~100℃, 690~1100기압, 12~24시간 동안 고온고압반응 처리하여 제조되는

것으로서, 다물린 A는 0.7~7%(w/w)이고 다물린 B는 0.5~6%(w/w)를 유효성분으로 포함되는 것을 특징으로 하는 비만, 당뇨 또는 고지혈증의 개선 및 치료용 돌외추출물.

【청구항 3】 제2항의 돌외추출물을 포함하는 것을 특징으로 하는 비만, 당뇨 또는 고지혈증의 개선용 기능식품.

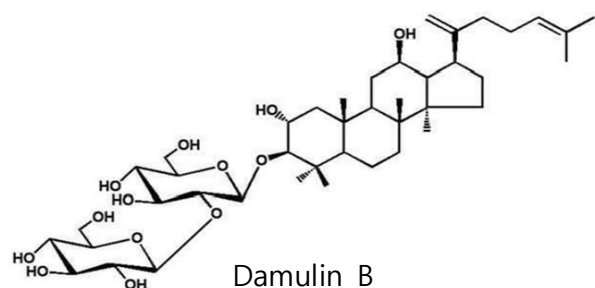
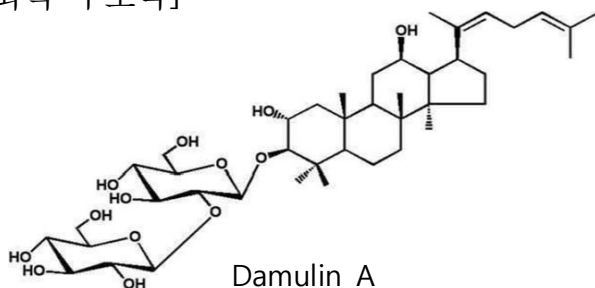
【청구항 4】 제3항에 있어서, 상기 기능식품은 온천수, 여과수, 증류수, 탄산수, 주스, 요구르트, 우유, 식용유의 매개질을 포함하는 것을 특징으로 하는 기능식품.

【청구항 5】 제2항의 돌외추출물을 포함하는 것을 특징으로 하는 비만, 당뇨 또는 고지혈증의 개선 및 치료용 약학 조성물.

【청구항 6】 제5항에 있어서, 상기 약학 조성물은 AMP-activated protein kinase (AMPK) 효소의 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 비만, 당뇨 또는 고지혈증의 개선 및 치료용 약학 조성물.

【청구항 7】 하기 화학 구조식의 다물린 A 또는 다물린 B의 화합물 중 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 비만, 당뇨 또는 고지혈증의 개선 및 치료용 약학 조성물.

[화학 구조식]



【청구항 8】 제7항에 있어서, 상기 약학 조성물은 AMP-activated protein kinase (AMPK) 효소의 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 비만, 당뇨 또는 고지혈증의 개선 및 치료용 약학 조성물.

4) 이 사건 특허발명의 주요 내용은 [별지 1]과 같다.

#### 나. 선행발명들

1) 선행발명 1은 2008. 1. 8. 공개특허공보 제10-2008-0003931호로 공개된 "인슐린 저항성 증후군 치료"에 관한 발명으로, 주요 내용은 [별지 2]의 1과 같다(갑 제4호증).

2) 선행발명 2는 2005년 11월 한국실험동물학회 학술발표대회 논문집에 실린 "비만 및 당뇨모델을 이용한 비만억제 및 항당뇨 기능성 신물질의 개발"이라는 국문 제목이 붙은 영문 발표 자료로, 주요 내용은 [별지 2]의 2와 같다(갑 제5호증).

3) 선행발명 3은 E 제품 홍보용 브로슈어로, 'E은 돌외추출물인 TG1022 성분이 AMPK를 활성화시켜 지방 합성을 억제하고 체지방을 연소하는 효과가 우수하며, 간임상시험에서 매주 240~300mg씩 7~24주간 복용 시 평균 허리둘레 감소 5.4~5.8cm, 평균 체중감소 3.3~2.1kg 효과를 보였다'고 기재하고 있다(갑 제6호증).<sup>1)</sup>

4) 선행발명 4는 1997. 1. 21. 공개되고 1999. 1. 29. 특허 제192678호로 등록된 "약효가 증강된 가공인삼 제품"에 관한 발명이다(갑 제7호증). 그 명세서에는 '고지혈증 개선 등 약효를 갖는 인삼, 즉 수삼이나 백삼, 미삼 또는 이들의 추출물을 일반 홍삼의 제조온도(98~100℃)보다 훨씬 높은 120~180℃에서 가열처리하면 인삼이나 홍삼에는 존재하지 않거나 단지 미량으로만 존재하던 성분들의 함량이 크게 증가할 뿐만 아니라 새로운 성분이 생성되어 약효가 크게 증가'함을 개시하고 있고(2-5쪽, 120℃에서 4시간 동안 가열하는 실험례가 있음), '진세노이드 Rg3, Rg5의 합이 Rb1, Rb2, Rc, Rd의 합

---

1) "미국특허출원 No. 11/380,472"(출원일이 2006. 4. 27.로 확인된다), "식약청 건강기능식품 개별인증 허가 신청 계획(2008년 11월)"이라는 기재 등에 비추어, 이 사건 특허발명 출원일 전에 공지된 자료라고 인정된다. 피고는 '위 브로슈어는 사내교육용 자료여서 공지된 자료에 해당하지 아니한다'고 주장하고, 갑 제6호증에 "사내교육용"이라는 기재가 있기는 하나, 소비자상담실 전화번호가 기재되어 있는 등 일반 소비자들에게 홍보·판매할 목적으로 제작된 자료를 사내교육에도 쓴 것이라고 보이는 점, 교육받은 직원들에게 그 내용에 관한 비밀준수의무가 있다고 볼 자료가 없는 점 등에 비추어, 선행발명으로 인정할 수 있다.

보다 큰 $[(Rg3+Rg5)/(Rb1+Rb2+Rc+Rd) \geq 1]$  가공인삼 제품이 얻어져 고혈압, 당뇨병 등 질환의 예방 또는 치료제로 사용될 수 있을 것'임을 시사하고 있다.

5) 선행발명 5는 2009년 2월 공개된 "돌외 사포닌 Gypenoside V로부터 인삼사포닌 C-K의 생산"이라는 제목의 경희대학교 대학원 한방재료가공학과 석사학위논문으로, 그 주요 내용은 [별지 2]의 3과 같다(갑 제8호증).

6) 선행발명 6은 2007. 11. 15. 공개특허공보 제10-2007-0109282호로 공개된 "담마란<sup>2)</sup>계 화합물을 유효성분으로 포함하는 신장 보호용 약학 조성물"에 관한 발명으로, 주요 내용은 [별지 2]의 4와 같다(갑 제25호증, 2008. 4. 30. 특허 제828192호로 등록).

#### 다. 분쟁 경과

1) 원고는 2013. 12. 10. 특허심판원에 피고를 상대로 이 사건 특허발명의 등록무효 심판을 청구하였으나, 특허심판원은 2014. 12. 30. 원고의 심판청구를 기각하는 심결을 하였다(2013당3241). 이에 불복하여 원고가 위 심결 취소를 구하는 소를 제기하였으나, 특허법원에서 2015. 9. 24. 원고의 청구가 기각되고(2015허741), 대법원에서 2018. 6. 15. 상고가 기각되어(2015후1874) 위 심결이 그대로 확정되었다.

2) 원고는 2013. 12. 10. 피고를 상대로 '돌외잎을 물에 침지(浸漬)한 후 에탄올을 용매로 이용하여 침지된 돌외잎을 두 차례에 걸쳐 추출하여 제조한, 가이페노사이드 등 여러 종류의 담마란계 사포닌과 다물린 A를 포함한 에탄올 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 개선용 식품'에 관하여 소극적 권리범위확인심판을, 피고는 2014. 4. 30. 원고를 상대로 '돌외잎 주정(에탄올) 추출물 농축액을 121℃에서 4시간 동안 고온고압 처리하여 제조된, 다물린 A 0.96~1.44중량%, 다물린 B 0.82~1.22중량%를 함유한 돌외

---

2) "dammarane"이 일부 선행발명에서 "다마란"으로 쓰여 있으나, 이하 "담마란"으로 통일하여 적는다.

있 주장 추출 분말로서 체지방 감소에 도움을 주는 비만 개선용 식품원료'에 관하여 적극적 권리범위확인심판을 각 청구하였고, 특허심판원은 2014. 12. 30. 원고 심판청구는 기각하고, 피고 심판청구는 인용하는 각 심결을 하였다(2013당3242, 2014당1010). 이에 불복하여 원고가 각 심결의 취소를 구하는 소를 제기하였고, 특허법원은 2015. 9. 24. 소극적 권리범위확인심판 사건 심결은 취소하고, 적극적 권리범위확인심판에 관한 원고의 청구는 기각하는 각 판결을 하였다(2015허758, 2015허765). 원고가 청구기각 판결에 대해 상고하였으나, 대법원에서 2018. 6. 15. 상고가 기각되었다(2015후1881).

3) 피고는 2014. 4. 16. '원고가 2013년경부터 2016년경까지 생산한 원고 제품[돌외 잎 주장 추출물 농축액을 121℃에서 4시간 동안 고온고압 처리하여 제조된, 다물린 A를 0.96~1.44중량%(1.2%의  $\pm 20\%$ ), 다물린 B를 0.82~1.22중량%(1.02%의  $\pm 20\%$ ) 함유하는 돌외잎 주장 추출 분말로서 체지방 감소에 도움을 주는 비만 개선용 식품원료]이 이 사건 제1항 발명에 관한 피고의 특허권을 침해하였다'고 주장하면서 원고 제품의 생산, 사용, 판매 등 금지를 구하는 가처분을 신청했고, 법원은 2015. 7. 2. 위 신청을 인용하는 가처분결정을 하였다(수원지방법원 안산지원 2014카합10025). 원고가 이의했으나 위 법원은 2015. 10. 13. 가처분결정을 인가하였고(2015카합10052), 원고가 다시 항고하였으나 서울고등법원에서 2016. 11. 4. 항고가 기각되었다(2015라20825).

4) 피고는 2015. 10. 16. 대구지방법원에 원고를 상대로 이 사건 제1항 발명에 관한 특허권 침해를 이유로 원고 제품 생산 금지 등과 손해배상을 구하는 소를 제기하였고, 위 법원은 2018. 8. 30. 피고의 금지청구 등을 인용하면서 원고에게 손해배상으로 4억 5,700여만 원 및 지연손해금 지급을 명하는 판결을 하였다(2015가합206601). 항소심인 특허법원은 2021. 7. 22. 피고의 금지청구 등을 인용하는 한편 원고에게 손해배상금

15억 원 및 지연손해금 지급을 명하는 판결을 하였고(2018나2070), 대법원은 2021. 12. 30. 손해배상채무에 대한 지연손해금률을 상법상 6%가 아니라 민법상 5%만 인정하는 것으로 자판하는 외에는 쌍방의 상고를 모두 기각하는 판결을 하였다(2021다264659).

5) 한편 원고는 위 4)의 소가 제기되자, 2015. 10. 30. 특허심판원에 피고를 상대로 '㉠ 돌외잎을 물에 침지하고 121℃에서 1~8시간 동안 1차 추출하고, ㉡ 1차 추출된 돌외잎을 80℃에서 50% 에탄올 용매로 1~8시간 동안 2차 추출하고, ㉢ 1, 2차 추출액을 농축(여과 및 원심분리)하는 방법으로 제조한, 여러 담마란계 사포닌 물질, 특히 다물린 A, 다물린 B가 각각 0.2~3중량% 범위인 돌외추출물을 유효성분으로 포함하는 비만개선용 식품(건조분말 형태)'에 관하여 소극적 권리범위확인심판을 청구했다. 특허심판원은 2019. 7. 12. 원고의 심판청구 중 이 사건 제1, 2항 발명에 관한 부분은 확인대상 발명 불특정을 이유로 각하하고, 이 사건 제7항 발명에 관한 부분은 기각하는 심결을 하였다(2015당5113). 원고는 위 심결의 취소를 구하는 소를 제기하였고, 특허법원은 2020. 6. 4. 확인대상발명이 특정되었다 하여 심결 중 이 사건 제1, 2항 발명에 관한 부분은 취소하고 원고의 나머지 청구는 기각하는 판결을 하였다(2019허5904). 원고가 위 청구기각 부분에 대해 상고하였으나, 대법원은 2020. 10. 15. 심리불속행 상고 기각 판결을 하였다(2020후10889). 특허심판원은 2021. 6. 2. 확인대상발명이 이 사건 제1항 발명의 권리범위에는 속하지 않고 이 사건 제2항 발명의 권리범위에는 속한다는 심결을 하였고, 그 심결은 그대로 확정되었다[2020당(취소판결)163].

6) 원고 사내이사였던 F는 2017. 4. 5. 주식회사 G(이하 'G'이라 한다)을 설립하였다. G는 2017. 8. 4. 특허심판원에 피고를 상대로 이 사건 특허발명의 등록무효심판을 청구했으나, 특허심판원은 2018. 8. 6. G의 심판청구를 기각하는 심결을 하였다(2017당

2462). 이에 불복하여 G이 위 심결 취소를 구하는 소를 제기하였으나, 특허법원에서 2019. 11. 22. G의 청구가 기각되고(2018허7668), 대법원이 2020. 3. 26. 심리불속행 상고 기각 판결을 하여(2019후12087) 위 심결이 그대로 확정되었다.

#### 라. 이 사건 심결 경위

원고는 2021. 5. 28. '이 사건 제2 내지 8항 발명은 신규성이 부정될 뿐만 아니라 기재가 명확하지 않고, 이 사건 제1 내지 8항 발명은 진보성이 부정된다'고 주장하면서 이 사건 특허발명에 대한 등록무효심판을 청구하였고, 특허심판원은 2022. 8. 1. 원고 심판청구를 기각하는 이 사건 심결을 하였다(2021당1647).

[인정근거] 다툼 없는 사실, 갑 제1 내지 8, 25, 50, 51, 52호증의 각 기재, 이 법원에 현저한 사실, 변론 전체 취지

## 2. 당사자 주장의 요지

#### 가. 원고

㉠ 이 사건 제2 내지 8항 발명은, 선행발명 1 또는 6에 의해 신규성이 부정되고, 선행발명 1, 선행발명 1, 2, 3의 결합, 선행발명 6, 선행발명 1과 6의 결합, 선행발명 1, 4, 5의 결합, 선행발명 1 내지 5의 결합에 의하여 진보성이 부정되며, 청구범위가 불명확하다. ㉡ 이 사건 제1항 발명도 선행발명 1, 4, 5의 결합, 선행발명 1 내지 5의 결합에 의하여 진보성이 부정된다. ㉢ 이 사건 제7, 8항 발명은 발명의 성립성이 부정되고, 약리효과가 명확히 기재되어 있지 않다. 이 사건 특허발명의 등록은 무효이므로, 이와 결론을 달리한 이 사건 심결은 위법하여 취소되어야 한다.

#### 나. 피고

이 사건 특허발명에 관하여 등록무효심판이 두 번 있었고, 그 심판청구를 기각하는



각 심결이 확정되었다[앞의 1.의 다. 1) 및 6)]. 원고는 동일한 사실과 증거에 의하여 다시 심판을 청구하였으므로 특허심판원은 특허법 제163조에 따라 이 사건 심판청구를 각하했어야 한다. 이 사건 특허발명에 원고 주장과 같은 등록무효 사유도 없다.

### 3. 이 사건 심결의 일사부재리 원칙 위반 여부

#### 가. 관련 법리

1) 특허 등록무효심판청구에 관하여 종전에 확정된 심결이 있더라도 종전 심판에서 청구원인이 된 무효사유 외에 다른 무효사유가 추가된 경우에는 새로운 심판청구는 그 자체로 동일사실에 의한 것이 아니어서 일사부재리 원칙에 위배되지 아니한다. 그러나 모순·저촉되는 복수의 심결이 발생하는 것을 방지하려는 일사부재리 제도의 취지를 고려하면, 위와 같은 경우에도 종전에 확정된 심결에서 판단이 이루어진 청구원인과 공통되는 부분에 대해서는 일사부재리 원칙의 관점에서 확정된 심결을 반복할 수 있을 정도로 유력한 증거가 새로이 제출되었는지를 따져 종전 심결에서와 다른 결론을 내릴 것인지를 판단하여야 한다(대법원 2017. 1. 19. 선고 2013후37 전원합의체 판결 참조).

2) 동일사실에 의한 동일한 심판청구에 대하여 전에 확정된 심결의 증거를 다르게 해석하는 등 종전 심결의 기본이 된 이유와 실질적으로 저촉되는 판단을 하는 것은 특허법 제163조가 정한 일사부재리 원칙의 취지에 비추어 허용되지 아니하나, 전에 확정된 심결의 증거를 그 심결에서 판단하지 않았던 사항에 관한 증거로 들어 판단하거나 그 증거의 선행기술을 확정된 심결의 결론을 반복할 만한 유력한 증거의 선행기술에 추가적, 보충적으로 결합하여 판단하는 경우 등과 같이 후행 심판청구에 대한 판단 내용이 확정된 심결의 기본이 된 이유와 실질적으로 저촉된다고 할 수 없는 경우에는, 확정된 심결과 결론이 결과적으로 달라졌다고 하더라도 일사부재리 원칙에 반한다고

할 수 없다(대법원 2013. 9. 13. 선고 2012후1057 판결 참조).

#### 나. 판단

갑 제36호증, 을 제8호증의 각 기재 및 변론 전체 취지에 의하면, 원고는 이 사건 심판청구를 하면서 종전 심판에서 주장하지 않은 '기재불비'를 무효사유로 추가했고, 전에는 선행발명 6을 이 사건 특허발명의 진보성을 다투는 증거로 제출했으나 이 사건에서는 그로써 신규성을 다투고 있으며, 전에 주장하지 아니하였던 새로운 선행발명 결합관계를 들어 진보성을 다투고 있다.

원고의 이 사건 일부 주장은 확정된 심결의 결론을 번복할 수 있을 정도라고 보기 어려우나, 위와 같이 이 사건에서 새로운 무효사유 주장이 추가된 점 등을 고려하여 이하에서는 이 사건 심결이 일사부재리 원칙에 위배되지 아니함을 전제로 판단한다.

### 4. 이 사건 제2 내지 8항 발명의 신규성 유무

#### 가. 관련 법리

1) 특허법 제2조 제3호에는 발명이 '물건의 발명', '방법의 발명', '물건을 생산하는 방법의 발명'으로 구분되어 있는바, 청구범위가 전체적으로 물건으로 기재되어 있으면서 제조방법 기재를 포함하고 있는 발명(이하 '제조방법이 기재된 물건발명'이라 한다)은 제조방법이 기재되어 있다 하더라도 발명의 대상은 제조방법이 아니라 최종적으로 얻어지는 물건 자체이므로 위와 같은 발명의 유형 중 '물건의 발명'에 해당한다. 물건발명에 관한 청구범위는 발명의 대상인 물건의 구성을 특정하는 방식으로 기재하여야 하므로, 물건발명의 청구범위에 기재된 제조방법은 최종 생산물인 물건의 구조나 성질 등을 특정하는 하나의 수단으로서 의미를 가질 뿐이다. 따라서 제조방법이 기재된 물건발명의 특허요건을 판단할 때는 그 기술적 구성을 제조방법 자체로 한정하여 파악할

것이 아니라 제조방법 기재를 포함하여 청구범위의 모든 기재로 특정되는 구조나 성질 등을 가지는 물건으로 파악해 출원 전에 공지된 선행기술과 비교하여 신규성, 진보성 등이 있는지 살펴야 한다(대법원 2015. 1. 22. 선고 2011후927 전원합의체 판결 참조).

2) 물건발명에서 동일한 발명이 그 출원 전에 공지되었거나 공연히 실시되었음이 인정되면 그 발명의 신규성은 부정된다. 특허발명에서 구성요소로 특정된 물건의 구성이나 속성이 선행발명에 명시적으로 개시되어 있지 않은 경우라도 선행발명에 개시된 물건이 특허발명과 동일한 구성이나 속성을 갖는다는 점이 인정되면, 이는 선행발명에 내재된 구성 또는 속성으로 볼 수 있다. 이와 같은 경우 특허발명이 해당 구성 또는 속성으로 인한 물질의 새로운 용도를 특허대상으로 한다는 등 특별한 사정이 없는 한 공지된 물건에 원래부터 존재하였던 내재된 구성 또는 속성을 발견한 것에 불과하므로 신규성이 부정된다. 이것은 그 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 사람(이하 '통상의 기술자'라 한다)이 출원 당시 그 구성이나 속성을 인식할 수 없었더라도 마찬가지이다. 공지된 물건의 내재된 구성 또는 속성을 파악하기 위하여 출원일 이후 공지된 자료를 증거로 사용할 수 있다.

한편 선행발명에 개시된 물건이 특허발명과 동일한 구성 또는 속성을 가질 수도 있다는 가능성이나 개연성만으로는 두 발명이 동일하다고 말할 수 없고, 필연적으로 그와 같은 구성 또는 속성을 가진다는 점이 증명되어야 한다. 즉, 선행발명이 공지된 물건 자체라면 그 물건과 특허발명의 구성을 대비하여 두 발명이 동일한지를 판단할 수 있으나, 선행발명이 특정한 제조방법으로 제작한 물건에 관한 공지된 문헌이라면, 선행발명에 개시된 물건은 그에 개시된 제조방법에 따라 제조한 물건이므로, 선행발명에 개시된 제조방법에 따랐을 경우 우연한 결과일 수도 있는 한 실시례가 위와 같은

구성 또는 속성을 가진다는 점을 넘어 그 결과물이 필연적으로 해당 구성 또는 속성을 가진다는 점이 증명되어야 선행발명과 특허발명이 동일하다고 할 수 있다(대법원 2021. 12. 30. 선고 2017후1304 판결 참조).

3) 특허법 제29조 제1항을 적용하기 위해 발명이 동일한지를 판단할 때는 두 발명의 기술적 구성이 동일한지에 따라 판단하되 효과도 참작하여야 한다. 기술적 구성에 차이가 있더라도 과제 해결을 위한 구체적 수단에 있어서 주지관용기술을 부가, 삭제, 변경하는 등으로 새로운 효과가 발생하지 않는 정도의 미세한 차이가 있는 것에 불과하다면 두 발명은 서로 동일하다(대법원 2004. 10. 15. 선고 2003후472 판결 참조).

#### 나. 이 사건 제2항 발명의 신규성

##### 1) 청구범위 해석

가) 이 사건 제2항 발명은 "돌외추출물", 즉 특허법 제2조 제3호 가목에서 말하는 '물건의 발명'으로서, "돌외잎 에탄올 추출물 농축액을 100~125℃, 1.2~690기압, 0.5~24시간 동안 또는 45~100℃, 690~1100기압, 12~24시간 동안 고온고압반응 처리"한다는 '제조방법'(이하 '구성요소 2-1'이라 한다), "다물린 A는 0.7~7%(w/w)이고 다물린 B는 0.5~6%(w/w)를 유효성분으로 포함"한다는 '조성'(이하 '구성요소 2-2'라 한다), "비만, 당뇨 또는 고지혈증 개선 및 치료용"이라는 '용도'(이하 '구성요소 2-3'라 한다)에 관한 기재를 포함하고 있다.

나) 구성요소 2-1은 이 사건 제2항 발명의 최종 생산물인 '돌외추출물'의 구조와 성질을 특징하는 요소라고 봄이 타당하다.

건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정(식품의약품안전처 고시 제2021-66호)에 따르면, "추출물"은 "동물, 식물, 미생물, 물(水) 등 기원의 원재

료로부터 용매를 사용하거나 물리적으로 추출한 물질"[제2조 제1항 제1호 나목 (1)], "지표성분"은 "원료 중에 함유되어 있는 화학적으로 규명된 성분 중에서 품질관리의 목적으로 정한 성분"을 말한다(같은 항 제3호).<sup>3)</sup> 또한 한약(생약)제제 등의 품목허가·신고에 관한 규정에 따르면, "유효성분"이란 "내재된 약리작용에 의하여 그 의약품의 효능·효과를 직접 또는 간접적으로 발현한다고 기대되는 물질 또는 물질군(약리학적 활성성분 등이 밝혀지지 아니한 생약 등을 포함한다)으로서 주성분"을 말한다(제2조 제1호).<sup>4)</sup> 그런데 생약이나 천연물 추출물에는 여러 성분이 포함되어 있어 함유된 화합물의 구조와 특성을 모두 규명하는 것이 가능하지 않은 경우가 많고, 각 성분과 활성 간의 상관관계가 명확하지 않은 경우도 많다.<sup>5)</sup> 이에 특정한 원재료 또는 제조방법으로 얻어낸 물질에만 특이적으로 '존재'하거나 그러한 물질에 특별히 많이 '함유'되어 있기 때문에 해당 물질을 다른 물질과 구별하는 기준이 될 수 있는 성분으로서 화학적으로 규명된 것을 '지표성분'으로 정하고,<sup>6)</sup> '기능'에 초점을 두어 의약품의 효능·효과를 직접·간접적으로 발현한다고 기대되는 주성분인 물질(군)을 '유효성분'이라고 부르는 것이다. 지표성분이 반드시 유효성분인 것은 아니며, 위에서 본 바와 같이 생약 등은 유효성분이 무엇인지가 명확하지 않을 때도 있다. 오히려 생약 등의 약효는, 거기에 함유

3) "지표성분"의 정의는 2009. 6. 29. 개정 식품의약품안전청 고시 제2009-39호에서도 같다.

