



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년09월17일
 (11) 등록번호 10-1440488
 (24) 등록일자 2014년09월04일

- | | |
|--|--|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/336 (2006.01) A61K 31/335 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01) A61P 3/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0062496
(22) 출원일자 2012년06월12일
심사청구일자 2013년02월25일
(65) 공개번호 10-2013-0138944
(43) 공개일자 2013년12월20일
(56) 선행기술조사문헌
충북대학교대학원 석사학위논문, Hypothemycin의 TNF-alpha mRNA 안정성 감소효과. 2012.02. | (73) 특허권자
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
(72) 발명자
강중순
대전광역시 유성구 과학로 125
박기환
대전광역시 유성구 과학로 125
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희 |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 7 항

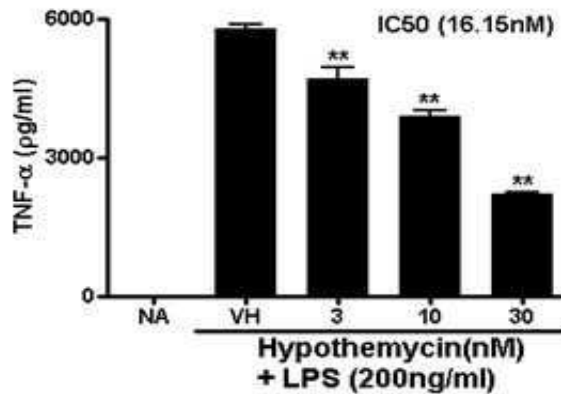
심사관 : 고일영

(54) 발명의 명칭 **하이포테마이신을 유효성분으로 포함하는 대식세포 활성화 증후군, 간경화 또는 비만의 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 하이포테마이신을 유효성분으로 포함하는 대식세포 활성화 증후군, 간경화 또는 비만의 예방 및 치료용 약학적 조성물, 또는 건강식품에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명의 하이포테마이신은 활성화된 대식세포에 의한 TNF- α 생성 및 TNF- α mRNA 발현을 억제하므로, 하이포테마이신을 활성화된 대식세포에 의하여 유도되는 질환인 대식세포 활성화 증후군, 간경화, 또는 비만의 예방 및 치료용 약학적 조성물 또는 건강식품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

이창우

대전광역시 유성구 과학로 125

김형진

대전광역시 유성구 과학로 125

오수진

대전광역시 유성구 과학로 125

윤지은

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A101836-1112-0000100

부처명 보건복지가족부(보건복지부)

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 암, 당뇨/비만 및 관절염 치료제 후보물질 효능/약리 평가를 위한 in vivo animal model
기반 구축

기여율 1.2/2

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2011.04.01 ~ 2012.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KGS4221231

부처명 교육과학기술부

연구사업명 주요사업(연구개발과제)

연구과제명 바이오의약/소재 유효성 평가 및 약동력학 평가 기반구축 및 지원사업

기여율 0.8/2

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

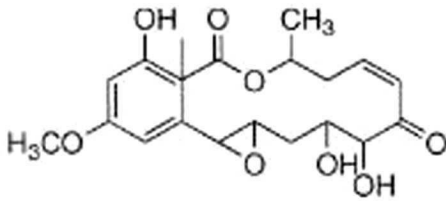
청구항 1

하이포테마이신(hypothemycin)을 유효성분으로 포함하는 간경화 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 하이포테마이신은 하기 화학식 1로 표시되는 것을 특징으로 하는 간경화 예방 및 치료용 약학적 조성물.

<화학식 1>



청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 하이포테마이신은 활성화된 대식세포에 의한 TNF- α 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 간경화 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 하이포테마이신은 활성화된 대식세포에 의한 TNF- α mRNA 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 간경화 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

하이포테마이신을 유효성분으로 포함하는 간경화 예방 및 개선용 식품 조성물.

청구항 8

하이포테마이신을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

하이포테마이신을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 및 개선용 식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 하이포테마이신(hypothemycin)을 이용한 대식세포 활성화 증후군, 간경화 또는 비만의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 대식세포의 활성화와 관련된 질환에는 대식세포 활성화 증후군, 간경화 및 비만등이 있다. 구체적으로, 대식세포 활성화 증후군(Macrophage activation syndrome, MAS)은 급성 발열, 간비장비대, 림프절 종대, 피부 및 점막 출혈, 범혈구감소증과 같은 증상을 나타내는 류마티스형 질환으로 골수, 세망내피 계통에 존재하는 대식세포의 과도한 활성화로 인해 대식세포와 림프구간의 부적절한 상호 작용으로 대식세포 및 T 세포에서 생성되는 다양한 사이토카인, 예를 들어 TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6이 증가되어 발생한다.