4) 제정 당시부터 현재까지 같다.

5) 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원, 생약의 품질자료 작성 가이드라인, 2020(이하 '가이드라인'이라 한다), 6쪽. 여기서 "생약(herbal substances)"이란 "동·식물의 약용으로 하는 부분, 세포내용물, 분비물, 추출물 또는 광물"을 말하고, 가공되지 않은 건조 형태로 신선한 것을 사용하거나 공정서에 따른 포제품(炮製品)도 해당될 수 있다. "한약(생약)제제(herbal medicinal products)"는 한약(생약) 자체 또는 그 추출·분획물 등을 사용하여 제조한 의약품으로, 생약 및 한약(생약)제제와 그 원료 의약품을 포괄적으로 나타낸다. 가이드라인 19-20쪽.

6) 가이드라인 20쪽은 "지표성분(markers)"에 관하여, "생약, 생약 조제품 또는 한약(생약)제제의 품질관리 목적으로 사용되는 화학적으로 규명된 성분(군). 활성 지표성분(active marker)과 분석 지표성분(analytical marker)으로 구분할 수 있음"이라는 설명을 제시하고 있다. 즉, 그러한 지표성분 중 약리학적 활성을 나타내는 성분을 '활성 지표성분', 조성을 분석하기 쉬운 성분을 '분석 지표성분'이라 한다. 흔히 후박(厚朴, *Magnolia officinalis*)에 특유하게 함유된 마그놀롤(Magnolol)과 호노키올(Honokiol)을 지표성분의 예로 든다(마그놀롤, 호노키올의 화학식과 분자량은  $C_{18}H_{18}O_2$ , 266.34로 같다).

된 특정한 어느 한 가지 성분이나 공통된 약리활성을 갖는 몇 가지 성분들로부터 발현된다기보다는, 서로 다른 약리활성을 가질 수도 있는 전체 활성성분 간의 상가(相加), 상승(上乘), 상쇄(相殺) 등 상호작용의 총화에 의한 것이라고 해석함이 타당하다.<sup>7)</sup>

추출물은 제조방법에 따라 성분과 함량이 달라진다는 것이 이 사건 특허발명이 속한 기술분야의 상식인바, 구성요소 2-1에 열거된 온도, 압력, 반응시간을 달리하면 최종적으로 얻게 되는 돌외추출물도 미처 밝혀지지 않은 화합물까지 포함하여 구조와 성질이 달라질 수밖에 없다.

다) 구성요소 2-2도 이 사건 제2항 발명의 구성을 특정하는 요소이다. 다만, 앞서 본 바와 같은 추출물의 특성상 구성요소 2-1의 방법으로 제조한 돌외추출물의 성분이 다물린 A, B에 한정된다고는 말할 수 없다.<sup>8)</sup> 그렇다면 구성요소 2-2는, 구성요소 2-1의 방법에 따라 돌외추출물을 제조하면 그 추출물에 존재하는 여러 미지의 화합물도 고온고압반응 처리 전과 비교하여 구조와 성질 등이 달라질 것이지만, 그중에서 특히 다물린 A, B의 (증가된) 함량을 조성상 특징으로 집어낸 것이라고 봄이 타당하다.

라) 그러나 구성요소 2-3은 기존 돌외추출물(TG1022)도 가지고 있던 효능·효과에 관한 기재로(이 사건 특허발명 명세서 식별번호 [0026~0028]), 새로운 돌외추출물(TG1022F)에서 다물린 A, B 함량 증가로 인해 효능이 증강되었는지는 별론으로 하고 그러한 용도 한정으로 돌외추출물의 조성과 함량이 바뀌는 것은 아니다.

마) 따라서 이 사건 제2항 발명은 '구성요소 2-1의 제조방법과 구성요소 2-2의 조성으로 한정된 물건(돌외추출물)의 발명'이라고 보고 선행발명과 대비하여야 한다.

7) 대표저자 한대석, 생약학, 동명사, 1988, 4쪽; 생약학교재편찬위원회, 생약학, 동명사, 2006, 6쪽 등 참조.

8) 이 사건 특허발명 명세서 식별번호 [0019]는 다물린 A, B가 이 사건 제2항 발명의 '유효지표성분'이라는 취지로 쓰고 있다.

## 2) 선행발명 1과 대비

이 사건 제2항 발명과 선행발명 1의 구성요소를 대비하면 다음 표와 같다.

구성 요소	이 사건 제2항 발명	선행발명 1
2-1	돌외잎 에탄올 추출물 농축액을 100~125°C, 1.2~690기압, 0.5~24시간 동안 또는 45~100°C, 690~1100기압, 12~24시간 동안 고온고압 반응 처리하여 제조	(a) 마쇄된 돌외잎을 70% 에탄올 같은 수성 알코올에서 추출; (b) (a) 반복, 두 번째 수용성 알코올 추출물 용출액 회수하고 (a), (b)에서 획득한 두 알코올 추출물 합침; (c) 알코올 증발시킨 후 그 용액을 증류수와 혼합하고 여과; (d) 상기 용액을 1-부탄올, 물층과 혼합 후 1-부탄올 증발; (e) 건조하여 회수된 용출액의 액상 부분 감소시켜 유기성 물질 회수, 돌외추출물 분말 형태 제조; (f) 필요에 따라 추가 분리 및 정제 단계 포함(식별번호 [0094~0103] <sup>9)</sup> )
2-2	다물린 A는 0.7~7%(w/w), 다물린 B는 0.5~6%(w/w)를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 (비만 등 개선 및 치료용) 돌외추출물	[0012] 돌외잎 추출물의 주요 구성성분은 가이페노사이드 [0042] 본 발명 치료용 조성물의 가이페노사이드 함량은 약 0.5~10중량% [0001, 0022, 0023, 0094~0096] (인슐린 저항성 증후군, 비만, 고지혈증을 치료할 수 있는) 돌외추출물

### 가) 차이점 분석

(1) 이 사건 제2항 발명의 구성요소 2-1에서 "돌외잎 에탄올 추출물 농축액"을 얻는 방법이 한정되어 있지는 않으나, 이 사건 특허발명 명세서에는 에탄올 수용액으로 두 번 추출하여 합친 뒤 여과, 분리, 농축한 돌외추출물 농축액 "TG1022"를 들고 있고 (식별번호 [0015]), 구성요소 2-1은 그 농축액의 고온고압반응 처리 조건을 특정하고 있다. 선행발명 1의 대응되는 구성요소는 5~6단계로 구분한 돌외추출물 제조방법인데, 이 사건 제2항 발명에는 없는 1-부탄올 분획공정이 (d) 단계에 포함되어 있지만,<sup>10)</sup> 그 농축액의 고온고압반응 처리는 포함하고 있지 않다(이하 '차이점 1'이라 한다).

9) 이하 이 판결의 각 구성요소 대비표에서 대괄호 안에 적은 숫자는 해당 발명의 명세서 식별번호를 뜻한다.

10) 선행발명 1을 출원한 피고는 2023. 4. 6. 첫 변론기일에서 (d) 단계가 부탄올 분획법에 해당한다고 진술하였다.

(2) 이 사건 제2항 발명의 구성요소 2-2는 앞에서 본 바와 같이 다물린 A, B의 (증가된) 함량을 대표적 특징으로 내세우고 있다. 그러나 선행발명 1은 '돌외잎 추출물의 주요 구성성분은 가이페노사이드'라고만 하여 성분군(成分群)을 언급했을 뿐(명세서 식별번호 [0012]), 개별 성분인 다물린 A, B에 관하여 언급하지 않고 함량을 기재하고 있지도 않다는 점에서 이 사건 제2항 발명과는 차이가 있다(이하 '차이점 2'라 한다).<sup>11)</sup>

#### 나) 차이점 검토

원고는 구성요소 2-1이 이 사건 제2항 발명의 구조나 성질을 특징하는 요소가 아님을 전제로, '구성요소 2-2는 선행발명 1에 내재된 구성 또는 속성에 해당하므로 이 사건 제2항 발명과 선행발명 1은 실질적으로 동일하다'는 취지로 주장한다. 그러나 구성요소 2-1이 이 사건 제2항 발명의 기술적 구성을 특징하는 요소임은 앞에서 본 바와 같다. 나아가 차이점 1이 새로운 효과가 발생하지 않는 정도의 미세한 차이에 불과한지를 보려면, 이 사건 제2항 발명과 선행발명 1의 각 방법에 따라 제조한 추출물이 필연적으로 같은 구성이나 속성을 갖는지, 차이점 2를 따져보아야 한다. 따라서 차이점 1과 차이점 2는 함께 검토하는 것이 타당하다.

앞서 인정한 사실, 앞서 든 증거, 갑 제11, 12, 13, 17, 19, 21, 53호증, 을 제2호증 각 기재 및 변론 전체 취지를 종합하여 알 수 있는 다음 사정에 비추어 보면, 원고가 제출한 증거만으로는 '선행발명 1의 방법에 따라 제조한 돌외추출물이 제조방법상 차이점 1에도 불구하고 이 사건 제2항 발명과 같은 조성을 가지고 있어 차이점 2가 그 추출물에 필연적으로 내재된 구성 또는 속성에 해당한다'는 점을 인정할 수 없다.

11) 성분군(成分群)은 유사한 구조와 특성을 가진 여러 화합물의 집합을 나타낸다. 가이페노사이드, 진세노사이드가 성분군을 가리키는 이름이라면, 가이페노사이드 X, 진세노사이드 Rk3 등은 개별 화합물을 가리킨다(선행발명 5 table 1, 선행발명 6 [식별번호 0016] 등 참조).



(1) 이 사건 특허발명의 실시례 1은 돌외잎 에탄올 추출물을 고온고압반응 처리 없이 아세톤, n-헥산, 에틸아세테이트, n-부탄올로 수차례 분획만 하여 다물린 A 14mg, 다물린 B 10mg을 얻었는바(명세서 식별번호 [0030~0035]), 돌외잎 추출물을 부탄올로 분획하는 선행발명 1에도 다물린 A, B가 함유되어 있을 것이라고 인정할 수는 있다. 단순 돌외추출물에 다물린 A, B가 함유되었음은 이 사건 특허발명 명세서의 기존 돌외 추출물(TG1022) 관련 내용, 갑 제11, 12(19), 13호증([별지 3] 참조)으로도 확인된다.

(2) 그런데 이 사건 특허발명 명세서에는 '단순 돌외추출물(TG1022)은 다물린 A, B 함량이 유효효과를 나타낼 정도로 높지 않은 편이었고, 다물린 A, B 함량을 증가시킨 신규 돌외추출물(TG1022F)은 강력한 AMPK 활성화 능력을 가짐이 확인되었다.'라는 기재가 있고(식별번호 [0055]), TG1022의 다물린 A, 다물린 B 함량은 각각  $0.37 \pm 0.03\%(w/w)$ ,  $0.28 \pm 0.02\%(w/w)$ 로 이 사건 제2항 발명 구성요소 2-2의  $0.7 \sim 7\%(w/w)$ ,  $0.5 \sim 6\%(w/w)$ 와는 상당한 차이가 있다(식별번호 [0058, 0059]). 위 식별번호 [0059]의 표 2에 따르면 온도가 더 높거나 압력이 높아지고 처리시간이 길어질수록 다물린 A, B의 함량이 증가한다는 사실도 확인된다. 갑 제12(19)호증을 보아도, 열처리하지 않은 돌외추출물의 다물린 A, 다물린 B 함량은 각각  $213 \pm 3.6 \mu g/g$ ,  $34.1 \pm 2.3 \mu g/g$ , 환산하여  $0.0213 \pm 0.00036\%(w/w)$ ,  $0.00341 \pm 0.00023\%(w/w)$ 로, 구성요소 2-2의 범위에는 많이 못 미친다. 선행발명 1도 이 사건 제2항 발명과 같은 고온고압반응 처리를 하지 않는 한, 다물린 A, B 함량이 이 사건 제2항 발명과는 차이가 날 것이라고 생각할 수 있다.

(3) 선행발명 5에도 '돌외에서 사포닌을 분리하여 가이페노사이드라 명명한 것을 계기로 지금까지 약 100여 종의 사포닌이 분리된 것으로 보고되었다'는 내용은 있으나 그동안 분리된 사포닌을 열거한 Table 1.에는 다물린 A, B가 없고, 해당 내용의 원래

출처인 을 제2호증<sup>12)</sup>에서도 '물과 부탄올 1:1 분획' 등 방법으로 가이페노사이드를 분리했지만 다물린 A, B가 동정(同定)되지 않았음이 확인된다. 이처럼 이 사건 특허발명 출원일 전에 다물린 A, B가 보고되지 않았던 것은 그것이 단순 돌외추출물에는 미량만 함유되어 있어서 규명이 쉽지 않았기 때문이었다고 보이고, 증가된 함량의 다물린 A, B를 얻는 방법도 인식되지 않고 있었다고 보인다.

(4) 선행발명 1이 일의적으로 명확하게 정의된 제조방법이라고 보기도 어렵다. 추출물에는 여러 화합물이 혼합되어 있어 개별 성분의 구조와 활성을 규명하는 것이 쉽지 않고, 원재료를 채취하는 시기(계절, 년생), 장소(원산지), 부위 등 채취방법, 수확 후 건조방법(온도, 시간), 추출용매의 종류, 농도, 부피, 추출하는 온도, 시간, 횟수 등 추출방법에 따라 추출물의 성분과 함량이 달라질 수 있다.<sup>13)</sup> 돌외도 부위, 생육환경, 수확시기 등에 따라 사포닌 성분 구성이 현저히 달라진다는 것이 알려져 있다.<sup>14)</sup> 그런데 선행발명 1은 "하나의 구현례"로서 (a)~(f) 단계를 "포함하는" 제조방법을 넓게 예시하고 있고, 에탄올의 용량, 추출하는 시간, 온도 등을 한정하고 있지 않다. (f) 단계에서는 "필요에 따라" 분리 및 정제 단계를 추가할 수도 있다. 위와 같은 조건을 어떻게 설정하고 단계를 추가하는지 등에 따라 추출물의 조성은 얼마든지 달라질 수 있다.

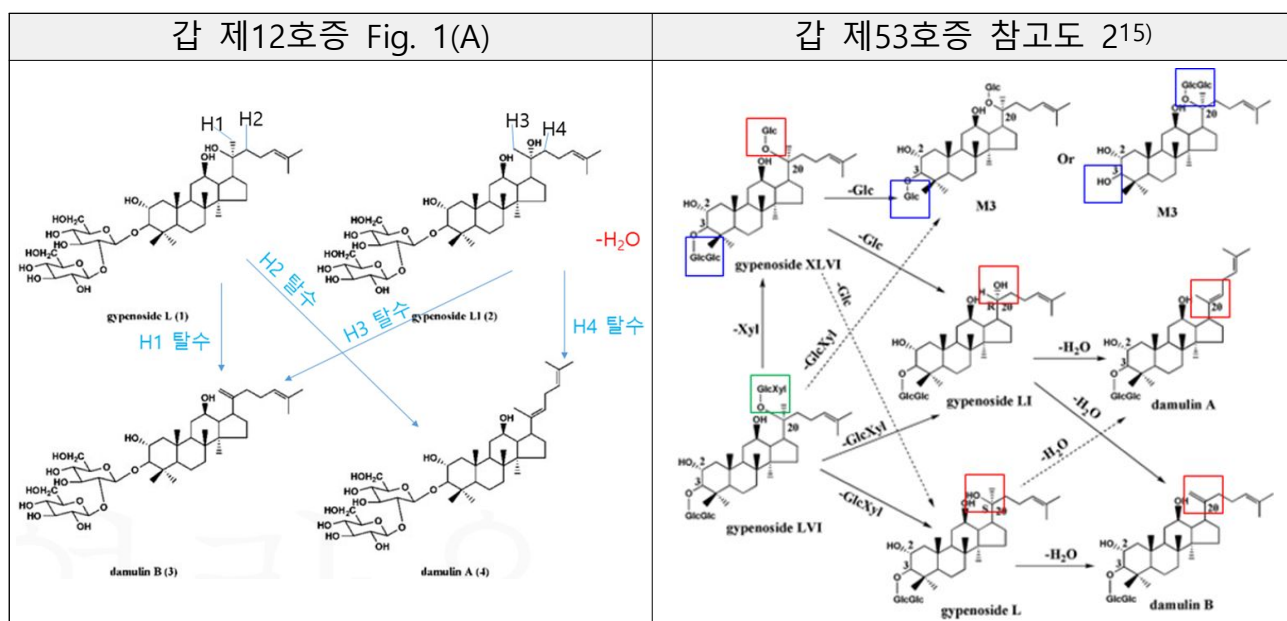
(5) 이 사건 제2항 발명에서 고온고압반응 처리를 했을 때 다물린 A, B 함량이 증가하는 것은 가이페노사이드 화합물의 배당체(配糖體, 글리코사이드) 중 한 위치에서 당 성분이 분리되어(탈당반응) 히드록시기로 전환되고 히드록시기가 다시 바로 옆의 탄소에 결합된 수소 원자와 반응하여 물로 제거됨을 통하여(탈수반응) 다물린 A, B로

12) Valentina Razmovski-Naumovski et al., "Chemistry and Pharmacology of *Gynostemma pentaphyllum*", *Phytochemistry Reviews*, 4, 2005, 198-199쪽. 선행발명 5(갑 제8호증)에서 "Valentian"은 오기임이 명백하다.

13) 식품의약품안전청, 건강기능식품 개발자를 위한 기능성 원료 표준화 지침서, 2008, 30쪽 참조.

14) 을 제2호증 200쪽; 선행발명 5(갑 제8호증) 3쪽 등 참조.

바뀌는 과정에 기초하고 있다(아래 그림 참조). 그러나 고온고압반응 처리로 탈당 및 탈수반응이 일어났을 때 추출물 내의 화합물이 모두 다몰린 A, B로만 변환된다고 볼 수는 없고 여러 미지의 화합물들도 변화를 겪을 수밖에 없다. 그 점에서도 선행발명 1, 이 사건 제2항 발명의 각 방법으로 얻은 추출물들이 같은 구성 또는 속성을 가진다고 단정할 수 없다(일부 성분, 예컨대 유효성분인 다몰린 A, B의 함량 범위가 같다 하더라도 추출물의 전체 조성은 다르다고 보아야 한다).



(6) 이에 대하여 원고는, '피고가 선행발명 1 명세서 시험데이터 일부가 이 사건 제2항 발명 추출물(TG1022F)을 이용한 것임을 자인하였을 뿐만 아니라, 원고가 재현한 단순 돌외추출물(갑 제17호증)에도 구성요소 2-2 범위에 드는 다몰린 A, B가 함유되어 있음이 증명되었으므로, 이 사건 제2항 발명은 선행발명 1에 내재된 구성 또는 속성을 발견한 것에 불과하다'고 주장한다. 그러나 선행발명 1 명세서는 이 사건 제2항 발명과 같은 고온고압반응 처리에 관하여 전혀 언급하고 있지 않고, 통상적인 에탄올 추출물

15) Dao-Jin Chen et al., "Metabolic profiling of *Gynostemma pentaphyllum* extract in rat serum, urine and faeces after oral administration", *Journal of Chromatography B*, 969, 2014, 43쪽의 그림이다.

과 부탄올 분획공정을 제시하고 있을 뿐이다. 통상의 기술자가 선행발명 1을 참고하고 일부 창작능력을 발휘하여 제조한 추출물이 구성요소 2-2 범위의 다물린 A, B 함량을 갖는 경우가 있다고 하더라도, '선행발명 1의 한 실시례에서 우연히 지표가 되는 유효 성분인 다물린 A, B가 위 범위에서 함유된 결과가 나타났다'는 것을 의미할 뿐, '선행 발명 1의 제조방법에 따른 추출물이 이 사건 제2항 발명의 추출물과 필연적으로 같은 구성 또는 속성을 가진다'는 점이 증명되었다고 볼 수는 없다.

#### 다) 소결

이 사건 제2항 발명은 선행발명 1과 실질적으로 동일하지 않으므로, 선행발명 1에 의하여 신규성이 부정되지 아니한다.

#### 3) 선행발명 6과 대비

이 사건 제2항 발명과 선행발명 6의 구성요소를 대비하면 다음 표와 같다.

구성 요소	이 사건 제2항 발명	선행발명 6
2-1	돌외잎 에탄올 추출물 농축액을 100~125℃, 1.2~690기압, 0.5~24시간 동안 또는 45~100℃, 690~1100기압, 12~24시간 동안 고온고압 반응 처리하여 제조	[0033] 담마란 화합물을 함유한 인삼속 식물 또는 돌외를 50~200℃(바람직하게는 120℃)에서 30분~10시간(바람직하게는 3시간) 가열, 가공한 후 저급알코올이나 그 혼합물로 이루어진 균에서 선택되는 용매(바람직하게는 CH <sub>3</sub> OH)를 넣고 환류 추출하여 여과하는 조작을 1회 이상(바람직하게는 3회) 실시하고 여액을 합해 감압농축하여 CH <sub>3</sub> OH 추출물 얻고, 그 추출물에서 감압하에서 용매를 건조시키고 잔사를 물에 현탁시켜 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 과 수포화 n-BuOH을 차례로 사용해 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 분획, n-BuOH 분획, H <sub>2</sub> O 분획으로 나누며, 각 분획을 감압하에서 증발 건조하여 추출물 얻음
2-2	다물린 A는 0.7~7%(w/w), 다물린 B는 0.5~6%(w/w)를 유효성분으로 포함하는 것	[0009] 담마란 화합물에서 가열과정 중 글리코실 잔기의 이탈로 Rg2, Rg3, Rh2, Rh1 등이 생성되며 이어서 20번 위치에서 탈수반응 일어나 Rg5, Rk1, Rh3, F4, Rh4 생성

	을 특징으로 하는 (비만 등 개선 및 치료용) 돌외추출물	[0016] 진세노사이드 Rk3, Rh4, PD, PT, PPD, PPT, DHPPD- I, DHPPD-II, DHPPT- I, 또는 DHPPT-II를 유효 성분으로 포함하는 (신장질환 예방 및 치료용) 약학 조성물
--	---------------------------------	--

#### 가) 차이점 분석

이 사건 제2항 발명의 구성요소 2-1은 돌외잎의 "에탄올 추출물 농축액"을 고온 고압반응 처리하는 구성인 반면, 선행발명 6에서는 추출 전의 인삼속 식물 또는 돌외 자체를 "가열, 가공한 후" 여과, 농축, 분획 등 과정을 진행한다. 위와 같은 열처리가 압력을 가하지 않은 환경에서 수행된다는 점에서도 다르다(이하 '차이점 3'이라 한다).

이 사건 제2항 발명의 구성요소 2-2는 다물린 A, B의 각 함량을 특징으로 들고 있는 반면, 선행발명 6에서는 진세노사이드 Rk3, Rh4, PD, PT, PPD, PPT, DHPPD- I, DHPPD-II, DHPPT- I, DHPPT-II가 유효성분으로 제시되어 있다(이하 '차이점 4'라 한다).

#### 나) 차이점 검토

원고는 '차이점 3, 4에도 불구하고 이 사건 제2항 발명이 선행발명 6과 실질적으로 동일하다'는 취지로 주장한다.

앞서와 마찬가지로 차이점 3, 4를 함께 검토하건대, 앞서 인정한 사실, 앞서 든 증거 및 변론 전체 취지를 종합하여 알 수 있는 다음 사정에 비추어 보면, 이 사건 제2항 발명은 선행발명 6과 실질적으로 동일하다고 볼 수 없다.

(1) 추출물은 재료 선택과 제조방법 등에 따라 성분과 함량이 달라질 수 있는바, 이 사건 제2항 발명과 선행발명 6의 각 추출물들은 제조방법상의 차이점 3으로 인해 필연적으로 같은 구성 또는 속성을 가진다고 단정할 수는 없다.

(2) 게다가 두 발명은 서로 다른 성분을 유효성분으로 제시하고 있다.

(3) 선행발명 6에서 '담마란 화합물의 가열로 글리코실 잔기가 이탈하고 이어서 탈수반응이 일어난다'는 부분이 이 사건 제2항 발명의 탈당 및 탈수반응과 실질적으로 동일한 과정을 표현한 것이라 하더라도, 두 발명에 따른 각 추출물의 조성이 같다고 볼 수 없는 이상, 그 가열과정에는 각 추출물에 함유된 여러 미지의 화합물들도 함께 변화를 겪을 수밖에 없다.

#### 다) 소결

이 사건 제2항 발명은 선행발명 6에 의하여 신규성이 부정되지 아니한다.

#### 다. 이 사건 제3 내지 6항 발명의 신규성

이 사건 제3 내지 6항 발명은 이 사건 제2항 발명의 돌외추출물을 포함하는 치료용 약학 조성물 또는 기능식품에 관한 발명으로서, 이 사건 제2항 발명의 신규성이 부정되지 않는 이상, 이 사건 제3 내지 제6항 발명의 신규성도 부정되지 아니한다.

#### 라. 이 사건 제7, 8항 발명의 신규성

##### 1) 관련 법리

의약용도발명에서는 특정 물질과 그것이 갖고 있는 의약용도가 발명을 구성하는 것이고, 약리기전은 특정 물질에 불가분적으로 내재된 속성으로서 특정 물질과 의약용도와의 결합을 도출해 내는 계기에 불과하다. 따라서 의약용도발명의 청구범위에 기재되어 있는 약리기전은 특정 물질이 갖고 있는 의약용도를 특정하는 한도에서만 발명의 구성요소로서 의미를 가질 뿐 약리기전 그 자체가 청구범위를 한정하는 구성요소라고 보아서는 아니 된다(대법원 2014. 5. 16. 선고 2012후3664 판결 참조).

##### 2) 이 사건 제7항 발명과 이 사건 제8항 발명의 관계

원고는 '이 사건 제7, 8항 발명의 신규성이 선행발명 1 또는 선행발명 6에 의해

부정된다'고 주장하는바, 이 사건 제7, 8항 발명의 기술적 구성을 보면, 이 사건 제7항 발명은 다물린 A 또는 다물린 B 중 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 비만, 당뇨, 고지혈증 개선 및 치료용 약학 조성물이고, 이 사건 제8항 발명은 이 사건 제7항 발명을 인용하면서 그 약리기전을 AMPK 효소 활성화 증가로 한정하는 형식을 취하고 있다. 그런데 위 약리기전은 이 사건 제7항 발명의 특정 물질에 불가분적으로 내재된 속성에 불과하므로, 청구범위를 한정하는 구성요소라고 볼 수 없다.

그렇다면 이 사건 제7항 발명과 이 사건 제8항 발명은 실질적으로 같은 의약용도 발명에 해당하고, 이 사건 제7항 발명의 신규성이 부정되지 않는다면 이 사건 제8항 발명의 신규성도 부정되지 아니한다.

### 3) 구성요소 대비

이 사건 제7항 발명과 선행발명 1, 6의 구성요소를 대비하면 다음 표와 같다.

구성요소	이 사건 제7항 발명	선행발명들
7-1	다물린 A 또는 다물린 B의 화합물 중 하나 이상을 유효성분으로 함유	(선행발명 1) 돌외잎 추출물 (선행발명 6) [0016] 인삼속 식물 또는 돌외의 추출물에서 얻은 진세노사이드 성분 10종
7-2	비만, 당뇨 또는 고지혈증의 개선 및 치료용 약학 조성물	(선행발명 1) [0001] 인슐린 저항성 증후군, 비만, 고지혈증 개선 및 치료용 조성물 (선행발명 6) [0015] 신장 보호용 약학 조성물, [0011] 담마란 화합물의 항산화작용, 항암작용, 혈액순환 개선작용

### 4) 구성요소 7-1

이 사건 제7항 발명의 구성요소 7-1은 의약용도발명의 유효성분을 "다물린 A 또는 다물린 B의 화합물 중 하나 이상"으로 한정하고 있는 반면, 선행발명 1과 선행발명 6은 다물린 A, B를 유효성분으로 제시하고 있지 않다(이하 '차이점 5'라 한다).

앞서 인정한 사실, 앞서 든 증거 및 변론 전체 취지를 종합하여 알 수 있는 다음 사정에 비추어 보면, 이 사건 제7항 발명은 선행발명 1 또는 선행발명 6과 실질적으로 동일하다고 볼 수 없다.

가) 추출물에는 여러 화합물이 혼합되어 있어 그에 함유된 개별 화합물의 구조와 특성을 모두 밝혀내기가 어렵다. 그러한 기술적 어려움 때문에 자연에 존재하는 여러 혼합물에서 개별 화합물을 분리하고 화학적 구조를 규명하는 천연물화학이 필요한 것이다. 추출물은 종종 통합적인 성분군으로 취급되며, 제품의 표준화, 규격화 및 안전성 보장을 위해 지표성분 같은 개념을 정의한다. 추출물은 채취방법, 수확 후 건조방법, 추출방법 등에 따라 성분과 함량이 달라질 수 있는바, 어떤 화합물을 분리해 낸 기원 식물의 추출물들이 개시되어 있다고 하여 그 유효성분이 모두 실질적으로 동일하다고 말할 수는 없다.

나) 선진특허분류(CPC), 국제특허분류(IPC)상으로도 특정한 유기화합물을 함유하는 의약품, 의약품도발명은 "A61K 31"(유기활성성분을 함유하는 의약품 제제)로 분류되고, 식물 등에서 유래하여 조성이 정확히 알려지지 않은 추출물을 함유하는 의약품 등은 "A61K 36"(조류, 이끼류, 균류, 식물 또는 그 유도체로부터의 물질을 함유하는 미지 구조의 의약품 제제, 예컨대 전통 한약재)으로 분류한다.<sup>16)</sup>

다) 이 사건 제7항 발명은 다물린 A와 다물린 B 각각의 화학 구조식을 제시하고 있는 반면, 선행발명 1과 선행발명 6은 다물린 A, B의 존재를 인식하고 있지도 않다. 선행발명 6은 가이페노사이드가 아니라 진세노사이드 10종을 유효성분으로 특정하여 화학 구조식을 제시하고 있을 뿐이다.

---

16) 예컨대, 선행발명 1에는 A61K 31(세분류는 필요한 범위에서만 기재한다, 이하 같다), A61P 외에도 "A61K 36/424"(돌외속) 코드가 부여되었지만, 선행발명 6에는 A61K 36 코드가 부여되지 않았다.



## 5) 소결

이 사건 제7항 발명은 차이점 5로 인하여 선행발명 1 또는 선행발명 6과 실질적으로 동일하다고 볼 수 없으므로, 구성요소 7-2가 위 선행발명들의 일부 구성요소와 겹친다 하더라도 신규성이 부정되지 아니한다. 또한 이 사건 제7항 발명의 신규성이 부정되지 않는 이상 이 사건 제8항 발명의 신규성도 부정되지 아니한다.

### 마. 소결론

이 사건 특허발명은 신규성이 없다는 원고의 주장은 모두 이유 없다.

## 5. 이 사건 제1 내지 8항 발명의 진보성 유무

### 가. 관련 법리

발명의 진보성을 판단할 때는, 선행기술의 범위와 내용, 진보성 판단 대상 발명과 선행기술의 차이, 통상의 기술자가 가진 기술수준을 기록에 나타난 자료로 파악한 뒤, 이를 기초로 통상의 기술자가 특허출원 당시 기술수준에 비추어 진보성 판단 대상이 된 발명이 선행기술과 차이가 있음에도 그 차이를 극복하고 선행기술로부터 그 발명을 쉽게 할 수 있는지를 살펴보아야 한다. 이때 진보성 판단 대상 발명의 명세서에 개시되어 있는 기술을 알고 있음을 전제로 사후적으로 통상의 기술자가 그 발명을 쉽게 할 수 있는지 판단하여서는 아니 된다(대법원 2016. 11. 25. 선고 2014후2184 판결 참조).

### 나. 이 사건 제1항 발명의 진보성

#### 1) 구성요소 대비

원고는 '이 사건 제1항 발명은 선행발명 1, 4, 5의 결합 또는 선행발명 1 내지 5의 결합에 의하여 진보성이 부정된다'고 주장하는바, 이 사건 제1항 발명과 선행발명 1의 구성요소를 대비하면 다음 표와 같다.

구성 요소	이 사건 제1항 발명	선행발명 1
1-1	돌외잎 에탄올 추출물 농축액을 100~125°C, 1.2~690기압, 0.5~24시간 동안 또는 45~100°C, 690~1100기압, 12~24시간 동안 고온고압 반응 처리하여	[0094~0103] (a) 마쇄된 돌외잎을 70% 에탄올 같은 수성 알코올에서 추출; (b) (a) 반복, 두 번째 수용성 알코올 추출물 용출액 회수하고 (a), (b)에서 획득한 알코올 추출물 합침; (c) 알코올을 증발시킨 후 증류수와 혼합하고 여과; (d) 상기 용액을 1-부탄올, 물층과 혼합 후 1-부탄올 증발; (e) 건조하여 회수된 용출액의 액상 부분 감소시켜 유기성 물질 회수, 돌외추출물 분말 형태 제조; (f) 필요에 따라 추가 분리 및 정제 단계 포함
1-2	돌외잎 추출물 농축액 건조 분말의 다물린 A 함량이 0.7~7%(w/w), 다물린 B 함량이 0.5~6%(w/w)로 증가된 돌외 추출물 제조방법	[0012] 돌외잎 추출물의 주요 구성성분은 가이페노사이드 [0042] 가이페노사이드 함량은 약 0.5~10중량%

## 2) 차이점 분석

이 사건 제1항 발명은, 이 사건 제2항 발명에 관하여 본 것과 마찬가지로 고온 고압반응 처리 유무(차이점 1), 다물린 A, B 성분과 함량의 특정 여부(차이점 2)에서 선행발명 1과 차이가 있다.<sup>17)</sup>

## 3) 차이점 검토

앞서 인정한 사실, 앞서 든 증거 및 변론 전체 취지를 종합하여 알 수 있는 다음 사정에 비추어 보면, 통상의 기술자가 선행발명 1, 4, 5를 결합하거나 선행발명 1 내지 5를 결합하더라도 차이점 1, 2를 쉽게 극복할 수 있다고 보기 어려우므로, 이 사건 제1항 발명은 위 결합들에 의하여 진보성이 부정되지 아니한다.

가) 선행발명 1은 돌외잎을 에탄올로 추출한 뒤 그 농축액을 고온고압반응 처리할

17) 이 사건 제1항 발명과 이 사건 제2항 발명은 청구항이 다르지만 선행발명 1과는 같은 면에서 차이가 나므로, 이 사건 제2항 발명에서처럼 '차이점 1', '차이점 2'라 한다.

동기를 암시 또는 제시하고 있지 않다. 또한 돌외추출물의 유효성분을 가이페노사이드라고만 기재하였을 뿐, 다물린 A, B를 유효성분으로 인식하고 있지 않다.

나) 선행발명 4는 인삼에 진세노사이드 Rg3, Rg5가 함유되어 있다는 점이 공지된 상태에서 열처리로 그 함량을 증가시킨 발명이다. 그러나 재료가 돌외가 아니고 가이페노사이드인 다물린 A, B를 유효성분으로 인식하고 있지도 않다는 점에서, 다물린 A, B 함량 증가를 위해 선행발명 1에 선행발명 4를 결합할 동기가 있다고 보기 어렵다.

다) 선행발명 5는 돌외 사포닌을 효소 처리하여 부가가치가 높은 인삼 사포닌으로 변환하는 방법에 관한 연구로, 이 사건 제1항 발명과는 목적이 다르다. 당시까지 보고된 100여 종의 돌외 사포닌을 열거했다는 Table 1.에도 다물린 A, B는 기재되어 있지 않다. 선행발명 5가 통상적 처리방법으로 예시하고 있는 열처리를 통해 돌외 사포닌을 다른 사포닌으로 변환한다는 측면에서 보더라도, 그렇게 변환된 사포닌을 다물린 A, B라고 인식할 근거가 없다.

라) 선행발명 2에는 제조방법에 관한 구체적 기재가 없고, 선행발명 3에도 돌외를 주정 추출하였다는 기재가 있을 뿐이다. 돌외잎 에탄올 추출물 농축액을 고온고압반응 처리하면 다물린 A, B의 함량이 증가한다는 점에 관한 기재나 암시도 없다.

#### 4) 소결

이 사건 제1항 발명은 선행발명들에 의하여 진보성이 부정되지 아니한다.

#### 다. 이 사건 제2항 발명의 진보성

##### 1) 선행발명 1 또는 선행발명 1, 2, 3의 결합과 대비

앞서 본 바와 같이 이 사건 제2항 발명과 선행발명 1은, 고온고압반응 처리 유무(차이점 1), 다물린 A, B 성분과 함량의 특정 여부(차이점 2) 등에서 차이가 있다.

앞서 인정한 사실, 앞서 든 증거 및 변론 전체 취지를 종합하여 알 수 있는 다음 사정에 비추어 보면, 통상의 기술자가 선행발명 1 단독으로나 선행발명 1, 2, 3을 결합하여 차이점 1, 2를 쉽게 극복할 수 있다고 보기 어려우므로, 이 사건 제2항 발명은 선행발명 1 또는 선행발명 1, 2, 3의 결합에 의하여 진보성이 부정되지 아니한다.

가) 선행발명 1은 돌외잎 에탄올 농축액을 고온고압반응 처리할 동기를 암시 또는 제시하고 있지 않다. 다물린 A, B를 유효성분으로 인식하고 있지도 않다.

나) 선행발명 2에는 제조방법에 관한 구체적 기재가 없고, 선행발명 3에도 돌외를 주정 추출하였다는 기재가 있을 뿐이다. 돌외잎 에탄올 추출물 농축액의 고온고압반응 처리에 관한 동기를 암시하거나 제시하고 있지도 않다.

다) 선행발명 2, 3이 체중감소 효과를 언급하고는 있으나 그 약효성분을 다물린 A, B로 특정하고 있지는 않으며, 이를 암시하고 있다고 볼 기재도 없다. 고온고압반응 처리로 다물린 A, B의 함량이 증가할 것이라는 점에 관한 기재나 암시도 없다.

## 2) 선행발명 6 또는 선행발명 1, 6의 결합과 대비

앞서 본 바와 같이 이 사건 제2항 발명과 선행발명 6은, 열처리의 순서와 고압 조건 유무(차이점 3), 다물린 A, B 성분 특정 여부(차이점 4) 등에서 차이가 있다.

앞서 인정한 사실, 앞서 든 증거 및 변론 전체 취지를 종합하여 알 수 있는 다음 사정에 비추어 보면, 통상의 기술자가 선행발명 6 단독으로나 선행발명 1과 선행발명 6을 결합하여 차이점 3, 4를 쉽게 극복할 수 있다고 보기 어려우므로, 이 사건 제2항 발명은 선행발명 1 또는 선행발명 1, 6의 결합에 의하여 진보성이 부정되지 아니한다.

가) 선행발명 6에서 열처리는 차(茶)를 제조할 때 생잎의 발효를 막기 위해 찻잎을 솥에 넣고 고온에서 타지 않을 정도로 볶아서 익히는 과정인 덫음에 대응되는 것이다.

그러나 선행발명 6에서, 그 돌외잎을 에탄올로 추출한 뒤의 농축액을 열처리할 동기는 찾을 수 없다. 세 번에 걸쳐 감압 조건을 제시하고 있는 선행발명 6에서 고압하에서의 열처리를 도출하기도 어렵다.

나) 이 사건 제2항 발명과 선행발명 6은 열처리를 제외하고도 추출 및 분획과정 등에 차이가 있어, 똑같이 고온고압 처리를 한다고 하여 사포닌 성분의 탈당 및 탈수 반응이 동일하게 진행될 것이라고 단정할 수 없다.

다) 선행발명 6은 다물린 A, B의 존재를 인식하고 있지 않고, 가이페노사이드가 아닌 진세노사이드 10종을 유효성분으로 특정하여 화학 구조식을 제시하고 있다.

라) 한편 선행발명 1에도 돌외잎의 에탄올 추출물 농축액을 고온고압반응 처리할 동기는 나타나 있지 않고, 선행발명 1이 다물린 A, B를 유효성분으로 인식하고 있지도 않다. 선행발명 6은 기본적으로 돌외보다는 인삼을 재료로, 신장질환의 예방과 치료를 위한 약학 조성물을 제공하려는 발명이라는 점에서(명세서 식별번호 [0006, 0030] 등 참조), 선행발명 1과 결합할 동기가 약하다.

### 3) 선행발명 1, 4, 5의 결합 또는 선행발명 1 내지 5의 결합과 대비

앞서 5.의 나.에서 이 사건 제1항 발명에 관하여 본 것과 같은 이유로, 선행발명 1, 4, 5의 결합 또는 선행발명 1 내지 5의 결합으로도 이 사건 제2항 발명의 진보성이 부정되지 아니한다.

### 4) 소결

이 사건 제2항 발명은 선행발명들에 의하여 진보성이 부정되지 아니한다.

라. 이 사건 제3 내지 6항 발명의 진보성

이 사건 제3 내지 6항 발명은 이 사건 제2항 발명의 돌외추출물을 포함하는 치료용

약학 조성물 또는 기능식품에 관한 발명으로서, 이 사건 제2항 발명의 진보성이 부정되지 않는 이상, 이 사건 제3 내지 제6항 발명의 진보성도 부정되지 아니한다.

마. 이 사건 제7, 8항 발명의 진보성

이 사건 제7, 8항 발명은 AMPK 효소 활성을 증가시키는 성분이 다물린 A, B라는 점에 기초하여 다물린 A 또는 다물린 B 중 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 내세운 의약용도발명이다. 그런데 선행발명 1 내지 6은 어느 것도 다물린 A, B의 존재를 인식하거나 그것의 생리활성을 기재 또는 암시하고 있지 아니한바, 통상의 기술자가 선행발명 1, 선행발명 1, 2, 3의 결합, 선행발명 6, 선행발명 1과 6의 결합, 선행발명 1, 4, 5의 결합, 선행발명 1 내지 5의 결합에 의하여 차이점 5를 쉽게 극복할 수 있다고 보기 어려우므로, 이 사건 제7, 8항 발명도 그 진보성이 부정되지 아니한다.

바. 소결론

이 사건 특허발명은 진보성이 없다는 원고의 주장은 모두 이유 없다.

6. 이 사건 제2 내지 8항 발명의 명확성 요건 충족 여부

가. 관련 법리

특허법 제42조 제4항 제2호는 청구범위에는 발명이 명확하고 간결하게 적혀야 한다고 규정하고 있다. 그리고 특허법 제97조는 특허발명의 보호범위는 청구범위에 적혀 있는 사항에 의하여 정하여진다고 규정하고 있다. 따라서 청구항에는 명확한 기재만이 허용되고, 발명의 구성을 불명료하게 표현하는 용어는 원칙적으로 허용되지 아니한다. 또한 발명이 명확하게 적혀 있는지는 통상의 기술자가 발명의 설명이나 도면 등 기재와 출원 당시의 기술상식을 고려하여 청구범위에 기재된 사항으로부터 특허를 받고자 하는 발명을 명확하게 파악할 수 있는지에 따라 개별적으로 판단하여야 하고, 단순히

청구범위에 사용된 용어만을 기준으로 하여 일률적으로 판단하여서는 안 된다(대법원 2017. 4. 7. 선고 2014후1563 판결 참조).

#### 나. 이 사건 제2항 발명

천연물 추출물은 채취방법, 수확 후 건조방법, 추출방법 등에 따라 성분과 함량이 달라질 수 있어 ① 물리적, 정성·정량적인 성질, ② 추출물을 분리하기 위한 구체적인 제법, ③ 구체적인 조성성분으로 한정하거나, ④ 위 형식 중 둘 이상을 혼합하는 방식으로 특징하는 것이 보통이다.<sup>18)</sup>

앞서 본 바와 같이 이 사건 제2항 발명은 "돌외추출물"에 관한 발명으로서 물건의 발명이고, 구성요소 2-1은 추출물 분리에 관한 것은 아니지만 추출물의 제조방법을, 구성요소 2-2는 조성성분을 한정한 것으로 볼 수 있다. 구성요소 2-1은 고온고압반응 처리 방법을 온도, 압력, 시간으로 한정하고 있고, 구성요소 2-2는 그로써 얻은 추출물 조성을 유효지표성분인 다물린 A, B의 함량 범위로 대표하여 한정하고 있는바, 통상의 기술자는 이 사건 제2항 발명이 보호받으려는 사항을 명확히 파악할 수 있다고 봄이 타당하다. 따라서 이 사건 제2항 발명은 청구항의 명확성 요건을 충족한다.

#### 다. 이 사건 제3 내지 6항 발명

이 사건 제3 내지 6항 발명은 이 사건 제2항 발명의 돌외추출물을 포함하는 치료용 약학 조성물 또는 기능식품에 관한 발명으로서, 이 사건 제2항 발명이 명확히 기재된 이상, 이 사건 제3 내지 제6항 발명도 청구항의 명확성 요건을 충족한다.

#### 라. 이 사건 제7, 8항 발명

1) 이 사건 제7항 발명은 "하기 화학 구조식(생략)의 다물린 A 또는 다물린 B의 화

---

18) 특허청, 기술분야별 심사실무가이드, 2020(이하 '심사실무가이드'라 한다), 5213-5215쪽 참조.

합물 중 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 비만, 당뇨 또는 고지혈증의 개선 및 치료용 약학 조성물"로서 의약용도발명에 해당한다. 위 의약용도발명을 구성하는 요소로서 '특정 물질'은 '다물린 A 또는 다물린 B 화합물 중 하나 이상', 그것이 가진 '의약용도'는 '비만, 당뇨, 고지혈증 개선 및 치료'인바, 통상의 기술자는 이 사건 제7항 발명이 보호받으려는 사항을 명확히 파악할 수 있다.

2) 이에 대하여 원고는, 이 사건 제7항 발명의 "다물린 A 또는 다물린 B의 화합물 중 하나 이상" 부분은 "분리된"이라는 한정이 없어 '추출물에서 분리된 다물린 A, B'를 뜻하는지, '분리되지 않고 추출물 중에 존재하면서 약리활성을 나타내는 유효성분으로서의 다물린 A, B'를 뜻하는지가 불명확하다는 취지로 주장한다.

그러나 원고의 위 주장은 다음과 같은 점에서 받아들일 수 없다.

가) 유기화합물은 원칙적으로 화합물명이나 화학구조식으로 특정하여 기재한다.<sup>19)</sup> 이 사건 제7항 발명은 "다물린 A 또는 다물린 B"라는 화합물명과 그 화학 구조식을 명확하게 기재하고 있어서, 통상의 기술자가 의약용도발명의 특정 물질이 무엇인지를 파악할 수 있다. 다물린 A, B가 유효성분으로 작용하기 위한 함량이 반드시 기재되어야 한다고 볼 수도 없다.

나) 천연물에서 분리된 화합물이라 하여 "분리된" 같은 표현을 부가해야 한다고 볼 이유가 없다. 그러한 한정이 있든 없든 특정 물질의 구조나 성질은 바뀌지 않는다.

다) 다물린 A, B가 돌외추출물에 함유되어 있다고 하더라도 그것이 AMPK 활성화에 영향을 주는 유효성분일 수 있다는 점은 이 사건 특허발명 전에는 밝혀지지 않았고, 이 사건 제7항 발명은 그러한 점에 기초하여 의약의 용도를 청구한 것이다.

---

19) 심사실무가이드, 5212쪽.



라) 이 사건 제7항 발명이 개방형("함유하는")으로 기재되어 있기는 하나, 의약품  
을 만들 때는 유효성분 외에 부형제(賦形劑)를 첨가하게 되는 점 등을 고려하면 위와  
같은 기재가 허용될 수 없다고 보기 어렵다. 이 사건 제7항 발명은 추출물이나 특정한  
화합물을 보호받으려는 것이 아니므로, 위와 같이 기재되었다 하여 특정 물질과 의약  
용으로 구성된 범위를 넘어서, 예컨대 다물린 A, B 자체나, 다물린 A, B 외의 화합물  
로까지 보호범위가 확장되는 것은 아니다.

3) 이 사건 제7항 발명이 명확히 기재된 이상, 실질적으로 동일한 의약품도발명인  
이 사건 제8항 발명도 청구항의 명확성 요건을 충족한다.

#### 마. 소결론

이 사건 특허발명의 청구범위가 불명확하다는 원고의 주장은 모두 이유 없다.