[0003] 또한, 간경화(간경변증)은 정상적인 간세포가 반흔 조직으로 대체되어 간의 기능을 수행하는데 방해를 받는 질환이며, 심한 경우 간 손상이 매우 심각해 간 이식을 받아야 하기도 한다. 여러 원인에 의한 만성 간 손상은 공통적으로 간섬유화를 초래하게 되며 그 기전은 다음과 같다. 여러 원인에 의해 간세포가 손상되고, 간 내 대식세포(macrophage)인 쿠퍼 세포(Kupffer cell)가 활성화되어 여러 사이토카인(cytokine)을 분비하게 되면 이에 의해 간성상세포가 활성화되어 결합조직을 생성한다. 간 손상이 지속되게 되면 손상당한 간세포가 결합조직으로 대체되는 간질 복구(stromal repair)가 유발되어 간조직 내 결합조직 과다축적으로 인한 상처(scar)가 형성되고 간세포 손상으로 인해 간기능이 저하되면서 간섬유화 및 간경화가 초래되는 것이다(Rojkind et al ., clinical Hepatology. , 1983; Rubin et al ., Essential pathology ., second, 339-41, 1995). 면역계를 구성하는 세포 가운데 하나인 대식세포를 억제할 경우 간경화(cirrhosis)에 따른 간 손상 과정이 차단될 수 있다는 연구가 있다. 상기와 같은 연구는 아직까지 치료법이 마련되어 있지 못한 간경화의 새로운 치료법 개발에 도움을 줄 것으로 기대되고 있다.

[0004] 아울러, 대식세포와 관련된 질환으로 비만이 있다. 구체적으로, 고지방 식이(High fat diet)를 통한 비만 모델의 지방조직에서 M2 대식세포의 마커 발현이 감소하는 반면, TNF- α 와 같은 M1 대식세포 마커의 발현이 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있다. 그래서 비만이 진행됨에 따라 저지방조직(lean adipose tissue)에서 고지방조직(obese adipose tissue)로 변화될 때, 대부분의 세포 유형이 M2 표현형을 보이는 ATM(adipose tissue macrphage)에서 M1 표현형을 보이는 ATM으로 변화한다는 것을 확인되었다. 또한, M1 대식세포에서 분비되는 TNF- α 등은 인슐린 저항성을 유발하는 효과를 가진다. 따라서 비만 과정에서 대식세포의 수적인 증가 이외에도 M1-M2사이의 표현형 교환이 대식세포 조직 염증과 인슐린 저항성에 중요하다는 가설이 제시되었고, 후속 연구를 통해 이를 확인하였다(Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saliel, J Clin Invest, 117(1), 175-84, 2007).

[0005] 상기와 같이, 대식세포 활성화 증후군, 간경화 및 비만과 같은 질환이 대식세포 활성화와 관련된다는 연구가 있었으나, 하이포테마이신이 대식세포에서 분비하는 TNF- α 의 생성을 억제하고, 이로 인하여 상기 질환에 대한 치료 효과를 밝힌 것은 현재까지 없는 실정이다.

[0006] 이에 본 발명자들은 곰팡이의 일종인 포마 종(Phoma sp.)에서 추출한 하이포테마이신이 활성화된 대식세포에 의한 TNF- α 생성에 대하여 억제 효과를 나타내는 것을 확인하고, 대식세포에 의한 TNF- α 와 관련된 질환인 대식세포 활성화 증후군, 간경화 또는 비만의 치료 또는 예방 조성물로 유용하게 사용할 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 하이포테마이신(hypothemycin)을 유효성분으로 포함하는 대식세포 활성화 증후군, 간경화 또