### 7. 이 사건 제7, 8항 발명의 기타 명세서 기재요건 충족 여부

#### 가. 관련 법리

1) 특허법 제42조 제3항에 따르면, 특허출원서에 첨부하는 명세서의 '발명의 설명'  
에는 통상의 기술자가 해당 발명을 명세서 기재에 의하여 출원 시 기술수준으로 보아  
특수한 지식을 부가하지 않고서도 정확하게 이해할 수 있고 동시에 재현할 수 있도록  
목적·구성·작용 및 효과를 기재하여야 한다. 특히 약리효과의 기재가 요구되는 의약  
용도발명에서는 출원 전에 명세서에 기재된 약리효과를 나타내는 약리기전이 명확히  
밝혀졌다는 등 특별한 사정이 없다면 특정 물질에 그와 같은 약리효과가 있다는 것을  
약리데이터 등이 나타난 시험례로 보이거나 이를 대신할 수 있을 정도로 구체적으로  
기재하여야만 비로소 발명이 완성되었다고 볼 수 있는 동시에 명세서 기재요건을 충족  
했다고 볼 수 있다(대법원 2004. 12. 23. 선고 2003후1550 판결 참조).

2) 특허법 제42조 제4항 제1호는 청구항이 '발명의 설명'에 의하여 뒷받침될 것을 규정하고 있는데, 이는 '발명의 설명'에 기재되지 않은 사항이 청구항에 기재됨으로써 출원자가 공개하지 아니한 발명에 대해 특허권이 부여되는 부당한 결과를 막으려는 데 취지가 있다. 따라서 특허법 제42조 제4항 제1호가 정한 위와 같은 명세서 기재요건을 충족하는지는 위 규정 취지에 맞게 특허출원 당시 기술수준을 기준으로 통상의 기술자 입장에서 청구범위에 기재된 발명과 대응되는 사항이 '발명의 설명'에 기재되어 있는지에 따라 판단하여야 하므로, 특허출원 당시 기술수준에 비추어 '발명의 설명'에 개시된 내용을 청구범위에 기재된 발명의 범위까지 확장 또는 일반화할 수 있다면 청구범위는 '발명의 설명'에 의하여 뒷받침된다고 볼 수 있다(대법원 2016. 5. 26. 선고 2014후 2061 판결, 대법원 2020. 8. 27. 선고 2017후2864 판결 등 참조).

#### 나. 구체적 판단

앞서 인정한 사실, 앞서 든 증거, 갑 제39 내지 44호증 각 기재, 이 법원에 현저한 사실 및 변론 전체 취지를 종합하여 알 수 있는 다음 사정에 비추어 보면, 이 사건 제 7, 8항 발명은 명세서 기재의 실시가능성 및 뒷받침 요건을 충족한다고 봄이 타당하다.

1) AMPK[Adenosine Monophosphate(AMP)-activated protein kinase]는 세포 내의 에너지 상태를 감지하고 조절하는 효소로, 에너지가 부족하거나 배고픔을 느끼면 활성화되어 에너지 균형을 회복하는 역할을 한다. 세포는 에너지를 얻기 위해 '에너지 통화 (energy currency)'라고도 불리는 ATP(Adenosine Triphosphate)를 분해하고, ATP가 분해되면 AMP 수준이 상승하여[ATP→ADP(Adenosine Diphosphate)→AMP] 세포 내에 에너지가 부족하다는 신호로 작용한다. AMP 증가는 AMPK를 활성화시켜 지방산 베타 산화를 촉진하고(에너지 생성, 체지방 감소), 세포 내 포도당 수송체(GLUT4; glucose

transporter 4) 합성을 늘려 세포 내로의 포도당 흡수를 증가시킨다(혈당 저하). AMPK는 세포 내에서 포도당 분자를 분해하여 에너지(ATP)를 생산하는 과정인 해당작용(glycolysis)을 촉진하는 한편, 지방산 합성에 관여하는 ACC(Acetyl-CoA Carboxylase) 효소와, 콜레스테롤 합성 효소인 HMG-CoA의 활성을 억제하여, 지방산과 콜레스테롤 합성을 감소시킨다. 결국 AMPK 활성화는 세포가 에너지를 저장하는 대신 사용하도록 촉진한다.

2) 이 사건 특허발명 명세서도 식별번호 [0003~0007, 0044~0053(실시례 3, 4, 5)] 등에서 여러 문헌과 실험데이터를 들어 위 과정을 설명하고 있다. 이 사건 특허발명 출원 당시의 기술수준에 비추어 볼 때, 통상의 기술자는 누구라도 그와 같은 명세서 기재로부터 다물린 A, B가 AMPK 효소의 활성을 증가시킨다면 그것이 지방산 산화를 촉진하고 지방산 및 콜레스테롤 합성을 억제하여 비만, 고지혈증을 개선하는 효과를 가지리라는 점, 포도당의 세포 내 흡수 증가는 혈당을 낮추어 당뇨 증상 관리를 도우라는 점을 인식할 수 있을 것이다. 선행발명 1 명세서의 식별번호 [0109~0133(실시례 3~6)]에도, AMPK 활성화에 따른 위와 같은 약리효과가 여러 문헌 및 실험데이터와 함께 구체적으로 기재되어 있다.

따라서 통상의 기술자는 이 사건 특허발명 출원 당시 기술수준에서 특수한 지식을 부가하지 않고 명세서 기재만으로도 이 사건 제7, 8항 발명을 정확하게 이해하고 동시에 재현할 수 있으며, 발명의 설명에 개시된 약리효과를 이 사건 제7, 8항 발명의 의약용도발명에까지 확장 또는 일반화할 수 있다고 봄이 타당하다.

3) 이에 대하여 원고는 이 사건 특허발명 출원일 이후에 발간된 문헌들을 근거로 '이 사건 특허발명 출원 당시 AMPK 활성화가 바로 항비만, 항당뇨 효과를 갖는다는

약리기전은 확립되어 있지 않았다'고 주장한다. 그러나 위 문헌들에서 원고가 지적하는 부분은 원고의 주장을 뒷받침한다고 보기 어렵다.

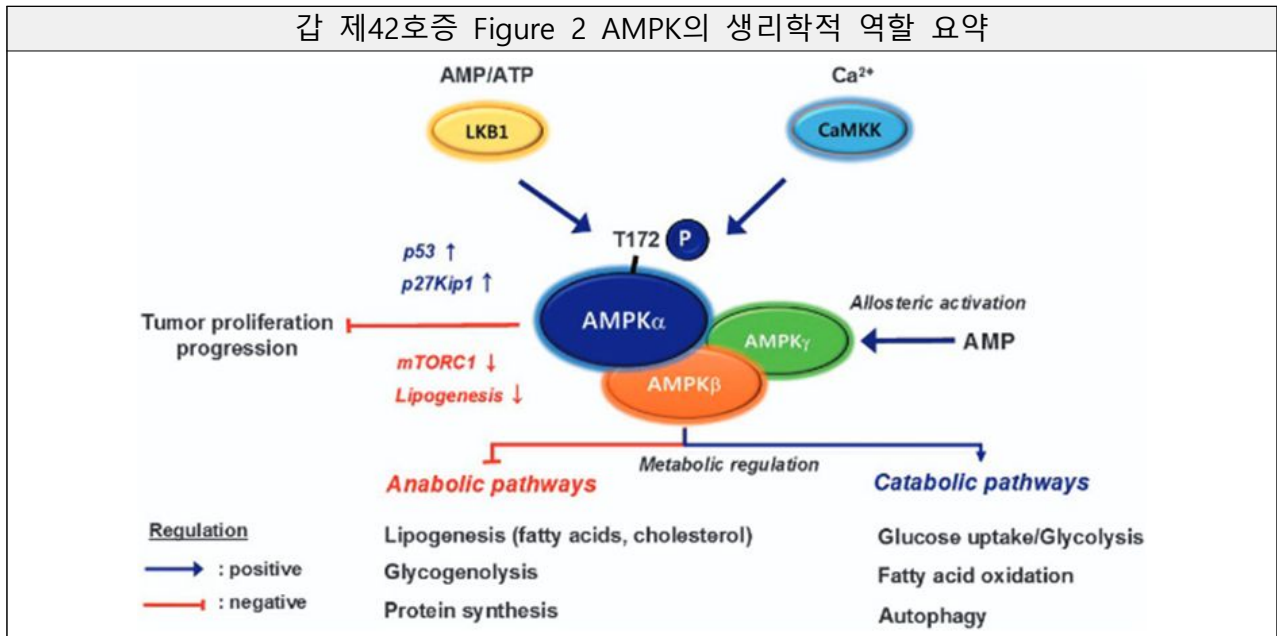
예컨대, 원고는 종설 논문(review article)인 갑 제42호증에서 "However, it is not always clear whether the effects of these agents are mediated by AMPK."라는 문장<sup>20)</sup>을 맥락 없이 떼어 'AMPK 활성화제의 효과가 AMPK에 의해 매개되는지 여부는 항상 명확하지 않았다'로 옮긴 뒤, 이것이 AMPK 활성화와 약리효과 사이의 불확실한 관계를 언급한 것이라고 주장한다. 그런데 위 문장은 바로 앞 문장<sup>21)</sup>에 언급된 메트포르민(metformin), 티아졸리딘디온(TZDs), 2-디옥시글루코오스(2-deoxyglucose) 등 실제로는 간접적으로만 AMPK를 활성화하는 약제들이 나타내는 효과가 AMPK에 의해 매개되는지가 언제나 분명한 것만은 아니라는 내용에 불과하다. 위 약제들의 외견상 AMPK 활성화와 관련된 것으로 보이는 효과는 직접적으로 AMPK 활성화에 따른 것인지, 아니면 다른 경로를 통한 것인지가 불분명한 때가 없지 않으므로("it is always not clear"가 아니라 "it is not always clear"이다), 분자적 수준의 기전을 약제별로 추가로 규명할 필요가 있다는 것이다. 즉, AMPK 활성화의 약리기전 자체를 부정한 것이 아니다. 오히려 위 논문은 2~3쪽에서 AMPK의 약리기전을 일반적으로 정리하고 있고, 위 문장도 그 기전이 이미 어느 정도 정립되었음을 전제로 한 서술이다. 뒤에서 보는 바와 같은 위 논문 Figure 2를 보더라도 AMPK 활성화가 지방산, 콜레스테롤 합성을 억제하고[fatty acids, cholesterol 등 지질 합성(lipogenesis)은 동화, 합성 경로(anabolic pathways)에

---

20) Joungmok Kim et al., "AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities", *Experimental & Molecular Medicine*, 48, 2016, 8쪽.

21) "Most of the current agents that have been shown to activate AMPK in physiological trials, such as metformin, TZDs and 2-deoxyglucose, are indirect activators that inhibit oxidative phosphorylation and glycolysis, thereby increasing the ADP(AMP):ATP ratio."

빨간 줄(negative)로 표시], 포도당 흡수와 해당작용은 촉진한다는[glucose uptake, glycolysis는 이화, 분해 경로(catabolic pathways)에 파란 줄(positive)로 표시] 앞서 본 것과 같은 내용이 명확하게 표시되어 있다.



갑 제42호증 외에 원고가 근거로 든 나머지 문헌들도 AMPK 활성화의 효과를 부정 한 것으로는 볼 수는 없고, 원고 주장은 위와 같이 부분적, 지엽적 표현을 자의적으로 해석한 것에 근거하고 있어서 받아들일 수 없다.

#### 다. 소결

이 사건 제7, 8항 발명 명세서 기재의 실시가능성 및 뒷받침 요건에 관한 원고의 주장은 이유 없다.

### 8. 이 사건 제7, 8항 발명의 성립성 유무

#### 가. 관련 법리

특허를 받을 수 있는 발명은 완성된 것이어야 한다. 통상의 기술자가 반복 실시할 수 있고, 발명이 목적하는 기술적 효과의 달성 가능성을 예상할 수 있을 정도로 구체

적, 객관적으로 구성되어 있으면 발명은 완성되었다고 보아야 한다. 발명이 완성되었는지는 청구범위를 기준으로 출원 당시의 기술수준에 따라 발명의 설명에 기재된 발명의 목적, 구성, 작용효과 등을 전체적으로 고려하여 판단하여야 하고, 반드시 발명의 설명 중 구체적 실시례에 한정하여 인정되는 것은 아니다(대법원 2013. 2. 14. 선고 2012후 3312 판결, 대법원 2019. 1. 17. 선고 2017후523 판결 등 참조).

#### 나. 구체적 판단

원고는, '다물린 A, B는 천연 돌외잎에 존재하는 자연적 산물이어서 이 사건 제7, 8항 발명의 성립성이 부정된다'는 주장도 한다. 그러나 앞서 본 바와 같이 이 사건 제7, 8항 발명은 의약용도발명으로서 다물린 A, B라는 화합물 자체를 보호받으려는 것이 아니므로, 다물린 A, B가 자연적 산물인지와 무관하게 원고의 위 주장은 이유 없다.

나아가 이 사건 특허발명 명세서에는 유효성분으로서 다물린 A, B의 구조가 명확히 제시되어 있고, 그 화합물이 나타내는 약리효과도 기재되어 있으므로, 통상의 기술자는 그 출원 당시의 기술수준에 비추어 이 사건 제7, 8항 발명을 반복 실시할 수 있고, 그 기술적 효과의 달성 가능성을 예상할 수 있을 것이다.

따라서 이 사건 제7, 8항 발명은 완성되었다고 봄이 타당하다.

#### 9. 결론

이 사건 특허발명에 등록을 무효로 할 사유가 있다고 인정되지 아니하므로 이 사건 심결은 적법하다. 이 심결 취소를 구하는 원고의 청구는 이유 없어 기각한다.

재판장      판사      문주형

판사      권보원

판사      한지윤

## 이 사건 특허발명의 주요 내용

### 기술분야

[0001] 본 발명은 돌외추출물을 고온고압으로 처리하여 AMPK 활성화 유효성분인 다물린 A 및 다물린 B의 함량을 증가시킨 새로운 조성의 돌외추출물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0002] 또한 본 발명은 다물린 A 및 다물린 B의 함량이 증가된 새로운 조성의 신규 돌외추출물을 비만, 당뇨, 고지혈증 등을 포함하는 대사질환의 효율적인 치료 및 개선 용도로 사용하는 방법에 관한 것이다.

### 배경기술

[0003] AMPK(AMP-activated protein kinase)는  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 의 서브유닛(subunit)으로 구성된 헤테로트라이머(heterotrimer) 단백질로서 주로 근육세포에 많이 존재하며, 이외에도 뇌, 심장, 지방 조직 및 간에도 존재하는 효소로서 AMPK의 작용은 세포 내에서 에너지 준위를 감지하는 중요 센서이며, 또한 이 결과에 따라 식욕조절, 체중조절, 혈당조절 및 혈중지질대사 조절 등에 핵심 역할을 한다.

[0005] 인산화 형태의 AMPK는 ATP를 소비하는 생화학 반응인 지방산 및 콜레스테롤의 합성을 억제하게 되며, 반대로 ATP를 생성하는 지방산의 베타 산화( $\beta$ -oxidation) 과정과 해당작용(glycolysis)을 활성화시키게 된다. 뿐만 아니라 세포막의 포도당 흡수 통로인 글루코스 트랜스포터 4(glucose transporter 4, GLUT4)의 양을 증가시키게 된다. 한편 AMPK의 활성화는 인슐린의 작용에 따른 PI3K 신호전달기작과 상관없이 세포 내 포도당 흡수 통로인 GLUT4의 세포막 이동을 증가시키게 된다. 또한 AMPK가 인산화에 의해 활성화가 되면 또 다른 하위 단백질인 콜레스테롤 합성의 핵심 효소인 HMG-CoA 환원효소(hydroxymethylglutaryl-CoA reductase)에 대한 인산화가 일어난다. 이 결과 HMG-CoA 환원효소의 불활성화가 일어나게 되어 콜레스테롤 합성이 저하되게 되므로 혈중 콜레스테롤이 감소된다.

[0006] 또한 인산화가 일어나 활성화된 형태의 AMPK 효소는 그 하위 작용 단백질로서 지방산 합성의 핵심 효소인 ACC(acetyl-CoA carboxylase)의 세린(Ser)-79 잔기에 대한 인산화를 일으켜 이 ACC 효소의 활성을 억제하게 된다. 이 결과 AMPK의 활성화에 의해서 지방산 합성의 핵심 대사산물인 말로닐-CoA(malonyl-CoA) 생성이 저하되어 지방산의 합성이 억제되게 된다. AMPK 활성화로 말로닐-CoA 감소가 일어나면 미토콘드리아 내로 지방산인 롱 체인 아실-CoA(long chain acyl-CoA)가 유입되어 베타 산화가 촉진된다. 높은 농도의 말로닐-CoA 존재 상태에서는 롱 체인 아실-CoA를 미토콘드리아로 전달하는 CPT1(carnitine palmitoyl-



CoA transferase)이 억제되고 있는데, AMPK 활성화로 말로닐-CoA의 농도가 저하되게 되어 이 저해 작용이 해제되면서 미토콘드리아 내로 롱 체인 아실-CoA 형태의 지방산들의 유입이 증가되면서 베타 산화가 증가되므로 체지방 및 혈중 중성 지질의 감소가 일어나게 된다.

**[0007]** 한편 AMPK의 활성화는 PGC-1 $\alpha$ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 $\alpha$ )에 대한 인산화를 일으키며 또한 히스톤 디아세틸라아제(histone deacetylase)의 일종인 SIRT1(Silent Information Regulatory T1)을 활성화시킨다. 이 결과 AMPK와 SIRT1에 의한 PGC-1 $\alpha$ 의 인산화 및 탈아세틸화에 의해 미토콘드리아 대사가 활발히 일어나, 당뇨 및 비만 개선 효과가 나타나게 된다(Canto and Auwerx, *Curr. Opin. Lipidol.* 20, 98-105, 2009; Canto 등, *Nature* 458, 1056-1060, 2009). 그러므로 AMPK 활성화는 체내 [지]방산 및 콜레스테롤 합성 억제 그리고 체지방의 베타 산화 및 혈중 포도당의 [세포 흡수 등] 작용을 촉진하기 때문에 AMPK를 활성화하는 물질은 비만, 당뇨 및 고지혈증의 개선이나 치료에 매우 효과적으로 사용될 수 있다.

**[0009]** 한국공개특허 2008-0003931에는 돌외추출물이 AMP-activated protein kinase(AMPK) 활성을 증가시켜 인슐린 저항성, 비만 그리고 고지혈증 등을 포함하는 대사질환을 개선시킬 수 있음을 시사하는데 이에 대해 본 발명에서 돌외추출물의 성분을 분석한 결과 다물린 A와 다물린 B라는 물질이 돌외추출물에서 AMPK 활성화에 영향을 주는 것으로 확인되었다. 또한 본 발명의 기술을 이용하여 제조한 다물린 A 및 다물린 B 함량이 증가된 새로운 조성의 신규 돌외추출물은 기존 돌외추출물에 비해 AMPK의 인산화 능력 및 효소 활성화 능력이 증가된 것으로 확인되었다.

### 해결하고자 하는 과제

**[0010]** 본 발명은 돌외추출물로부터 분리된 신규 화합물인 다물린 A 혹은 다물린 B가 포함된 비만, 당뇨, 고지혈증 등의 대사질환 개선 및 치료 효과를 나타내는 조성물을 제공하는 데에 있다.

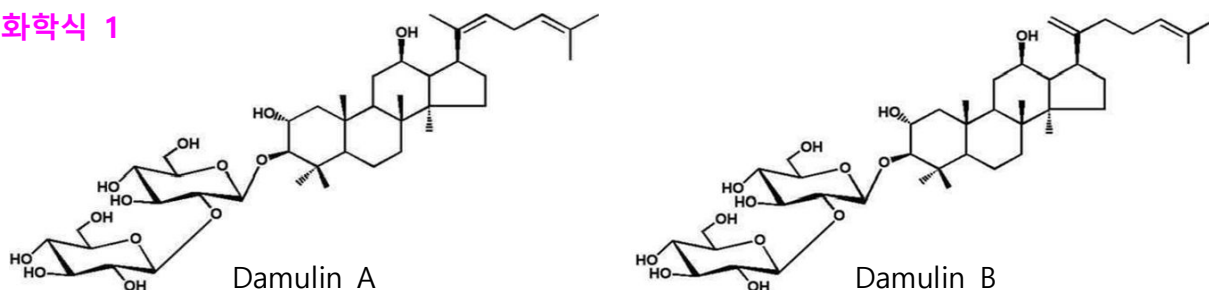
**[0011]** 본 발명의 또 다른 목적은 다물린 A 혹은 다물린 B의 양이 증가된 비만, 당뇨, 고지혈증 등의 대사질환 개선 및 치료 효과를 나타내는 신규 돌외추출물 및 이를 포함하는 의약품, 건강기능식품 또는 기능식품을 제공하는 데에 있다.

### 과제 해결수단

**[0012]** 본 발명에서는 돌외추출물로부터 신규 담마란계 사포닌 물질인 AMP-activated protein kinase(AMPK) 효소 활성화 능력을 갖는 다물린 A(damulin A)로 명명된 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,12 $\beta$ -trihydroxydammar-20(22)-E,24-diene-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ )- $\beta$ -D-glucopyranoside]

및 다물린 B(damulin B)로 명명된 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,12 $\beta$ -trihydroxydammara-20,24-diene-3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ )- $\beta$ -D-glucopyranoside]를 HPLC[주: 고성능 액체 크로마토그래피(High-Performance Liquid Chromatography)] 및 NMR[주: 핵자기 공명(Nuclear Magnetic Resonance)] 방법을 이용하여 분리 및 분석하였고 구조는 하기 화학식과 같다.

#### 화학식 1



**[0015]** 다물린을 분리하기 위한 돌외잎 추출물을 제조하기 위해서는 먼저 건조된 돌외잎을 10~20배 부피의 에탄올 수용액(바람직하게는 20~80% 에탄올 수용액) 추출한 뒤 1차 상층액을 수거한다. 남은 돌외잎 잔유 침지물에 다시 에탄올 수용액(바람직하게는 20~80% 에탄올 수용액)을 6~20배 가하고 65~95°C에서 1~8시간 추출하여 2차 상층액을 얻고 1차 및 2차 상층액을 합친 후 거즈를 이용하여 여과를 시키고 얻어진 액을 다시 800~1,500 x G에서 원심분리하여 부유물을 제거한다. 얻어진 추출액을 감압농축하여 40~70브릭스(Brix)로 농축한 후 얻은 돌외추출물 농축액(이하, 'TG1022'라 칭함)을 다시 고온고압 조건에서 다물린 함량이 높아진 신규 돌외추출물 농축액(이하, 'TG1022F'라 칭함)을 얻을 수 있다.

**[0016]** 다물린 함량이 높아진 신규 돌외추출물(TG1022F)을 얻기 위해서는 고온 및 고압의 유지가 필요한데 이를 위해서 상업적으로 이용되는 일반적인 고온고압 또는 고온고압살균 장치가 부착된 발효조 및 추출기를 이용할 수 있다.

**[0017]** 상기 신규 돌외추출물은 온도가 높지 않은 초고압 상태에서도 생성할 수 있는데 초고압 상태를 유지하기 위해서 상업적으로 판매되고 있는 초고압 반응기를 이용할 수도 있다. 예컨대, 일본 동양고압사의 DFS-2L 등을 사용할 수 있다. 상기 신규 돌외추출물을 제조하기 위한 바람직한 온도는 40~125°C이고 바람직한 압력은 1.2~1100기압이다. 반응시간은 바람직하게는 0.1~24시간이다. 이밖에 돌외추출물에서 다물린 A와 다물린 B 함량을 높일 수 있는 방법으로는 고압 및 고온 조건 이외에도 초고주파 레인지나 오븐을 이용하는 것도 가능하다.

**[0019]** 본 발명의 돌외추출물에 고온 및 고압을 가한 신규 돌외추출물은 다물린 A 및 다물린 B가 증가되어 당뇨병, 비만, 체지방 감소 그리고 혈중 중성지방 및 콜레스테롤을 감소시키는 효과가 월등히 향상되는데 이러한 대사질환에 대한 치료, 개선 또는 예방 효과를 위해

서 다물린 A 및 다물린 B의 함량이 건조 중량당 각기 본 발명의 새로운 조성의 신규 돌외추출물 건조 고형분 중 유효지표성분인 다물린 A의 함량은 0.5%에서 10% 내의 범위이며 유용하게는 0.7%에서 7% 범위이며, 다물린 B의 함량은 0.3%에서 8% 내의 범위이며 유용하게는 0.5%에서 6% 범위이다.

### 효과

**[0026]** 다물린 A 및 다물린 B의 함량이 증가된 신규 돌외추출물은 기존 돌외추출물에 비해 AMPK의 인산화 능력 및 효소 활성화 능력이 매우 증가되게 된다.

**[0027]** AMPK의 하부 타깃 단백질이며 지방산 생합성의 핵심 효소인 ACC(acetyl-CoA carboxylase)의 인산화를 훨씬 증가시킬 수 있어서, 이 결과 ACC의 효소 활성을 저하시키는 능력도 훨씬 강하게 나타내게 된다. 따라서 궁극적으로는 다물린의 함량을 증가시킨 신규 돌외추출물(TG1022F)은 다물린 함량을 증가시키지 않은 원래의 돌외추출물(TG1022)에 비해 체지방 합성 억제 능력, 지방산의 베타 산화 촉진 능력, 콜레스테롤 생합성 억제 능력, 고지혈증 치료 및 개선 효과, 비만의 치료 및 개선 효과가 있고 인슐린 비의존적으로 세포 포도당 운반체인 GLUT4의 세포막 이동 능력을 매우 증가시킴에 따라 당뇨병 환자의 혈당을 효율적으로 저하시킬 수 있다.

**[0028]** 결과적으로 기존 돌외추출물에 비해 본 발명의 방법을 이용하여 제조한 다물린 A와 다물린 B 함량이 높은 신규 돌외추출물이 비만, 당뇨, 고지혈증 등의 대사질환의 개선 또는 치료 효과가 훨씬 우수하다고 할 수 있다.

### 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

**[0030] <실시례 1. 돌외추출물로부터 AMPK 활성 물질인 다물린의 분리>**

**[0031]** 건조된 돌외잎 5kg을 50% 에탄올 50ℓ에 침지시킨 후 90℃에서 6시간 1차 추출한 뒤 1차 상층액을 수거하였다. 남은 돌외잎 잔유 침지물에 다시 50% 에탄올 50ℓ를 가하고 90℃에서 6시간 추출하여 2차 상층액을 얻었다. 1차 및 2차 상층액을 합친 후 거즈로 여과하여 얻어진 액을 다시 1,000 x G에서 원심 분리하여 부유물을 제거하였다. 얻어진 추출액을 감압 농축하여 50브릭스로 농축한 후 이를 AMPK 활성 물질인 다물린 분리에 이용하였다.

**[0032]** 다물린의 순수 분리를 위하여 50브릭스로 농축된 돌외추출물을 HP-20 음이온 교환수지(Mitsubishi Chemical Corporation)가 충전된 칼럼(20 x 65cm)을 통과시킨 다음, 일차적으로 10ℓ 물로 세척하고, 그다음 10ℓ의 50% 메탄올을 통과시켜 세척한 후, 다시 10ℓ의 아세톤을 통과시켜 아세톤 분획을 얻어 농축하였다. 이후 농축액에 물을 1.5ℓ 섞어 현탁시킨 후 다시 1.5ℓ 노르말 헥산(n-Hexane)을 사용하여 각 3번 추출한 헥산 층(200g), 1.5ℓ 에틸아세테이트로

각 3번 추출한 에틸아세테이트 층(200g) 그리고 1.5ℓ의 노르말 부탄올(n-butanol)로 각 3번 추출한 부탄올 층(200g)을 얻었다.

**[0033]** 이들 중 L6 근육세포(L6 myotube cells)에서 AMPK 인산화 증가에 따른 활성 능력이 가장 높은 부탄올 분리 층(100g)을 실리카겔(Merck사) 칼럼(15x65cm; 63-200 $\mu$ m 입자크기)에 초기 용매 혼합조성 비율을 클로로포름 : 메탄올 : 물 = 5 : 1 : 0.1로 시작하여 최종 용매 혼합비율이 클로로포름 : 메탄올 : 물 = 0 : 1 : 0.1의 농도 구배로 물질을 분리하여 전체 5개의 분획(B.1-B.5)을 얻었다.

**[0034]** 이들 분획을 HPLC 분석을 통해 확인한 결과 B.3과 B.4는 함유된 물질이 매우 유사하여 이들 두 개의 분획을 합쳐서 B.34 분획을 새로이 만들었으며 이들을 다시 ODS-A 실리카겔(Merck사) 칼럼(6.5x65cm; 12nm-150 $\mu$ m 입자크기)에 통과시키고 물질 분리를 위한 용매로서 물과 메탄올 혼합비율이 초기에는 1 : 1에서 최종 0 : 1이 되도록 단계적 농도 구배를 사용하여 6개의 분획을 얻었다(B.34-1에서 B.34-6).

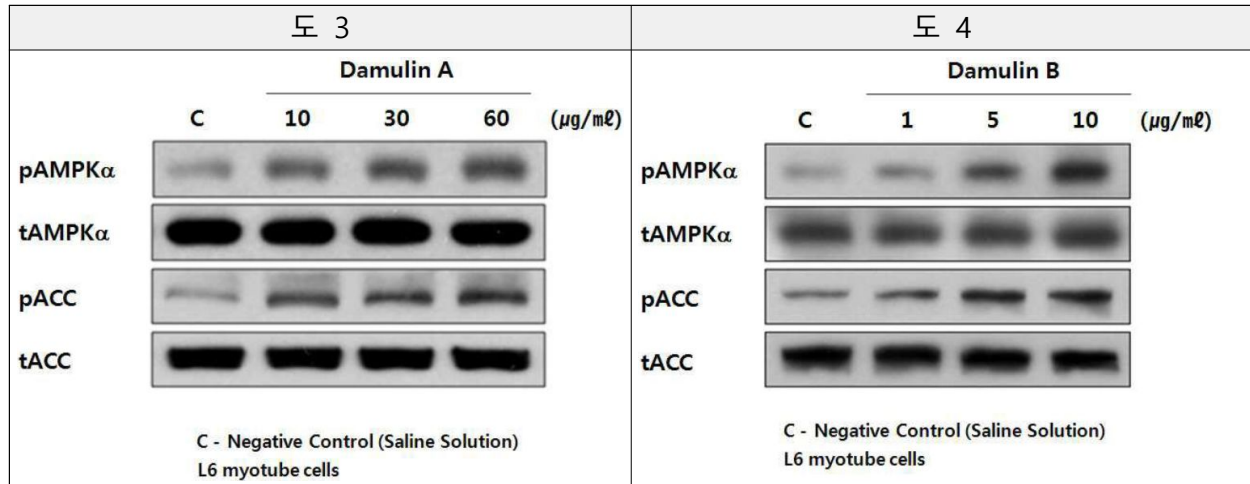
**[0035]** 이들 중 L6 세포에서 AMPK 인산화 증가에 따른 활성화 능력이 가장 높은 B.34-5 분획을 HPLC를 이용해 자외선 측정기(205nm)를 사용하여 다시 물질을 분리하였다. 이를 위해 세미-프리퍼레이티브 칼럼(semi-preparative column, RP-C<sub>18</sub> Package column, 10x250mm, 10 particle size; RS Tech 대한민국)을 사용하였고, 시료의 유속은 분당 2mℓ, 용매는 초기에는 0.1% 포름산(formic acid)이 포함된 75% 메탄올을 사용해 75분 분리 후, 다시 100% 메탄올 용매로 15분 분리하였고 이 결과 14mg의 다물린 A 및 10mg의 다물린 B가 각기 분리되었다.

#### **[0044] <실시례 3. 다물린 A 및 다물린 B의 AMPK와 ACC의 인산화 증가 효과>**

**[0045]** AMPK의 인산화로 일어나는 활성화는 ACC와 HMG-CoA 환원효소에 대해 인산화 증가를 일으켜 이 결과 ACC와 HMG-CoA 환원효소의 활성을 저해한다(Henin, 1995). 이에 따라 AMPK 인산화로 지방산 생합성은 억제되게 되고 미토콘드리아에서 베타 산화가 증가되며, 간 조직에서는 지방 및 콜레스테롤의 합성이 저해된다. AMPK의 활성화는 아미노산 172번의 트레오닌(Threonine) 잔기에 인산화가 증가하였는지 여부로 판단할 수 있다.

**[0047]** 따라서 단일물질로 분리된 다물린 A를 10, 30, 60 $\mu$ g/ml 농도로, 다물린 B는 1, 5, 10 $\mu$ g/ml 농도로 각각 분화된 L6 근육세포(L6 myotube cells)에 2시간씩 처리한 후 AMPK  $\alpha$  서브유닛의 트레오닌-172 잔기 및 ACC 효소 단백질의 79번째 세린(Serine) 잔기의 인산화 증가 정도를 황 등(Hwang et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371, 289-293, 2008)의 방법에 따라 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인하였다. 이 결과 다물린 A 및 다물린 B의 처리로 L6 근육세포 내의 AMPK 및 ACC의 인산화가 대조군에 비해 농도 의존적으로 각각 증가됨을

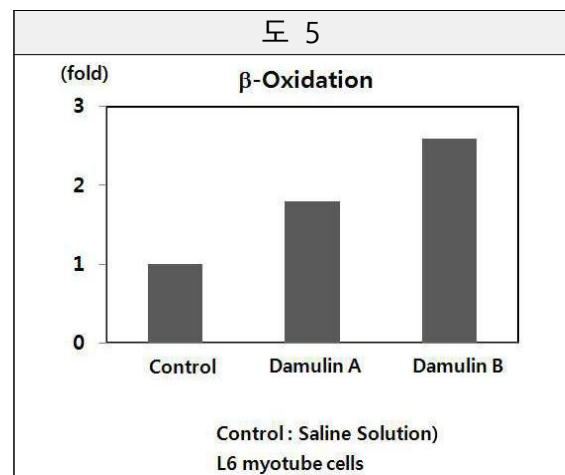
확인하였고(도 3 및 도 4 참조) 다물린 A 및 다물린 B 모두 AMPK의 인산화를 일으켜 활성화되고 ACC는 인산화되어 활성 저해를 일으키는 유효물질임을 확인할 수 있었다.



**[0048] <실시례 4. 다물린 A 및 다물린 B의 지방산 베타 산화 촉진을 통한 지방감소 효과>**

**[0049]** AMPK를 활성화시키면 ACC의 활성이 감소하게 되어 미토콘드리아 내의 말로닐-CoA 농도가 감소하게 된다. 이에 따라 미토콘드리아 내로 지방산 유입이 증가되어 베타 산화가 증가하게 되므로 체지방 감소에 따른 비만 억제 효과가 나타나게 된다. 배양된 L6 근육세포에 순수 분리한 다물린 A와 다물린 B를 처리하여 황 등의 방법(Hwang et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 1253-1258)에 따라 지방산의 베타 산화 증진 효과를 조사하였다.

**[0050]** 이 결과 다물린 A(30μg/ml) 및 다물린 B(5 μg/ml)로 인해 지방산의 베타 산화가 각각 1.8배와 2.6배 증가되는 것이 관찰되었다(도 5). 이 결과를 볼 때, 다물린 A 및 다물린 B는 체지방 감소 촉진을 통한 비만 억제 또는 치료 효능이 높은 물질임을 확인하였다.

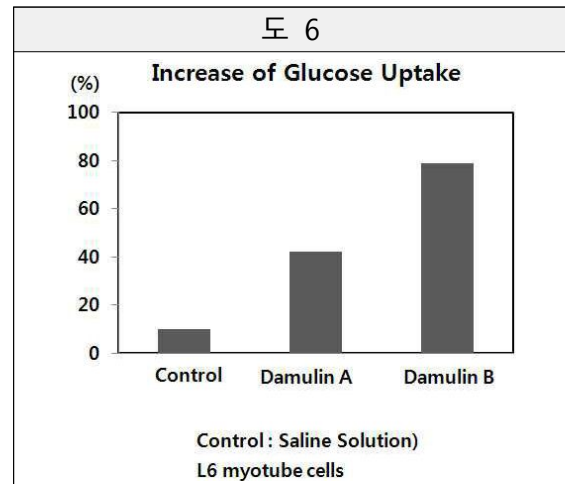


**[0051] <실시례 5. 다물린 A 및 다물린 B의 세포 내 포도당 흡수 촉진 효과>**

**[0052]** AMPK의 활성화는 또한 세포 내로 포도당 흡수가 증가를 일으켜 혈당저하효과를 나타냄이 잘 알려져 있다(Hardie et al., *FEBS Lett.* 546, 113-120, 2003; Carling et al., *Trends. Biochem. Sci.* 29, 18-24, 2004; Kahn et al., *Cell Metab.* 1, 15-25, 2005; Cool et al., *Cell Metab.* 3, 403-416, 2006; Lee et al., *Diabetes*, 55, 2256-2264, 2006; Hwang et al.,

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371, 289-293, 2008). 따라서 다물린 A와 다물린 B를 L6 근육세포에 처리하여 세포 내 포도당 흡수 능력에 대한 영향을 조사하였다.

**[0053]** 배양된 L6 근육세포를 황 등의 방법(Hwang et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 1253-1258)에 따라 고농도의 포도당과 함께, 세포 내에서는 분해가 일어나지 않는 방사선 동위원소인 2-DG(2-deoxy-[<sup>3</sup>H]D-glucose)를 첨가한 후 다물린 A(30 $\mu$ g/ml)와 다물린 B(5 $\mu$ g/ml)로 인한 세포 내 2-DG 흡수 촉진 정도를 조사하였다. 이 결과 다물린 A를 처리한 세포에서는 당 흡수 능력이 평균적으로 42%, 그리고 다물린 B가 처리된 세포에서는 79% 정도 당 흡수가 증가되었다(도 6 참조). 이 결과 다물린 A 및 다물린 B는 모두 혈당 저하를 통한 항당뇨 효과가 우수함을 확인하였다.



**[0054] 실시례 6. 고온 및 고압 처리로 다물린 함량이 증가된 돌외추출물의 제조**

**[0055]** 상기 실시례 4 및 5에서 확인된 바와 같이 신규 화합물인 다물린 A와 다물린 B는 AMPK 활성화 및 이에 따른 ACC 활성 저해를 일으키는 유효물질로 밝혀졌다. 그러나 단순 돌외추출물(TG1022)에는 다물린 A 및 다물린 B의 함량이 유효효과를 나타낼 정도로 높지 않은 편이었다. 따라서 다물린 A 및 다물린 B 함량을 증가시킨 신규 조성의 새로운 돌외추출물(TG1022F)을 제조하였으며 상기 신규 돌외추출물(TG1022F)이 강력한 AMPK 활성화 능력을 갖는 것을 확인할 수 있었다.

**[0056]** 상기 신규 돌외추출물 농축액(TG1022F)은 단순 상온 상압 돌외 에탄올 추출물(TG1022)에 고온 및 고압 반응 혹은 초고압 반응 등을 통해 제조하였다.

**[0057]** 고온고압 반응은 일반적인 고온고압 멸균기(autoclave) 혹은 초고압 반응기(DFS-2L, 동양고압, 일본)를 사용하여 돌외의 단순 추출물 농축액 30ml에 고온고압 조건을 유지하게 하였다.

**[0058]** 신규 돌외추출물 농축액(TG1022F)을 건조시켜 얻어진 건조물 내의 다물린 A 및 다물린 B 함량은 HPLC를 사용하여 분석하였다. 이때, 도 1에서 나타난 순도를 갖는 분리된 다물린 A 및 다물린 B를 표준품으로 사용하여 농도별 정량 표준곡선을 작성하여 시료의 각 피크 면적비로부터 함량을 계산하였다. 이 결과 고온 및 고압 혹은 시간을 달리한 조건에서 신규 돌외추출물 농축액(TG1022F)에서 다물린 A와 다물린 B의 함량은 각각 온도, 압력, 시간 등에



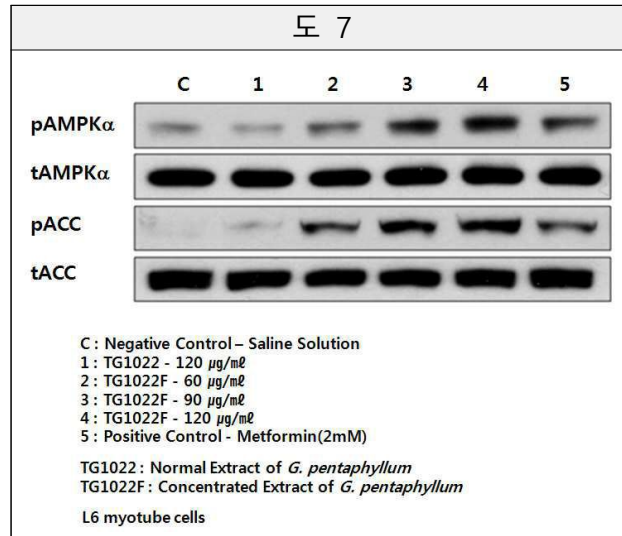
비례해서 증가하였다(표 2). 따라서 본 발명에서는 돌외추출물 농축액을 고온 및 고압을 함께 사용한 처리조건으로 가공하면 처리시간에 비례하여 다물린 A 및 다물린 B의 함량이 월등히 증가된 새로운 돌외추출물 농축액(TG1022F)을 제조할 수 있다. 표 2는 고온, 고압 조건에서 돌외추출물에 포함된 다물린의 함량 증가를 나타내는 도표이다.

표 2				
반응 조건			다물린 함량 % (w/w)	
온도(℃)	시간(Hour)	압력(기압)	다물린 A	다물린 B
대조군 (TG1022)			0.37±0.03	0.28±0.02
121	0.5	1.2	0.70±0.04	0.56±0.04
	1		0.89±0.07	0.68±0.04
	2		1.53±0.06	1.16±0.07
	3		2.01±0.08	1.47±0.08
	4		2.49±0.09	1.81±0.10
	8		3.21±0.03	2.42±0.03
	12		4.51±0.03	4.12±0.02
	24		6.82±0.06	5.54±0.05
45	12	297	0.62±0.03	0.52±0.02
		691	0.83±0.07	0.74±0.07
		1087	1.21±0.06	1.13±0.06
	24	297	0.82±0.02	0.71±0.05
		691	1.22±0.04	0.97±0.03
		1087	1.81±0.06	1.33±0.02

**[0060] <실시례 7. 다물린 함량이 증가된 신규 돌외추출물의 AMPK 및 인산화 증가 효과>**

**[0061]** 실시례 6의 방법으로 제조된 다물린 A 및 다물린 B 함량을 각기 0.89% 및 0.68%로 증가시킨 새로운 조성의 돌외추출물(TG1022F)의 AMPK 신호전달계 활성화 증진 능력에 대한 농도 의존성을 L6 근육세포들에서 조사하였다. 이 결과 도 7에 나타난 바와 같이 단순한 돌외추출물인 TG1022는 120μg/ml 농도로 처리하더라도 비처리 대조군과 유사하게 전혀 AMPK 및 ACC의 인산화를 일으키지 못하였다. 그러나 다물린 A 및 다물린 B 함량이 각기 0.89% 및 0.68%로 증가되도록 제조된 TG1022F는 60μg/ml의 처리농도에서도 AMPK 및 ACC의 인산화를 강하게 촉진시켰으며, 90μg/ml 및 120μg/ml로 처리농도를 증가시켰을 때 농도 의존적으로 AMPK 및 ACC 인산화를 증가시켰다. 특히 고온고압 처리하지 않은 단순한 돌외추출물 농축액인 TG1022(다물린 A 함량 0.37%, 다물린 B 함량 0.28%)와 121℃, 1.2기압, 1시간 반응조건으로 고온고압 처리한 TG1022F(다물린 A 함량 0.89%, 다물린 B 함량 0.68%)를 동일한 농도로 처리하고 이들의 효과를 비교한 결과 다물린 함량을 증가시킨 TG1022F의

AMPK 및 ACC 인산화 능력이 다물린 함량이 증가되지 않은 TG1022에 비해 월등히 우수함을 확인하였다.



[0062] <실시례 8. 비만 동물 모델에서 신규 돌외추출물을 이용한 체중감소 효과>

[0065] 표 3은 비만 생쥐(ob/ob)에서 다물린 A 및 다물린 B 함량이 증가된 새로운 조성의 신규 돌외추출물 TG1022F(다물린 A 함량 0.89%, 다물린 B 함량 0.68%) 투여에 의한 체중감소 효과를 나타내는 도표이다.

표 3		
동물군이 섭취한 추출물	대조군 대비 체중 감소(g)	식이섭취 (g/day)
TG1022 (300mg/kg) (단순 돌외 추출물)	1.04g	5.21 ± 0.451
TG1022F (150mg/kg) (신규 돌외 추출물)	2.54g	5.36 ± 0.45
TG1022F (300mg/kg) (신규 돌외 추출물)	4.58g	5.29 ± 0.52

[0069] <실시례 10. 신규 돌외추출물의 인체 체중 및 허리둘레 감소에 대한 효과>

[0070] 나이가 21살부터 71살 사이의 성인 남자 및 여자들에게 단순한 돌외추출물인 TG1022와 다물린 A 및 다물린 B 함량이 각기 0.89% 및 0.68%로 증가된 TG1022F를 매일 각기 300mg씩 12주 동안 경구 투여하였다. 이때, TG1022는 남녀 각각 10명을 대상으로 경구 투여를 시켰으며, TG1022F도 남녀 각각 10명을 대상으로 경구 투여하였다. 체중은 체중계를 이용하여 측정하였고, 허리둘레는 10번째 갈비뼈 아래와 장골능(iliac crest) 사이 중간 부위의 둘레를 측정하였다.



[0071] 이 결과 표 4에 나타난 바와 같이 다물린 함량이 증가된 TG1022F 투여군에서는 남자와 여자 시험군 모두에서 체중은 각기 평균 4.3kg과 2.1kg씩 감소하였고 허리둘레는 각기 평균 5.4cm 및 5.8cm씩 감소하였다. 반면 TG1022를 투여한 남자와 여자 시험군들에서 체중은 평균 0.6kg 및 0.4kg씩 각기 감소하였고 허리둘레는 평균 0.7cm와 0.8cm씩 감소하였다(표 7). 이 결과에 따라 다물린 A 및 다물린 B 함량을 증가시킨 새로운 조성의 TG1022F는 단순 돌외추출물인 TG1022에 비해 월등히 우수한 체중 및 체지방 감소 효과가 있음을 확인하였다. 표 4는 인체에서 다물린 A 및 다물린 B 함량이 증가된 신규 돌외추출물 TG1022F의 체중 및 허리둘레 감소 효과를 나타내는 도표이다.

표 4			
인체 시험군		체중 감소(kg)	허리둘레 감소(cm)
TG1022 (단순 돌외추출물)	남자	0.6 ± 0.10	0.7 ± 0.21
	여자	0.4 ± 0.07	0.8 ± 0.15
TG1022F (신규 돌외추출물)	남자	4.3 ± 0.27	5.4 ± 0.27
	여자	2.1 ± 0.15	5.8 ± 0.33

[별지 2]

## 1. 선행발명 1 - "인슐린 저항성 증후군 치료"

### 기술분야

[0001] 본 발명은 돌외(*Gynostemma pentaphyllum*) 추출물 또는 가이페노사이드(gypenoside)를 유효성분으로 함유하는 치료학적 조성물에 관한 것이다. 추가적으로, 본 발명은 인슐린 저항성 증후군, 비만 또는 고지혈증의 치료용 조성물의 사용에 관한 것이다.

### 배경기술

[0006] 비만은 2형 당뇨병 및 고수준의 혈중 유리 지방산을 빈번하게 수반하고, 이는 인슐린 신호를 감소시키게 되므로, 체지방을 감소시키는 것은 인슐린 내성 및 2형 당뇨병의 개선에 유익하다. 따라서 신체상 체지방의 어느 부분을 감소시키고 또는 어떻게 감소시키는가는 중요한 관심이 된다. AMPK(AMP-activated protein kinase)의 활성화는  $\beta$ -산화작용을 증가시키는 동시에 체지방 합성을 감소시킬 수 있어 인슐린 저항성을 개선할 수 있다. AMPK 활성화는 ACC(acetyl-CoA carboxylase)를 불활성화시켜, 말로닐-코에이(malonyl-CoA) 생성을 감소시키고, 이로써 지방 생성은 감소시키고  $\beta$ -산화는 증가시킨다(Oh, 2005).  $\beta$ -산화를 하기 위해서는 지방산이 미토콘드리아로 이동되어야 한다. 운반 시스템인 카르니틴 셔틀(carnitine shuttle)은 긴 사슬 지방산이 미토콘드리아 막을 통과할 수 있게 한다. 간 및 근육세포에서 이 운반 시스템은 말로닐-코에이에 의해서 저해된다. 그러므로 AMPK 활성화에 의한 말로닐-코에이 감소는 미토콘드리아로의 지방산의 전달을 증가시키고, 그 결과  $\beta$ -산화는 증가되어, 체지방이 감소하게 된다.

[0011] AMPK를 활성화시키는 화합물들을 비만, 인슐린 저항성 증후군 또는 2형 당뇨병 치료를 위하여 스크리닝 방법(screening method)을 개발하여 탐색하게 되었다. 아시아 지역에서 수백 년 동안 다양한 질환 치료에 안전하게 사용되어 온 천연 식물 재료들이 근육세포에서 AMPK를 활성화시키는지 여부를 검사하였다. 시험된 수천 종의 식물 추출물 중에서, 돌외(*Gynostemma pentaphyllum* Makino) 추출물이 인슐린 저항성 증후군의 치료에 가능한 후보 물질로 선택되었다.

[0012] 돌외는 박과(*Cucurbitaceae*)에 속하는 다년생 식물로서 이 식물의 추출물이 혈중 콜레스테롤을 낮추고, 혈압을 조절하고, 면역력을 강화시키며, 염증 감소, 혈소판 응집 등을 저해할 수도 있는 화합물 또는 활성 성분을 포함하는 것으로 간주하여 민간 치료약으로서 사용되어 왔다. (...) 이 식물 잎 추출물의 주요 구성성분은 가이페노사이드(gypenosides; GP)이며, 이는 담마란계(dammarane-type) 사포닌이다. 최근 류(Liu) 등은 돌외로부터 15종의 담마란계 사포닌을 분리하였다(Liu, 2004). 10종은 이미 이전에 분리된 것이고, 5종은 에폭시 환이 있

는 C-17 측쇄가 함유되어 있는 신규 트리테르페노이드(triterpenoid)이다. 인(Yin) 등은 또한 이 식물로부터 상기 19종의 글리코사이드 중에서 15종의 신규 담마란계 배당체(Glycosides)로 밝혀졌다. 이러한 최근의 신규 화합물 발견에 대한 성공적인 연구 결과는 현대적인 분석 도구들의 발달로 기인하였다. 그러나 상기 신규 배당체의 각각 또는 조합이 임의의 특정한 약리학적 활성을 나타내는지 여부는 아직 밝혀지지 않았다.

**[0013]** 돌외추출물은 인슐린 저항성 증후군에 좋은 효과를 나타냈다. 이러한 상기 돌외추출물 또는 가이페노사이드의 항-인슐린 저항성은 다음과 같은 두 가지 발견에 기초한다. 첫째, 이 추출물은 AMPK 활성을 자극시켜 인슐린-비의존적으로 GLUT4의 세포막으로 이동을 촉진시키는 자극제(stimulator)이다. 두 번째로 이 추출물은 IKK(I-kB kinase 저해제)- $\beta$ 와 JNK(c-Jun N-terminal kinase)의 활성을 억제하여 IRS1의 세린 잔기 인산화를 감소시킨다는 것이다.

#### **발명의 상세한 설명**

**[0014]** 본 발명은 돌외(*Gynostemma pentaphyllum* Makino)로부터 유래된 담마란계 사포닌인 가이페노사이드를 함유하는 생약 추출물의 사용법에 관한 것이다.

**[0015]** 본 발명의 또 다른 일 양태는, 돌외추출물의 제조방법을 제공하는 것이다. 이 제조방법은 상기 식물 구성요소를 추출하고 상기 추출물을 건조함을 포함한다.

**[0021]** 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 가이페노사이드 함량은 0.5-10% 중량을 포함하며, 바람직하게는 10-2000 $\mu$ g/mL를 포함한다.

**[0022]** 본 발명은 또한 치료학적 유효성분의 상기 조성물을 인슐린 저항성 증후군, 비만 또는 고중성지방혈증으로 고통 받는 환자에게 투여함을 포함하는 인슐린 저항성 증후군, 비만 또는 고중성지방혈증을 치료하는 방법에 관한 것이다. 상기 추출물의 양은 10mg 내지 30mg/일 또는 약 0.5mg 내지 5mg/일로 사용 가능하다.

**[0023]** 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 치료학적 유효성분의 상기 조성물로부터 분리되는 가이페노사이드를 인슐린 저항성 증후군, 비만/과체중, 체지방 감소 및 고중성지방혈증으로 고통받는 환자에게 투여함을 포함하는 인슐린 저항성 증후군, 비만/과체중, 체지방 감소 및 고중성지방혈증을 치료하는 방법에 관한 것이다. 상기 조성물의 양은 약 1mg 내지 1000mg/일 또는 10mg 내지 800mg/일로 사용 가능하다.

#### **[0031] [바람직한 구현례의 상세한 설명란]**

**[0035]** 본원에서 정의되는 "GP"는 돌외로부터 추출한 가이페노사이드를 의미한다.

#### **[0041] 추출 조성물 및 제형**

**[0042]** 본 발명의 치료 조성물 중 가이페노사이드의 함량은 약 0.5 내지 10% 중량 또는 0.6 내지 9%, 0.7 내지 8%, 0.8 내지 7%, 0.9 내지 6%, 1 내지 5%, 2 내지 4%이고, 더욱 바람직

하계는 2.1 내지 3.5%, 2.2 내지 3.4%, 2.3 내지 3.3%, 2.4 내지 3.2%, 2.5 내지 3%, 2.6 내지 2.9%, 또는 2.7 내지 2.8% 내의 범위일 수 있다.

[0043] 본 발명 치료용 조성물에서의 가이페노사이드 농도는 10 내지 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 20 내지 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30 내지 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이고, 바람직하게는 100 내지 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$  내의 범위일 수 있다.

#### [0094] 실시례 1. 가이페노사이드 제조방법

[0095] 이 구현례에서는 본 발명은 돌외추출물의 제조방법을 상술한다.

[0096] 상기 제조방법에 있어서, 특정 유형의 항고혈당 활성을 갖는 돌외추출물을 선택하였다. 추출물은 본 발명의 생약 추출물에 기초한 조성물상에 활성 성분을 포함하는 약학적인 활성 화합물을 고농도로 갖는 추출물을 수득하였다.

[0097] 본 발명의 하나의 구현례로서, 상기 방법은 하기의 단계를 포함한다:

[0098] (a) 마쇄된 돌외잎을 수성 알코올(70% 에탄올과 같은)에서 추출하는 단계;

[0099] (b) (a) 단계를 반복하고, 두 번째 수용성 알코올 추출물 용출액을 회수하고, 및 (a), (b) 단계에서 획득한 두 알코올 추출물을 합치는 단계;

[0100] (c) 알코올을 증발시킨 후 상기 용액을 증류수와 추가적으로 혼합하고 여과하는 단계;

[0101] (d) 상기 용액을 1-부탄올(1-BuOH), 물층과 혼합한 후에 1-부탄올을 증발시키는 단계;

[0102] (e) 건조하여 상기 회수된 용출액의 액상 부분을 감소시켜 유기성 물질들을 회수하고, 돌외추출물 분말형태를 제조하는 단계; 및

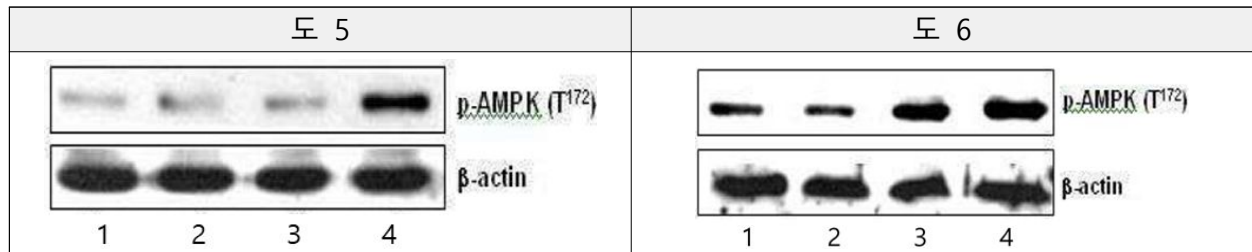
[0103] (f) 필요에 따라서 추가적인 분리 및 정제하는 단계.

#### [0109] 실시례 3. 가이페노사이드의 고농도 또는 유리 지방선에 의해 유도된 인슐린 저항성의 완화(in vitro)

[0110] AMPK는 인산화를 통해 ACC 및 HMG-CoA 환원효소(reductase)를 직접적으로 조절하며 (Henin, 1995), 이는 각각 미토콘드리아에서의  $\beta$ -산화를 증가시키고 간 조직에서의 콜레스테롤 합성을 저해한다. AMP의 유사체인 AICAR(5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole-4-carboxamide)는 AMPK를 활성화시키는 것으로 알려져 있다.

[0111] 상기 실시례 1에서, 가이페노사이드는 세포막으로의 GLUT4 이동을 증진시켰다. 인슐린의 작용 이외에 근육 수축은 AMPK 활성화를 통한 GLUT4 이동을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 가이페노사이드 처리가 AMPK 활성을 활성화시키는지 여부를 확인하기 위해서 L6 미오튜브 세포에 가이페노사이드를 처리하였다. AMPK 활성은 특이적인 항체를 이용하여 AMPK의 172번 트레오닌 잔기에서의 인산화 증가로 평가하였다. AMPK의 인산화는 L6 미오튜브 세포에서 가이페노사이드를 처리한 후 2시간 이내에 나타났고(도 5) 그러한 인산화 수준은 가이페노사이드의 처리시간이 연장되어도 증가되지 않았다. L6 미오튜브 세포는 인슐린 저항성을 유

도하고 AMPK 활성을 억제하기 위해 고농도 포도당(27.5mM)으로 전처리하였다(Itani, 2003). 가이페노사이드의 처리에 따라 트레오닌 잔기에서의 AMPK 인산화가 현저히 증가하였다. 고농도의 가이페노사이드 처리는 AMPK의 더 많은 인산화를 유도하였다. 이 결과는 가이페노사이드가 처리된 인슐린 민감성 세포에서 AMPK 활성이 증가되었음을 의미한다(도 5 및 도 6).



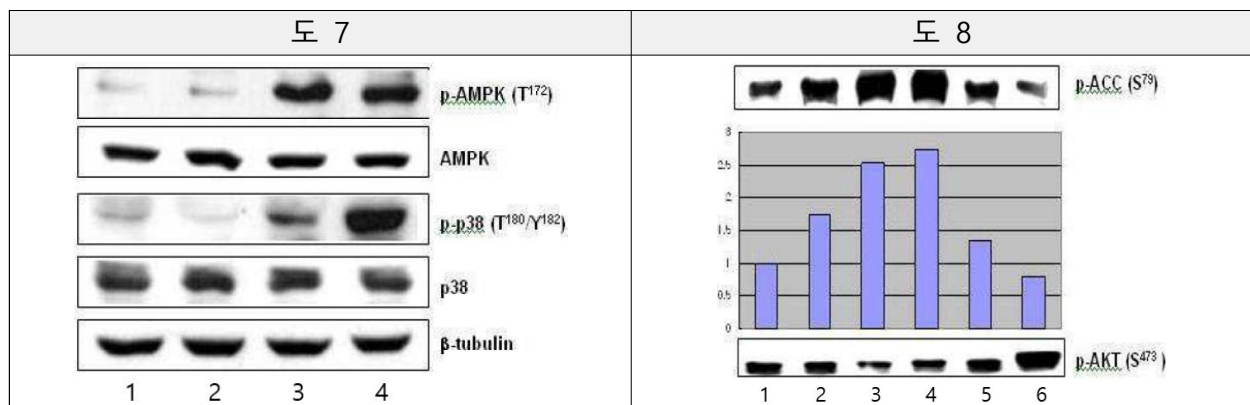
**[0074]** 도 5는 가이페노사이드를 세포에 처리한 시간에 따른 AMPK의 활성도 변화를 나타낸 도면이다. L6 미오투브(myotube) 세포에 가이페노사이드(60μg/ml)를 처리하고 표시된 시간만큼 배양하였다. 이 세포를 용해 버퍼로 용해시킨 후 세포질 단백질을 SDS-PAGE에서 분리 후, 단백질 밴드는 니트로셀룰로오스로 이동되었고 인산화-AMPK는 특이 항체로 분석하였다. (1) 대조군 (2) 가이페노사이드 30분 처리 (3) 가이페노사이드 1시간 처리 (4) 가이페노사이드 2시간 처리군

**[0075]** 도 6은 래트 평활근 세포에 고농도 포도당과 함께 가이페노사이드를 처리한 후 AMPK의 인산화 정도를 측정하였다. (1) 대조군 (2) 고농도(27.5mM) 포도당 처리 (3) 고농도 포도당과 함께 가이페노사이드(10μg/ml) 처리 (4) 고농도 포도당과 함께 가이페노사이드(30 μg/ml) 처리

**[0112]** L6 세포를 낮은 혈청 조건에서 성숙한 근육세포로 분화시켰다. AICAR를 양성 대조군으로 사용하였다. 일단 약물 처리가 종료되면, 세포들을 회수하여 분해시켰고, 개개 처리군으로부터 동량의 단백질 AMPK 및 p38 MAPK 활성 수준을 분석하였다(도 7 참조). AMPK 단백질에 대한 면역 블로팅하였다. 30μg/ml 가이페노사이드 처리군에서는 비처리군과 비교하여 AMPK의 172번째 트레오닌 잔기에서의 인산화 증가가 나타나지 않았다. 그러나 60μg/ml 가이페노사이드 처리군에서는 AMPK의 인산화 수준이 유의적으로 증가하였다. 1mM AICAR에 의한 AMPK 인산화 수준은 60μg/ml 가이페노사이드 처리군의 인산화 정도와 비슷하였다. 가이페노사이드는 공통의 골격구조를 공유하는 유사 화합물들의 혼합물이다. 가이페노사이드는 가이페노사이드 평균 분자량이 약 1000달톤이라고 간주하고 AMPK를 활성화시키는 데 있어서 AICAR보다 더 높은 효능을 나타내는 것처럼 보인다.

**[0114]** AICAR는 골격 근육 조직에서 p38 MAPK를 활성화시키는 것으로 알려졌다(Lemieux, 2003). p38 활성화는 AICAR에 의한 증가된 포도당 흡수와 관련 있음이 증명되었다. 가이페

노사이드가 L6 세포에서 p38 MAPK를 활성화시킬 수 있는지 여부를 조사하였다. AICAR의 처리는 정말로 p38의 활성화를 발취하는 반면에, 가이페노사이드는 p38의 활성을 거의 증가시키지 않았다(도 7). 상기 실시례에서 (도 4) p38 MAPK 활성의 저해제인 SB20358는 가이페노사이드에 의한 GLUT4의 세포막으로 이동 증가를 억제하지 못함이 증명되었다. AMPK(GP>AICAR) 및 p38 MAPK(GP<AICAR)에서 가이페노사이드와 AICAR 간에 나타나는 다른 반응들을 고려하면, 근육세포 GLUT4의 이동을 활성화시키는 가이페노사이드의 분자적 기전은 AICAR의 분자적 기전과 동일하지 않을 수도 있다.



#### [0115] 실시례 4. 가이페노사이드의 ACC에 대한 효과

[0116] ACC는 다양한 조직, 특히 간과 근육 조직에서 지질 대사를 조절하는 중요한 효소이다. 이 효소는 아세틸-코에이를 카복실화시켜 미토콘드리아 외부 막에 있는 CPT-1의 활성을 저해하는 말로닐-코에이(malonyl-CoA)를 생성하게 한다. CPT-1 활성은 미토콘드리아 안에서 지방산 산화의 율속 단계(rate-limiting step)라고 알려졌다(Lehninger, 2000). ACC는 AMPK 키나아제(kinase)의 기질 단백질 중 하나이다(Fryer, 2002). 근육이 수축하면, 근육세포는 지방산의 연소를 통해 더 많은 ATP를 제공하기 위해서 AMPK 활성을 촉진시킨다(Vavvas, 1997). 그러므로 AMPK 활성화에 의한 ACC 불활성화는 지방산을 감소시킬 수 있는 중요한 연구 목표점이 된다.

[0117] L6 미요튜브 세포에 가이페노사이드와 AICAR를 처리하였다. 가이페노사이드 처리는 ACC의 79번째 세린 잔기를 인산화 하였다(도 8). ACC 인산화는 60μg/ml 가이페노사이드에서 최고치에 이르렀다. AICAR 처리는 또한 ACC의 인산화를 증가시켰지만, 30μg/ml 가이페노사이드 처리에서 관찰되는 인산화 정도보다는 약간 적게 나타났다. 인슐린은 인산화에 영향을 미치지 않는다. 이러한 결과는 근육세포에서의 가이페노사이드 처리는 분자수준에서의 근육 수축현상과 흡사하다는 것을 의미한다. AKT(PKB) 인산화는 인슐린의 신호가 PI3K로 전달된다. 근육세포에서의 가이페노사이드 처리가 AKT 활성화에 영향을 미치는지 여부를 조사하였다(도 8). 가이페노사이드 또는 AICAR 모두 AKT 활성화에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다

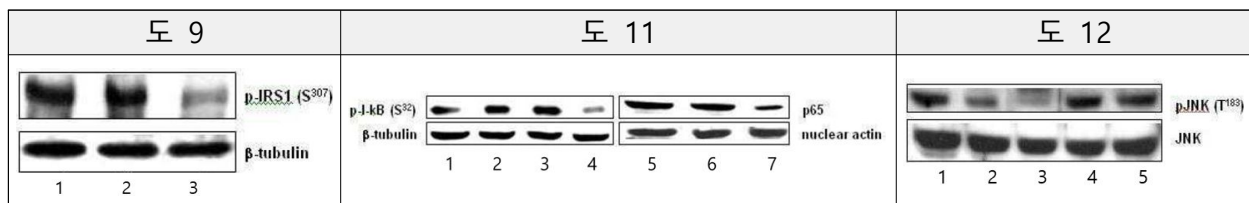
(도 8). 양성 대조군인 인슐린은 AKT의 활성을 상당히 증가시켰다. 이 실험은 가이페노사이드에 의해 자극된 GLUT4의 이동(도 3 및 도 4에 상술된 것처럼)이 인슐린 신호 전달방법과 관련되지 않는 것으로 나타났고 오히려 근육 수축과정과 흡사하다.

**[0118] 실시례 5. 가이페노사이드는 IKK 활성을 억제함으로써 근육세포에서 인슐린 저항성을 감소시킨다.**

**[0120]** 근육세포의 인슐린 저항성에서 대체로 IRS1 307번째 세린 잔기의 인산화가 발견된다. BSA만을 처리한 것과 비교하여, 지방산이 결합된 BSA를 처리한 세포의 IRS1 307번째 세린 잔기의 인산화 정도가 약간 증가하였다. 세포상에서 60 $\mu$ g/ml 가이페노사이드 처리 시 IRS1 307번째 세린 잔기의 인산화 정도를 현저하게 감소시켰다(도 9). IRS1의 307번째 세린 잔기 인산화의 감소는 인슐린 신호분자인 PI3K가 IRS1 쪽으로 접근하기 용이하게 하여 세포가 인슐린에 민감하게 한다. 비록 가이페노사이드가 직접적으로 근육세포에의 인슐린 민감성을 증가시키지는 않지만, 본 발명의 증거는 가이페노사이드가 근육세포에서의 인슐린 저항성을 감소시킬 수 있음을 의미한다.

**[0125]** 가이페노사이드를 10 $\mu$ g/ml 수준으로 처리한 세포에서는 I-kB의 인산화에 영향을 미치지 않았으나, 가이페노사이드를 30 $\mu$ g/ml 수준으로 처리한 세포에서는 I-kB의 인산화가 현저하게 감소하였으며, 이 실험 결과는 IKK 활성이 감소되었음을 의미한다(도 11, 좌측 패널). 또한 가이페노사이드를 30 $\mu$ g/ml 처리한 세포의 핵 분획에서 NF-kB의 함량이 현저하게 감소되었다(도 11, 우측 패널). 이 실험 결과에서 인슐린 저항성이 유발된 세포를 가이페노사이드로 처리하면 IKK의 활성을 억제함으로써 인슐린 저항성을 완화할 수 있음을 밝혀준다.

**[0126]** L6 근육세포를 가이페노사이드 처리한 후 JNK 활성화에 대한 영향에 대하여 실험하였다. 용량-의존적으로, 가이페노사이드는 JNK 활성을 감소시켰다(도 12). AICAR 또는 인슐린을 처리한 세포에서는 JNK 활성화에 변화가 없었다. 이 실험들의 결과를 종합해 보면, 가이페노사이드 처리는 인슐린 저항성의 중요한 생화학적 현상인 IRS 세린 잔기를 인산화하는 IKK $\beta$  and JNK의 활성을 억제하였음을 알 수 있다.



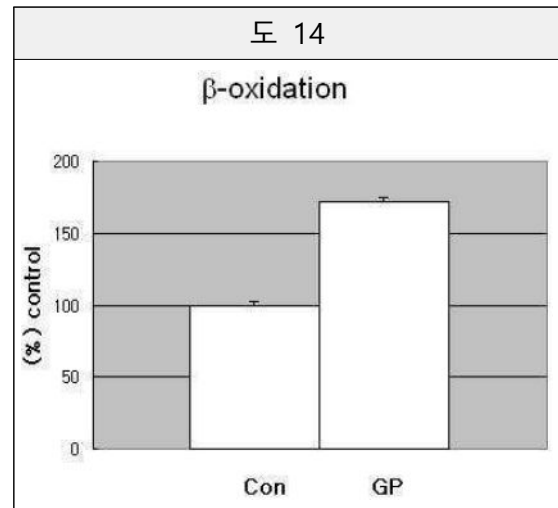
**[0127] 실시례 6. 가이페노사이드(GP)는 AMPK 자극하여 포도당 흡수를 증가시킨다.**

**[0130]** 이타니(Itani et al.)에 의해 보고된 바와 같이, 고농도 포도당은 L6 세포의 디옥시클루코스 유입에 영향을 미치지 않았다(도 13). 가이페노사이드, AICAR 및 인슐린 처리는 각각



평균적으로 24, 42, 40% 정도 2-데옥시글루코스의 세포 유입을 증가시켰다. 이 실험은 가이페노사이드가 근육세포 내로의 포도당 유입을 아마도 AMPK 및/또는 p38 MARK 활성화에 의해서 증가할 수 있음을 나타낸다. 이는 근육세포 내에서 가이페노사이드가 인슐린만큼 포도당 유입을 증가시키나, 다른 기전을 통하여 작용함을 증명해준다.

**[0133]** 상기 실시례들에서, 가이페노사이드는 AMPK를 활성화시키며 ACC 활성을 억제함으로써 가이페노사이드에 의해  $\beta$ -산화를 증가시키는 환경을 조성함을 암시하고 있다. 간암 세포주 HepG2에 가이페노사이드를 처리하여  $\beta$ -산화 속도가 증가하는지 여부를 선행한 기술에 따라 수행하였다(Singh, 1994). 가이페노사이드를 처리한 세포는 처리하지 않은 대조군에 비하여 70%라는  $\beta$ -산화의 현저한 증가를 나타냈다(도 14). 실험 결과, 가이페노사이드가 적정 조건하에서 체지방량을 줄일 수 있음을 확인하였다.



#### **[0134] 실시례 7**

**[0135]** 기능성 렙틴(leptin) 수용체가 결여된 db/db 생쥐를 비만, 고혈당 및 인슐린 저항성 모델로 사용하였다. 생쥐는 일반 사료 식이를 섭취하였다. 가이페노사이드 및 양성 대조군으로 사용된 글루코반스(Glucovance; 임상 승인 의약품)를 명시된 비율로 일반 사료 식이와 미리 섞어 제공하였다. 식이는 임의로(*ad libitum*) 제공되었다. 각 실험군은 생쥐 10마리로 구성되었고 적응기간 동안 채혈하여 혈당을 측정하였다. 경구 투여를 8주간 지속하였다. 희생시키는 시점에서, 글루코반스를 투여한 동물군은 처리하지 않은 그룹에 비해 평균 22% 체중 감소를 보였으며, 가이페노사이드를 투여한 동물군은 12% 체중 감소를 나타냈다(표 1). 그룹 간 식이 섭취량에는 차이가 없었다. 가이페노사이드를 투여한 동물군은 감소된 체중 증가를 보였다.

[표 1]

동물군	체중	체중 (g)
대조군	38.05 $\pm$ 1.61 <sup>a</sup>	4.29 $\pm$ 0.10 <sup>NS</sup>
글루코반스 (0.02%)	29.75 $\pm$ 1.09 <sup>c</sup>	4.32 $\pm$ 0.11 <sup>NS</sup>
가이페노사이드 - 0.01%	33.80 $\pm$ 0.80 <sup>b</sup>	4.59 $\pm$ 0.13 <sup>NS</sup>
가이페노사이드 - 0.02%	33.56 $\pm$ 1.14 <sup>b</sup>	4.27 $\pm$ 0.10 <sup>NS</sup>
<sup>abc</sup> 그룹간 동일하지 않은 문자의 그룹은 유의성을 나타낸다 ( $p < 0.05$ ).		
<sup>NS</sup> 그룹간의 유의성이 없음을 나타낸다 ( $p > 0.05$ ).		



## 2. 선행발명 2

### Development of herbal medicine for anti-obesity:

#### TG1022, an activator of AMP-activated protein kinase reduces body fat mass

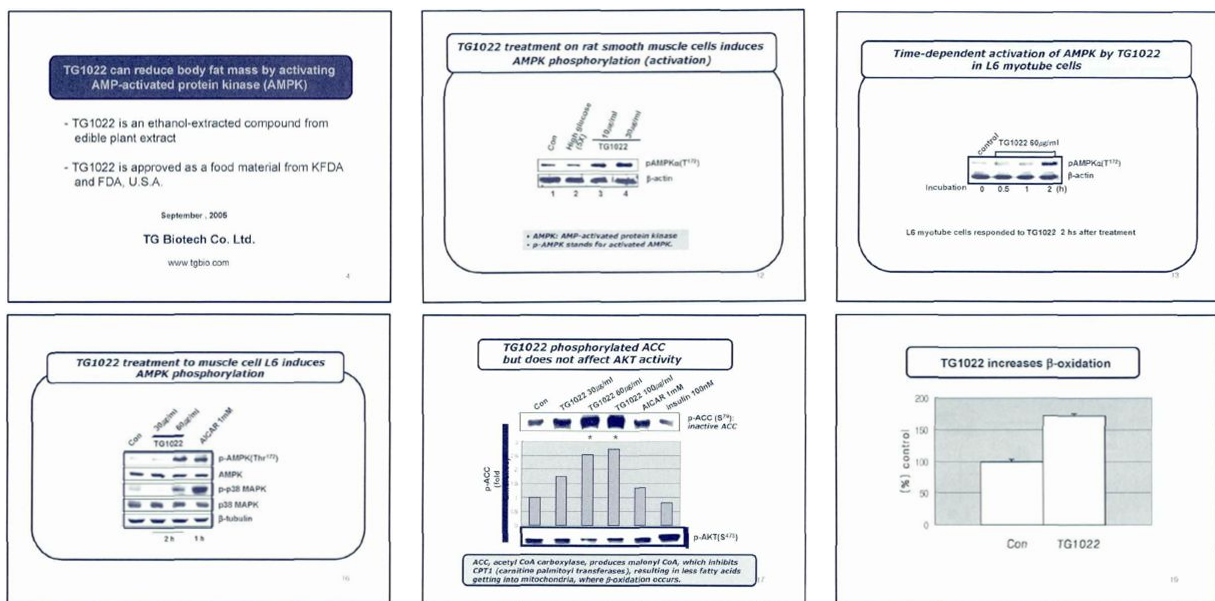
#### 비만 및 당뇨모델을 이용한 비만억제 및 항당뇨 기능성 신물질의 개발

#### 초록

(...)

AMP-활성 단백질 키나아제(AMPK) 활성화는 체지방 감소에 매우 중요하다. AMPK가 활성화되면 아세틸-CoA 카복실화효소(ACC)가 비활성화되고, 그에 따라 말로닐-CoA 생산이 줄어들어 지방 합성은 감소하지만  $\beta$ -산화는 증가시킨다.  $\beta$ -산화를 위해 지방산은 즉시 미토콘드리아로 이동되어야 한다. 긴 사슬 지방산이 미토콘드리아 막을 통과하려면 카르니틴 셔틀이라는 운반 시스템이 필요하다. 간과 근육에서 이 운반시스템은 말로닐-CoA에 의해 억제된다. 따라서 AMPK 활성화로 인한 말로닐-CoA 수치 감소는 미토콘드리아로의 지방산 운반을 자극하고  $\beta$ -산화를 증가시키며 결과적으로 체지방량을 감소시킨다.

우리는 식물 추출물인 TG1022가 L6 근관세포에서 AMPK 활성화를 자극한다는 것을 발견했다. TG1022로 유도된 높은 AMPK 활성은 아세틸-CoA 카복실화효소(ACC1)를 비활성화시켜 미토콘드리아에서  $\beta$ -산화를 촉진시킨다. 여기서 우리는 비만(ob/ob) 마우스와 인간 피험자의 TG1022로 인한 체지방 및 체중 감소 효과에 관하여도 논의한다.



### 3. 선행발명 5 - "돌외 사포닌 Gypenoside V로부터 인삼사포닌 C-K의 생산"

#### I. 서론

(...) 고려인삼(*Panax ginseng* C.A Meyer)은 대표적인 약용식물로 그 효능에 대한 다양한 연구가 보고된 바 있다. 인삼의 주요 약리 성분 중 하나인 인삼 사포닌(ginsenoside)은 triterpenoids계 dammarane type의 구조를 가지고 있으며 다른 식물에서는 거의 찾아볼 수 없는 인삼의 특이적 성분으로 알려져 있다. (...) 최근 들어서는 약효가 더 뛰어난 것으로 알려진 minor 사포닌을 인삼의 major 사포닌의 변환을 통하여 얻어내는 것에 대한 연구가 활발히 진행 중이다. 하지만 고가의 작물인 인삼으로부터 사포닌을 얻어 연구 및 산업에 이용하기에는 상당히 높은 비용을 필요로 한다는 단점이 있다. 따라서 본 연구의 목적은 돌외(*Gynostemma pentaphyllum*)라는 식물로부터 인삼의 사포닌을 생산하는 데 있다. 돌외는 한약재명으로는 칠엽담으로 불리며 우리나라에 자생하는 덩굴성 초본류이다. 특이하게도 돌외는 gypenoside라고 불리는 인삼의 사포닌 성분과 같은 triterpenoid계 dammarane type의 사포닌을 다량으로 함유한 것으로 알려져 있다. 그중에서도 진정 작용을 한다고 알려진(Kita et al., 1981) protopanaxadiol(PPD) 계열이 인삼과 더불어 다량 함유되어 있다(Takemoto et al., 1983). 따라서 돌외에 존재하는 다양한 PPD 계열 사포닌 중 인삼의 사포닌으로 변환 가능성이 있는 돌외 사포닌을 선별한 후 이를 생물학적 전환 방법을 이용하여 돌외 사포닌을 분해하여 고기능성의 minor ginsenoside로 변환시키고자 하였다.

#### II. 연구사

##### 1. 돌외

돌외(*Gynostemma pentaphyllum*)는 박과(Curcubitaceae)에 속하는 다년생 덩굴성 초본류로서(Blumert and Liu, 1999), 예로부터 칠엽담(七葉膽)이라고 하여 주로 전초 또는 지상 부위를 약용으로 이용해 왔다. 돌외에는 다량의 사포닌 성분이 함유되어 있으며 지상부로부터 사포닌을 분리하여 이를 gypenoside라고 명명한 것을 계기로 지금까지 약 100여 종의 사포닌이 분리된 것으로 보고(Table 1)되고 있으며 이러한 돌외의 사포닌은 돌외의 부위, 생육환경, 수확시기 등에 따라 현저한 차이가 있는 것으로 알려져 있다(Valentina et al., 2005).

##### 2. 돌외 사포닌

돌외 사포닌은 식물이 가진 배당체 성분으로 그 구조에 따라 다양하게 나뉜다. 그중에서도 주로 인삼속 식물에 존재하는 triterpenoid dammarane type 사포닌은 다른 식물에서는 거의 함유되어 있지 않다고 알려져 있다. 하지만 돌외는 gypenoside라 불리는 triterpenoid dammarane type 사포닌을 함유하고 있으며 그 종류는 100여 종에 달한다. 돌외 사포닌은 20(S)-dammar-24-ene-3b,19,20triol, 20(S)-dammar-24-ene-3b,12b,19,20tetrol, panaxatriol, 20(S)-

protopanaxadiol, 20(S)-dammar-24-ene-2a,3b,12b,20tetrol 등 다양한 aglycone을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다(Cui et al., 1999). 그중 protopanaxadiol(PPD)는 인삼 사포닌의 대표적인 aglycone으로 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rg3 등이 대표적인 PPD계열 사포닌이다.

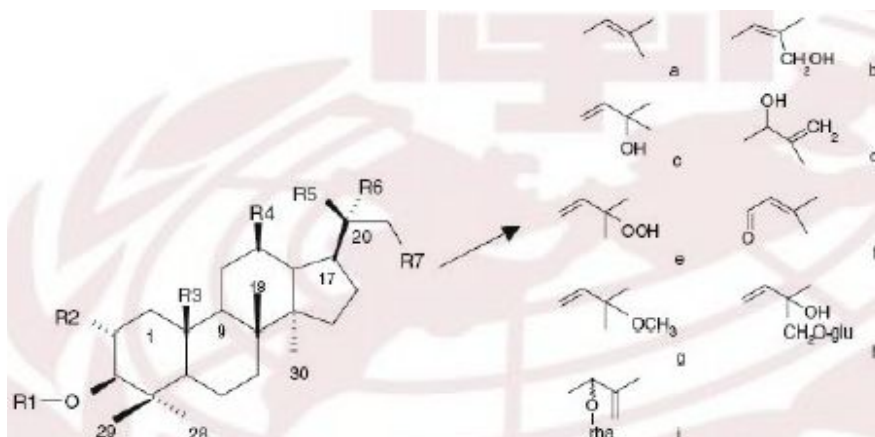


Fig. 1. Dammarane skeleton of *G. penataphyllum* with typical chains.

Table 1. Saponin structures of the dammarane type in *G. penataphyllum*

Gyenoside	Formula	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	References
I	C <sub>60</sub> H <sub>102</sub> O <sub>27</sub>	glu(6→1)rha I	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)rha	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1983a)
II	C <sub>60</sub> H <sub>102</sub> O <sub>26</sub>	(2→1)glu glu(6→1)rha I	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)rha	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1983a)
III	C <sub>54</sub> H <sub>92</sub> O <sub>23</sub>	(2→1)glu glu(2→1)glu	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)glu	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1983a)
IV	C <sub>53</sub> H <sub>90</sub> O <sub>22</sub>	glu(2→1)glu	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	a	Kuwahara et al. (1989)
V	C <sub>54</sub> H <sub>92</sub> O <sub>22</sub>	glu(2→1)glu	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)rha	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1983a)
V 6"-malonyl	C <sub>57</sub> H <sub>94</sub> O <sub>25</sub>	glu(2→1)glu(6→1)mal	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)rha	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1983a)
VI	C <sub>54</sub> H <sub>92</sub> O <sub>21</sub>	glu(6→1)rha I	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1983a)
VII	C <sub>54</sub> H <sub>92</sub> O <sub>21</sub>	(2→1)glu glu(6→1)rha	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)rha	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1983a)
VIII	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>18</sub>	glu	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1983a)
IX	C <sub>47</sub> H <sub>80</sub> O <sub>17</sub>	glu(2→1)glu	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1983a)
X	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>17</sub>	glu	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)rha	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1983a)
XI	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>17</sub>	glu(6→1)mal	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1983a)
XII	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>13</sub>	glu(2→1)glu	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1983a)
XIII	C <sub>41</sub> H <sub>70</sub> O <sub>12</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1983a)
XIV	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>12</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)rha	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1983a)
XV	C <sub>52</sub> H <sub>88</sub> O <sub>21</sub>	Xyl(2→1)glu	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1983b)
XVI	C <sub>53</sub> H <sub>90</sub> O <sub>21</sub>	Xyl(2→1)glu	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)rha	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1983b)
XVII	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>18</sub>	glu	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)glu	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1983b)
XVIII	C <sub>60</sub> H <sub>102</sub> O <sub>27</sub>	glu(6→1)rha I	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)rha	CH <sub>3</sub>	b	Takemoto et al. (1983b)
XIX	C <sub>54</sub> H <sub>92</sub> O <sub>23</sub>	(2→1)glu glu	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)rha	CH <sub>3</sub>	b	Takemoto et al. (1983b)
XX	C <sub>60</sub> H <sub>102</sub> O <sub>28</sub>	glu(6→1)rha I	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)glu	CH <sub>3</sub>	b	Takemoto et al. (1983b)
XXI	C <sub>41</sub> H <sub>70</sub> O <sub>13</sub>	(2→1)glu H	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	b	Takemoto et al. (1983b)
XXII	C <sub>53</sub> H <sub>90</sub> O <sub>23</sub>	glu(2→1)glu	H	CH <sub>2</sub> OH	H	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>2</sub> O	a	Takemoto et al. (1984a)
XXIII	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>19</sub>	glu(2→1)glu	H	CH <sub>2</sub> OH	H	OH	CH <sub>2</sub> -O -glu	a	Takemoto et al. (1984a)
XXIV	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>19</sub>	glu(2→1)glu	H	CHO	H	OH	CH <sub>2</sub> -O	a	Takemoto et al. (1984a)



XXV	C <sub>47</sub> H <sub>78</sub> O <sub>18</sub>	ara(2→1)glu	H	CHO	H	OH	CH <sub>2</sub> -O	a	Takemoto et al. (1984b)
XXVI	C <sub>47</sub> H <sub>78</sub> O <sub>18</sub>	ara(2→1)glu	H	CHO	H	O-glu	CH <sub>2</sub> O	a	Takemoto et al. (1984b)
XXVII	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>13</sub>	glu(2→1)glu	H	CH <sub>2</sub> OH	H	OH	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1984c)
XXVIII	C <sub>42</sub> H <sub>70</sub> O <sub>13</sub>	glu(2→1)glu	H	CHO	H	OH	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1984c)
XXIX	C <sub>41</sub> H <sub>68</sub> O <sub>12</sub>	ara(2→1)glu	H	CHO	H	OH	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1984b)
XXX	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	glu	H	CH <sub>2</sub> OH	H	O-glu	CH <sub>2</sub> O	a	Takemoto et al. (1984a)
XXXI	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	glu(2→1)glu	H	CH <sub>2</sub> OH	H	OH	CH <sub>2</sub> O	a	Takemoto et al. (1984a)
XXXII	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	glu	H	CH <sub>2</sub> OH	H	OH	CH <sub>2</sub> -O	a	Takemoto et al. (1984a)
XXXIII	C <sub>42</sub> H <sub>70</sub> O <sub>14</sub>	glu(2→1)glu	H	CHO	H	OH	CH <sub>2</sub> O	a	Takemoto et al. (1984a)
XXXIV	C <sub>54</sub> H <sub>90</sub> O <sub>23</sub>	glu(2→1)glu	H	CHO	OH	O-glu(6→1)rha	CH <sub>2</sub> O	a	Takemoto et al. (1984b)
XXXV	C <sub>53</sub> H <sub>88</sub> O <sub>23</sub>	glu(2→1)glu	H	CHO	H	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>2</sub> O	a	Takemoto et al. (1984b)
XXXVI	C <sub>53</sub> H <sub>88</sub> O <sub>21</sub>	ara(2→1)glu	H	CHO	H	O-glu(6→1)rha	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1984d)
XXXVII	C <sub>52</sub> H <sub>86</sub> O <sub>21</sub>	ara(2→1)glu	H	CHO	H	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1984d)
XXXVIII	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	glu(2→1)glu	H	CH <sub>2</sub> OH	OH	OH	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1984c)
XXXIX	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	glu(2→1)glu	H	CH <sub>2</sub> OH	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1984c)
XL	C <sub>42</sub> H <sub>70</sub> O <sub>14</sub>	glu(2→1)glu	H	CHO	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1984c)
XLI	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>13</sub>	glu(2→1)glu	H	CH <sub>2</sub> OH	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1984c)
XLII	C <sub>54</sub> H <sub>92</sub> O <sub>24</sub>	glu(2→1)glu	OH	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)glu	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1984e)
XLIII	C <sub>54</sub> H <sub>92</sub> O <sub>23</sub>	glu(2→1)glu	OH	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)rha	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1984e)
XLIV	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>19</sub>	glu	OH	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)glu	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1984e)
XLV	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>18</sub>	glu	OH	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)rha	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1984e)
XLVI	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>19</sub>	glu(2→1)glu	OH	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1984e)
XLVII	C <sub>54</sub> H <sub>92</sub> O <sub>24</sub>	glu(2→1)glu	OH	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)rha	CH <sub>3</sub>	b	Takemoto et al. (1984f)
XLVIII	C <sub>53</sub> H <sub>88</sub> O <sub>22</sub>	ara(3→1)rha I (2→1)glu	H	CHO	H	OH	CH <sub>2</sub> -O -glu	a	Takemoto et al. (1984f)
XLIX	C <sub>52</sub> H <sub>86</sub> O <sub>21</sub>	ara(3→1)rha I (2→1)glu	H	CH <sub>3</sub>	H	OH	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1984f)
L	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	glu(2→1)glu	OH	CH <sub>3</sub>	OH	OH	OH	a	Takemoto et al. (1984f)
L <sub>I</sub>	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	glu(2→1)glu	OH	CHO	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> -O -glu	a	Takemoto et al. (1984f)
LII	C <sub>47</sub> H <sub>78</sub> O <sub>18</sub>	ara(2→1)rha	H	CHO	H	OH	OH	a	Guo et al. (1987) and Zhou (1988)
LIII	C <sub>41</sub> H <sub>68</sub> O <sub>13</sub>	ara(2→1)glu	H	CH <sub>2</sub> OH	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1984d)
LIV	C <sub>41</sub> H <sub>70</sub> O <sub>13</sub>	ara(2→1)glu	H	CH <sub>2</sub> OH	OH	OH	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1984d)
LV	C <sub>47</sub> H <sub>80</sub> O <sub>17</sub>	glu	H	CH <sub>3</sub>	H	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1984c)
LVI	C <sub>53</sub> H <sub>90</sub> O <sub>23</sub>	glu(2→1)glu	OH	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1984b)
LVII	C <sub>47</sub> H <sub>80</sub> O <sub>18</sub>	glu	OH	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1984b)
LVIII	C <sub>52</sub> H <sub>88</sub> O <sub>21</sub>	ara(2→1)glu	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1984b)
LIX	C <sub>41</sub> H <sub>70</sub> O <sub>14</sub>	H	OH	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	b	Takemoto et al. (1984b)
LX	C <sub>41</sub> H <sub>70</sub> O <sub>14</sub>	H	OH	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	c	Takemoto et al. (1984b)
LXI	C <sub>53</sub> H <sub>90</sub> O <sub>24</sub>	glu(2→1)glu	OH	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	b	Yoshikawa et al. (1986)
LXII	C <sub>53</sub> H <sub>90</sub> O <sub>23</sub>	glu(2→1)glu	H	CH <sub>2</sub> OH	OH	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	a	Yoshikawa et al. (1986)
LXIII	C <sub>53</sub> H <sub>90</sub> O <sub>22</sub>	glu(2→1)glu	H	CH <sub>2</sub> OH	H	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	a	Yoshikawa et al. (1986)
LXIV	C <sub>47</sub> H <sub>80</sub> O <sub>18</sub>	glu	H	CH <sub>2</sub> OH	OH	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	a	Yoshikawa et al. (1986)
LXV	C <sub>41</sub> H <sub>70</sub> O <sub>13</sub>	H	H	CH <sub>2</sub> OH	OH	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	a	Yoshikawa et al. (1987a)
LXVI	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>13</sub>	H	H	CH <sub>2</sub> OH	OH	O-glu(6→1)rha	CH <sub>3</sub>	a	Yoshikawa et al. (1987a)
LXVII	C <sub>53</sub> H <sub>90</sub> O <sub>23</sub>	glu(2→1)glu	OH	CH <sub>2</sub> OH	H	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	a	Yoshikawa et al. (1986)
LXVIII	C <sub>53</sub> H <sub>90</sub> O <sub>24</sub>	glu(2→1)glu	OH	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	c	Yoshikawa et al. (1987b)
LXIX	C <sub>53</sub> H <sub>90</sub> O <sub>23</sub>	glu(2→1)glu	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	c	Yoshikawa et al. (1987b)
LXX	C <sub>53</sub> H <sub>90</sub> O <sub>23</sub>	glu(2→1)glu	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	b	Yoshikawa et al. (1987b)
LXXI	C <sub>53</sub> H <sub>90</sub> O <sub>23</sub>	glu(2→1)glu	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	d	Yoshikawa et al. (1987b)
LXXII	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>18</sub>	glu(2→1)glu	H	CH <sub>2</sub> OH	OH	O-glu	CH <sub>3</sub>	a	Yoshikawa et al. (1987a)
LXXIII	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>17</sub>	glu	OH	CH <sub>3</sub>	H	O-glu(6→1)rha	CH <sub>3</sub>	a	Yoshikawa et al. (1987a)
LXXIV	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	H	OH	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)glu	CH <sub>3</sub>	a	Yoshikawa et al. (1987c)

LXXV	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>13</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)glu	CH <sub>3</sub>	a	Yoshikawa et al. (1987c)
LXXVI	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>9</sub>	H	H	CH <sub>2</sub> OH	OH	O-glu	CH <sub>3</sub>	a	Yoshikawa et al. (1987c)
LXXVII	C <sub>41</sub> H <sub>70</sub> O <sub>13</sub>	H	OH	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	a	Yoshikawa et al. (1987c)
LXXVIII	C <sub>41</sub> H <sub>70</sub> O <sub>12</sub>	H	OH	CH <sub>3</sub>	H	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	a	Yoshikawa et al. (1987c)
LXXIX	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>13</sub>	glu	H	CH <sub>2</sub> OH	H	O-glu	CH <sub>3</sub>	a	Yoshikawa et al. (1987a)
Gynos A	C <sub>60</sub> H <sub>102</sub> O <sub>27</sub>	glu(6→1)rha(2→1)glu	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)glu	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1982)
Gynos B	C <sub>60</sub> H <sub>102</sub> O <sub>26</sub>	glu(6→1)rha(2→1)glu	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)rha	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1982)
Gynos F	C <sub>54</sub> H <sub>92</sub> O <sub>22</sub>	glu(6→1)rha(2→1)glu	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1982)
Gynos O	C <sub>60</sub> H <sub>102</sub> O <sub>27</sub>	glu(6→1)rha(2→1)glu	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)rha	CH <sub>3</sub>	b	Takemoto et al. (1982)
Gynos Q	C <sub>52</sub> H <sub>88</sub> O <sub>21</sub>	glu(2→1)xyl	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)xyl	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1982)
Gynos R	C <sub>53</sub> H <sub>90</sub> O <sub>21</sub>	glu(6→1)rha(2→1)glu	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)rha	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1982)
Gynos T	C <sub>60</sub> H <sub>102</sub> O <sub>28</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)glu	CH <sub>3</sub>	b	Takemoto et al. (1982)
Gynos U	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)glu	CH <sub>3</sub>	b	Takemoto et al. (1982)
Gynos TN-1	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>9</sub>	H	OH	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu	CH <sub>3</sub>	a	Nagai et al. (1981)
Gynos TN-2	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>13</sub>	H	OH	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)rha	CH <sub>3</sub>	a	Nagai et al. (1981)
Gynos TR-1	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>10</sub>	H	OH	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu	CH <sub>3</sub>	d	Huang et al. (2005)
XXIII-Eg	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O <sub>4</sub>	H	H	CH <sub>2</sub> OH	H	CH <sub>2</sub> OH	OH	a	Takemoto et al. (1983)
XXVIII-Em	C <sub>35</sub> H <sub>58</sub> O <sub>7</sub>	ara	H	CHO	H	OH	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1983)
XXV-Em	C <sub>35</sub> H <sub>58</sub> O <sub>8</sub>	ara	H	CHO	H	CH <sub>2</sub> OH	OH	a	Takemoto et al. (1983)
XXVII-Em	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>8</sub>	glu	H	CH <sub>2</sub> OH	H	OH	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1983)
I-AH	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>17</sub>	glu(2→1)rha I	H	CH <sub>3</sub>	OH	OH	CH <sub>3</sub>	a	-
I-EH	C <sub>54</sub> H <sub>92</sub> O <sub>22</sub>	(6→1)glu glu(6→1)rha	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu(6→1)glu	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1984b)
Progynos	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>17</sub>	glu(6→1)rha(2→1)glu	H	CH <sub>3</sub>	OH	OH	CH <sub>3</sub>	a	Takemoto et al. (1982)
A-AH									
Progynos O1	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>9</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	OH	O-glu	CH <sub>3</sub>	b	Takemoto et al. (1982)
Gypentonoside A	C <sub>54</sub> H <sub>88</sub> O <sub>21</sub>	glu(2,3,6→1)rha	H	CH <sub>3</sub>	=O	OH	CH <sub>3</sub>	f	Fang and Zeng (1996)
Gymnemaside II	C <sub>48</sub> H <sub>80</sub> O <sub>18</sub>	glu(2→1)glu	H	CH <sub>2</sub> OH	H	O-glu	CH <sub>3</sub>	a	Hu et al. (1996)

### 3. 돌외 사포닌의 전환

사포닌은 구조적으로 당 부분과 비당 부분으로 나뉜다. 인삼과 돌외 사포닌의 당 부분에는 glucose, rhamnose, xylose 등과 같은 당이 결합되어 있다. 사포닌 전환에 관한 연구는 인삼에서 분리한 ginsenoside를 중심으로 다양한 연구가 수행된 바 있다. 특히 인삼의 minor 사포닌의 높은 약리 효능이 보고되면서 인삼의 major 사포닌을 minor 사포닌으로 전환에 관한 연구가 활발하게 진행 중이다. 주로 인삼의 경우 크게 산 처리, 열처리, 효소처리 등을 통한 사포닌 변환 연구가 진행되어 왔으며 최근에는 약산이나 저 농도의 산에 의한 가수분해가 많이 연구되고 있다. Cai 등(2003), Han 등(1982)은 위산의 조건을 참조하여 인삼의 가수분해에 관한 연구를 진행한 바 있고, Bae 등(2004)은 0.1% 또는 1%의 citric acid, acetic acid, lactic acid 등을 이용하여 가수분해를 통해 minor 사포닌 생산에 관한 연구를 수행한 바 있다. 인삼 사포닌은 구조상으로 볼 때 C-3이나 C-6은 secondary carbon 구조이고 C-20은 tertiary carbon 구조를 가졌기 때문에 C-3이나 C-6이 상대적으로 안정하여 C-20의 당 가수분해가 상대적으로 활발히 일어나고 당의 가수분해뿐만 아니라 측쇄 부분의 산화나 고리화 반응 등의 부반응을 통한 부산물이 생성되는 것으로 알려져 있다(Han et al., 1982; Miyamoto et al., 1984). 열에 의한 사포닌 전환은 고온의 열처리 과정을 거치면서 당의 가수분해 반응



에 의하여 minor 사포닌이 생성된다(Kitagawa et al., 1983; Kwon et al., 2001; 박, 2002; Park, 2004). (...)

돌외의 사포닌은 인삼과 매우 유사한 구조를 가지고 있기 때문에 인삼 사포닌과 마찬가지로 열처리, 산 처리, 효소처리 등을 통한 다양한 방법으로 전환이 가능하다.

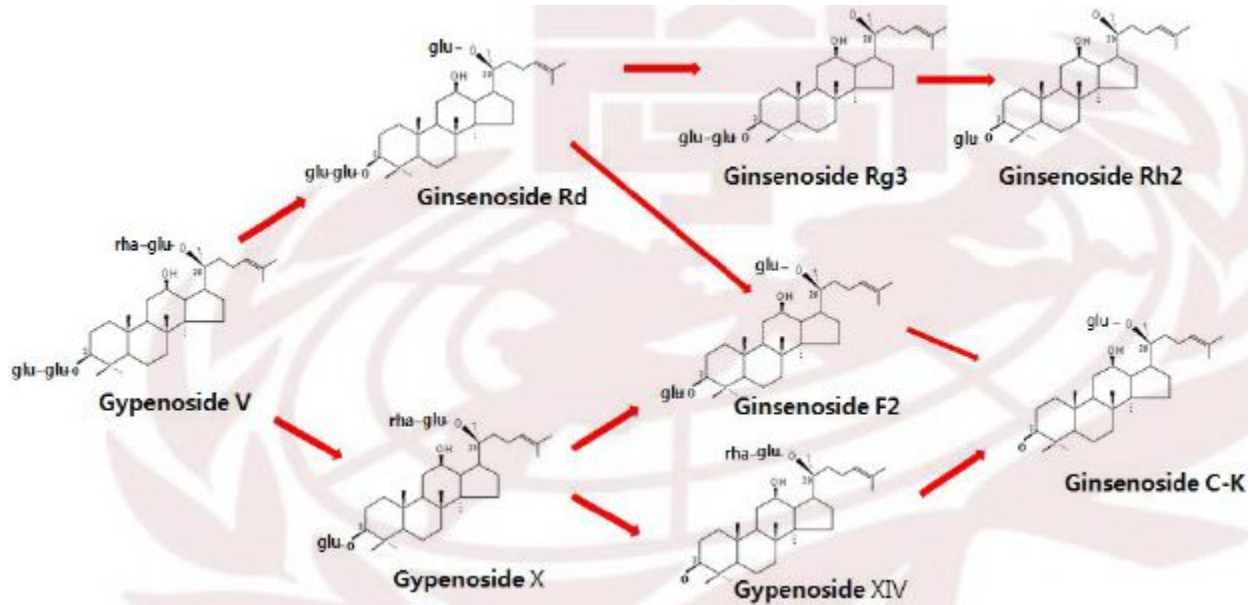


Fig. 4. Transformation pathway of gypenoside V.

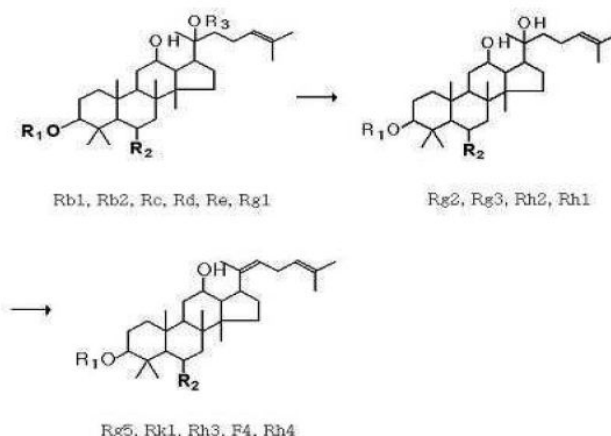
#### 4. 선행발명 6 - "담마란계 화합물을 유효성분으로 포함하는 신장 보호용 약학 조성물"

##### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

[0006] 담마란 화합물은 아래의 기본구조를 갖는 트리테르페노이드 화합물로 자연계에는 인삼속 식물에 주로 존재하는 것으로 알려져 있다. 담마란 화합물을 함유하고 있는 인삼속 식물은 고려인삼(*Panax ginseng*), 화기삼(*Panax quinquefolia*), 전칠삼(삼칠, *Panax notoginseng*), 죽절삼(*Panax japonica*), 삼엽삼(*Panax trifolia*), 히말라야삼(*Panax pseudoginseng*), 베트남삼(*Panax vietnamensis*) 등이 있다(고려삼의 이해, 고려인삼학회, p9, 1995; *Advances in Ginseng Research*, 고려인삼학회, pp127-137, 1998). 담마란 화합물은 인삼속 식물의 특이성분이긴 하지만 인삼속이 아닌 돌외(*Gynostemma pentaphyllum* Makino)에서 발견되기도 한다(Norberg A et al., *J. Biol. Chem.*, 279(40), pp41361-41367, 2004).

[0009] 담마란 화합물은 가열과정 중 글리코실 잔기의 이탈에 의해 Rg2, Rg3, Rh2, Rh1 등이 생성되며 이어서 20번 위치에서 탈수반응이 일어나 Rg5, Rk1, Rh3, F4, Rh4가 생성된다(고려인삼 연구 20년사, 고려인삼학회, p81-84, 1997). (도 1)

도면1



[0011] 현재까지 자연계에서 발견되는 담마란 화합물의 생리활성에 대한 다양한 연구가 진행되어 왔다. 또한, 상기와 같은 방법으로 이러한 화합물의 구조를 변환시키고 변환된 담마란 화합물의 항산화작용, 항암작용, 혈액순환 개선작용 등 생리적 활성이 보고되어 있다. (...)

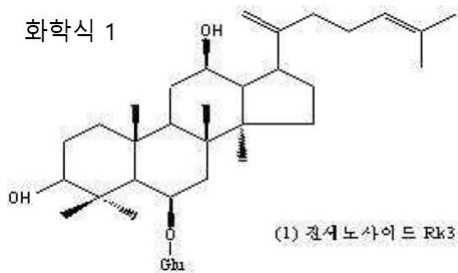
##### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

[0015] 본 발명의 목적은 천연에는 존재하지 않는 담마란 화합물인 진세노사이드(ginsenoside) Rk3, 진세노사이드(ginsenoside) Rh4, PD(Panaxadiol), PT(Panaxatriol), PPD(protopanaxadiol), PPT(protopanaxatriol), DHPPD(Dehydroprotopanaxadiol)-I, DHPPD(dehydroprotopanaxadiol)-II, DHPPT(Dehydroprotopanaxatriol)-I, 또는 DHPPT(Dehydroprotopanaxatriol)-II를 유효성분으로 포함하는 신장 보호용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

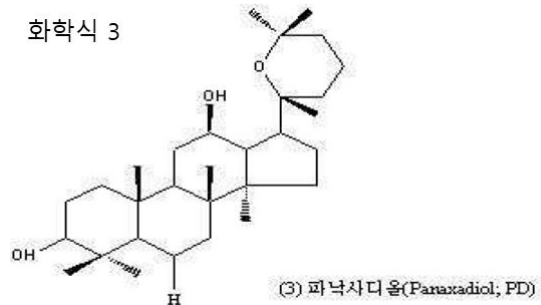
## 발명의 구성 및 작용

[0016] 본 발명은 하기 구조식 (1) 내지 (10)으로 표기되는 진세노사이드(ginsenoside) Rk3, 진세노사이드(ginsenoside) Rh4, PD(Panaxadiol), PT(Panaxatriol), PPD(protopanaxadiol), PPT(protopanaxatriol), DHPPD(Dehydroprotopanaxadiol)-I, DHPPD(dehydroprotopanaxadiol)-II, DHPPT(Dehydroprotopanaxatriol)-I 또는 DHPPT(Dehydroprotopanaxatriol)-II를 유효성분으로 함유하는 신장 보호용 약학 조성물을 제공한다.

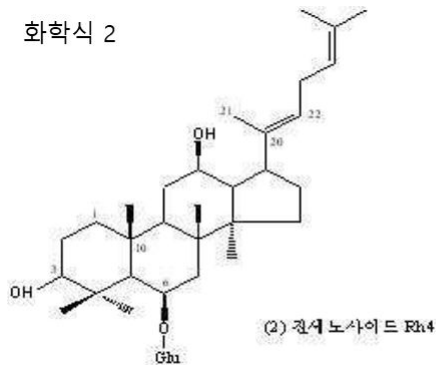
화학식 1



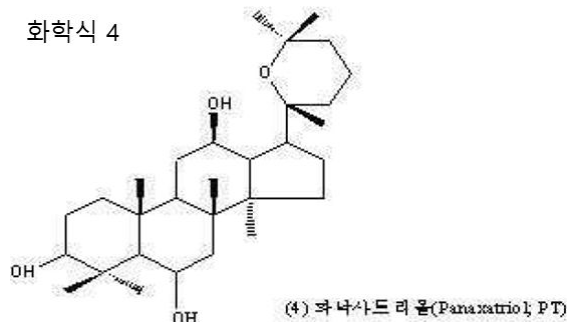
화학식 3



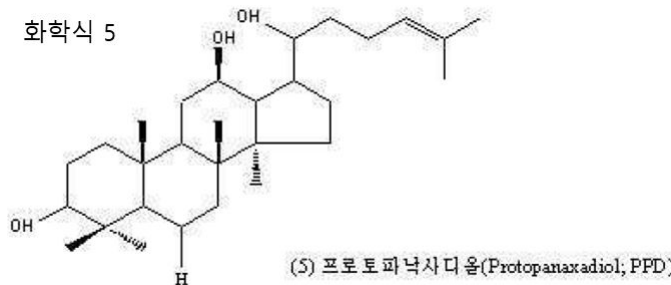
화학식 2



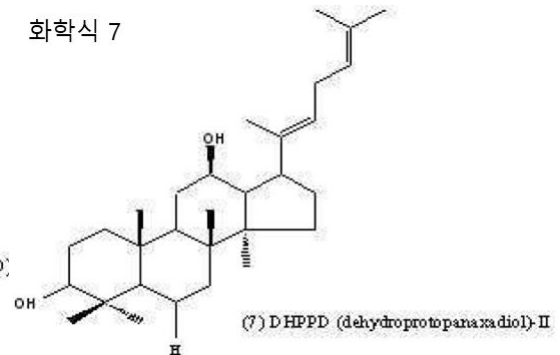
화학식 4



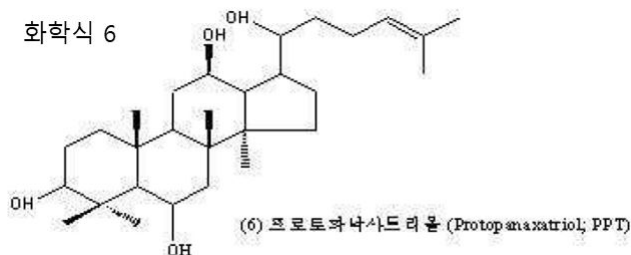
화학식 5



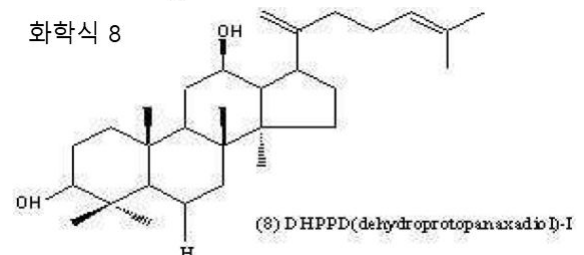
화학식 7



화학식 6

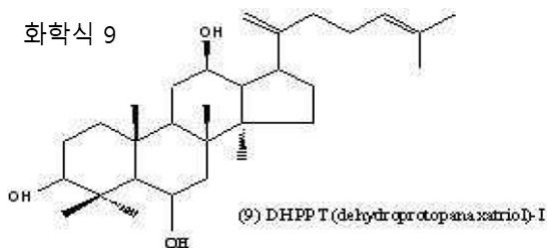


화학식 8

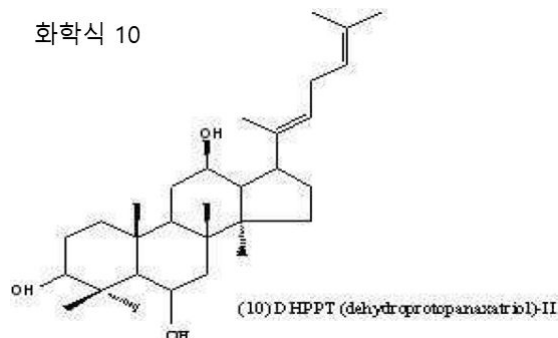




화학식 9



화학식 10



**[0027]** 상기 화합물들은 모두 담마란 골격을 갖고 있으며 아직 자연계에서의 존재는 보고된 바 없으나 자연계에 존재하는 담마란 화합물을 이화학적으로 변형시켜 얻을 수 있다.

**[0028]** 상기 화합물은 고려인삼(*Panax ginseng*), 화기삼(*Panax quinquefolia*), 전칠삼(삼칠, *Panax notoginseng*), 죽절삼(*Panax japonica*), 삼엽삼(*Panax trifolia*), 히말라야삼(*Panax pseudoginseng*), 베트남삼(*Panax vietnamensis*) 또는 돌외(*Gynostemma pentaphyllum* Makino)에서 분리됨을 특징으로 한다.

**[0029]** 상기 화합물은 상기 식물을 추출하여 담마란 화합물을 함유하고 있는 추출물, 추출분획, 부분 정제물, 또는 이로부터 분리된 순수 화합물을 이화학적으로 처리하여 수득할 수 있고, 이들 식물로부터 담마란 화합물을 추출하는 방법은 여러 문헌에 이미 보고가 되어 있으므로 이를 참조하여 추출 분획할 수 있다(고려인삼 연구 20년사, 고려인삼학회, pp75-77, 1997; Norberg A et al., *J. Biol. Chem.*, 279(40), pp41361-41367, 2004).

**[0031]** 상기 화합물은 인삼속 식물을 80~200℃에서 0.5~20시간 동안 가열하여 수득한 가공 인삼 추출물에서 분리됨을 특징으로 한다.

**[0032]** 이하, 담마란 화합물을 수득하는 방법을 상세히 설명한다.

**[0033]** 담마란 화합물을 함유하고 있는 인삼속 식물 또는 돌외를 50 내지 200℃, 바람직하게는 120℃에서 30분 내지 10시간, 바람직하게는 3시간 동안 가열, 가공한 후 저급 알코올 또는 그들의 혼합물로 이루어진 균으로부터 선택되는 용매, 바람직하게는 CH<sub>3</sub>OH을 넣고 환류 추출하여 여과하는 조작을 1회 이상, 바람직하게는 3회 실시하고 여액을 합해 감압농축하여 CH<sub>3</sub>OH 추출물을 수득하고, 수득한 CH<sub>3</sub>OH 추출물을 감압하에서 용매를 건조시키고 잔사를 물에 현탁시켜 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>과 수포화 n-BuOH을 차례로 사용하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획, n-BuOH 분획 그리고 H<sub>2</sub>O 분획으로 나누었으며, 각 분획을 감압하에서 증발 건조하여 각각 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 추출물, n-BuOH 추출물 그리고 H<sub>2</sub>O 추출물을 수득한다.

**갑 제11호증22)**

**3.4. AMPK 활성화제의 추출 및 분리**

말린 돌외잎(5kg)을 50% 에탄올(8ℓ)로 6시간 동안 두 번 추출한 후, 1차 및 2차 상층액을 합치고 거즈로 여과하였고, 30분 동안 원심분리(1500g)하여 불용성 물질을 제거하였다. AMPK를 활성화시키는 화합물을 분리하기 위해, 돌외의 50% 에탄올 추출물을 HP-20 이온 교환 수지 칼럼 크로마토그래피(20×65cm)에 통과시켰다. 각 분획은 물(10ℓ), 50% 메탄올 수용액(10ℓ), 아세톤(10ℓ)으로 순차 용출하여 수집하였다. 그다음 아세톤 분획을 건조하고, 물(2ℓ)에 현탁시킨 후 n-헥산(3×2ℓ), 에틸 아세테이트(3×2ℓ), n-부탄올(3×2ℓ)로 연속적으로 분배하였다. 일부 부탄올 분획(50g)을 실리카겔 칼럼(10×65cm; 63-200 $\mu$ m 입자크기) 크로마토그래피에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O의 구배 용매 시스템(5/1/0.1부터 0/5/0.1까지)을 사용해 통과시켜 5개 분획(B.1-B.5)을 얻었다. (...) 등용매 시스템(0.1% 포름산이 포함된 75% 메탄올을 사용하여 45분간 분리 후 100% 메탄올로 15분)을 사용하는 Gilson HPLC(Optima Pak C<sub>18</sub> 칼럼, 10×250mm, 10 $\mu$ m 입자크기; 205 및 254nm UV 검출기, 유속 2mℓ/min)로 B.34-5 분획(502mg)을 추가로 정제하여 화합물 1(다물린 A, 18mg,  $t_R$ =42분) 및 2(다물린 B, 14mg,  $t_R$ =31.5min)를 분리하였다.

**갑 제12, 19호증23)**

Table 2. Contents of four saponins in heat-processed *G. pentaphyllum*.

Heat processing	Compound ( $\mu$ g/g, mean $\pm$ SD)			
	Gypenoside L	Gypenoside LI	Damulin B	Damulin A
No processing	44.5 $\pm$ 1	18.8 $\pm$ 1.5	34.1 $\pm$ 2.3	213 $\pm$ 3.6
110 °C for 1 h	164 $\pm$ 3.8	67.0 $\pm$ 5.6	169 $\pm$ 6.2	590 $\pm$ 4.4
110 °C for 2 h	268 $\pm$ 4.2	109 $\pm$ 6.1	246 $\pm$ 7.0	714 $\pm$ 5.6
110 °C for 3 h	467 $\pm$ 6.8	194 $\pm$ 6.2	480 $\pm$ 10.6	1517 $\pm$ 10.8
120 °C for 1 h	450 $\pm$ 5.8	207 $\pm$ 7.5	417 $\pm$ 10.4	2109 $\pm$ 16.4
120 °C for 2 h	1129 $\pm$ 11.6	558 $\pm$ 14.9	1060 $\pm$ 11.2	3659 $\pm$ 15.1
120 °C for 3 h	1476 $\pm$ 19.3	1010 $\pm$ 13.1	1335 $\pm$ 10.1	3902 $\pm$ 14.5
130 °C for 1 h	1360 $\pm$ 9.3	1592 $\pm$ 20.7	613 $\pm$ 12.8	3610 $\pm$ 14.4
130 °C for 2 h	2255 $\pm$ 24.1	1841 $\pm$ 24.8	2013 $\pm$ 22.5	7115 $\pm$ 30.2
130 °C for 3 h	6130 $\pm$ 37.7	2463 $\pm$ 22.3	5877 $\pm$ 29.6	11902 $\pm$ 96.3

(인용 주) 열처리하지 않은 경우에도(No processing) 다물린 A, B가 존재하는 것이 확인됨

- 22) Phi Hung Nguyen et al., "New dammarane-type glucosides as potential activators of AMP-activated protein kinase (AMPK) from *Gynostemma pentaphyllum*", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(21), 2011, 6258-6259쪽. 특허권자가 공동저자로, 이 사건 특허발명 실시례 1과 실질적으로 동일한 내용이 개시되어 있다.
- 23) Qian Wu, Moonhee Jang & Xiang-Lan Piao, "Determination by UPLC-MS of four dammarane-type saponins from heat-processed *Gynostemma pentaphyllum*", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(2), 2014, 315쪽.

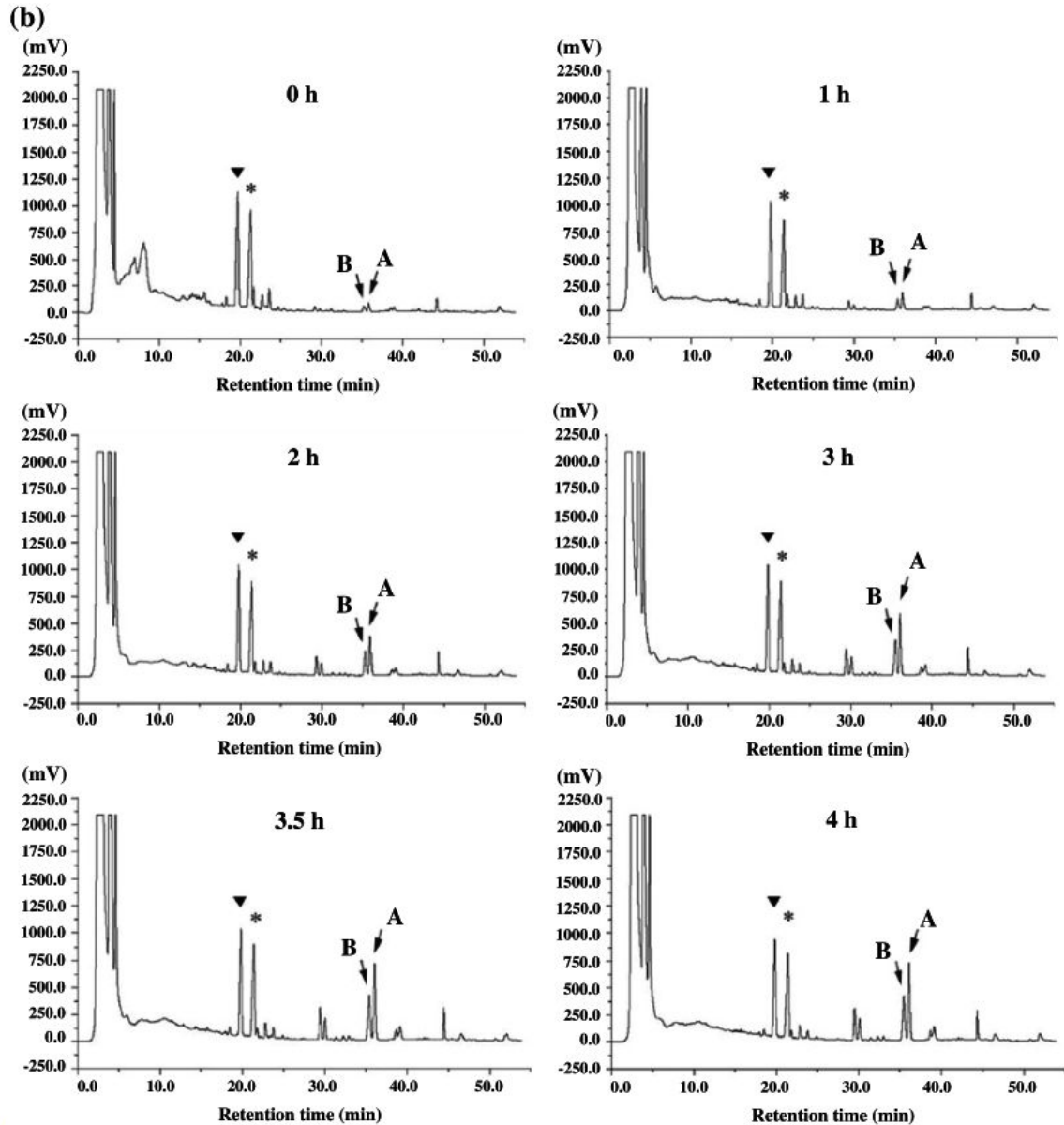


Fig. 1(b) 돌외추출물의 다물린 A(피크 A), B(피크 B) 수준은 오토클레이빙으로 시간 의존적으로 증가되었다. 다물린 A, B 함량을 분석하기 위해 열처리된 돌외추출물(2mg)을 60% 메탄올에 용해시켜 HPLC로 분석하였다. 가이페노사이드 XLVI, LXXVII은 각각 별표와 닫힌 삼각형으로 표시하였다

(인용 주) 오토클레이빙 처리 0시간에도 피크 A, B가 있으므로 단순 돌외추출물에 다물린 A, B가 존재함이 증명되고, 처리시간에 따라 다물린 A, B 함량이 증가하는 것도 확인된다.

24) Rehman Gauhar et al., "Heat-processed *Gynostemma pentaphyllum* extract improves obesity in ob/ob mice by activating AMP-activated protein kinase", *Biotechnology Letters*, 34, 2012, 1610-1611쪽.