는 비만의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 목적은 하이포테마이신을 유효성분으로 포함하는 대식세포 활성화 증후군, 간경화 또는 비만의 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하이포테마이신(hypothemycin)을 유효성분으로 포함하는 대식세포 활성화 증후군 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 하이포테마이신을 유효성분으로 포함하는 대식세포 활성화 증후군 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 하이포테마이신을 유효성분으로 포함하는 간경화 예방 및 개선용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 하이포테마이신을 유효성분으로 포함하는 간경화 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 하이포테마이신을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 아울러, 본 발명은 하이포테마이신을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 하이포테마이신(hypothemycin)을 전처리한 경우 활성화된 대식세포에 의한 TNF- α 생성 및 TNF- α mRNA 발현이 억제되므로, 상기 하이포테마이신을 활성화된 대식세포에 의하여 유도되는 질환인 대식세포 활성화 증후군, 간경화 및 비만으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 질환에 대한 예방 및 치료용 약학적 조성물 또는 예방 및 개선용 식품 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 하이포테마이신(hypothemycin)의 세포독성 평가를 나타낸 그래프이다.

도 2는 RAW 264.7 세포에서 하이포테마이신의 리포폴리사카라이드 유도 TNF- α 생성에 대한 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 RAW 264.7 세포에서 하이포테마이신의 리포폴리사카라이드 유도 TNF- α mRNA 발현에 대한 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 RAW 264.7 세포에서 하이포테마이신의 리포폴리사카라이드 유도 산화질소(nitric oxide; NO)생성에 대한 효과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

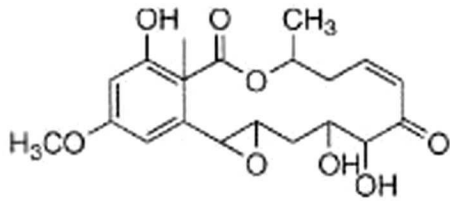
[0018] 본 발명은 하이포테마이신(hypothemycin)을 유효성분으로 포함하는 대식세포 활성화 증후군 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 하이포테마이신을 유효성분으로 포함하는 간경화 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0020] 아울러, 본 발명은 하이포테마이신을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0021] 상기 하이포테마이신은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이다.

[0022] <화학식 1>



[0023]

[0024] 상기 화합물의 일반 화학명은((1aR,3S,4S,9S,15bR,Z)-3,4,12-trihydroxy-14-methoxy-9-methyl-3,4,8,9-tetrahydro-1aH-benzo[c]oxireno[2,3-e][1]oxacyclotetradecine-5,11(2H,15bH)-dione)이다.

[0025]

본 발명에 따른 하이포테마이신 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설포산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부탄-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[0026]

본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 하이포테마이신 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0027]

또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속 염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은 염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0028]

본 발명에 따른 하이포테마이신 화합물은 이의 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 이의 이성질체 또는 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물 또는 수화물을 모두 포함한다.

[0029]

또한, 본 발명에 따른 하이포테마이신 화합물은 시판되는 것을 사용하거나 유기합성분야에서 알려진 통상의 합성방법을 이용하여 합성된 것을 사용할 수 있다.

[0030]

상기 하이포테마이신은 활성화된 대식세포에 의한 TNF-α 생성을 억제할 수 있다.

[0031]

상기 하이포테마이신은 활성화된 대식세포에 의한 TNF-α mRNA 발현을 억제할 수 있다.

[0032]

상기 활성화된 대식세포에 의한 TNF-α 생성 및 TNF-α mRNA 발현을 억제할 수 있는 하이포테마이신은 1 μM 내지 100 μM 농도가 바람직하고, 1 μM 내지 50 μM이 더욱 바람직하고, 3 μM 내지 50 μM이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0033]

상기 활성화된 대식세포는 리포폴리사카라이드(Lipopolysaccharide; LPS), IFN-γ, IL-4 또는 GM-CSF 등에 의하여 활성화되는 것일 수 있고, 구체적으로 리포폴리사카라이드에 의하여 활성화되는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0034]

본 발명의 구체적인 실시예에 있어서, 마우스 대식세포주인 RAW 264.7(TIB-71, ATCC) 세포에 하이포테마이신을

3, 10, 30, 100 및 300 nM의 넓은 범위의 농도로 1시간 동안 전처리를 한 후 리포폴리사카라이드를 처리하여 배양하여 세포 증식 키트 II(Roche Applied Science)을 사용하여 세포 독성을 측정된 결과 하이포테마이신이 100 nM까지는 특별한 세포독성을 유발하지 않았음을 확인하였다(도 1).

[0035] 상기 RAW 264.7 세포에 하이포테마이신을 3, 10과 30 nM로 1시간 동안 전처리 후 리포폴리사카라이드(Lipopolysaccharide; LPS)를 처리하여 상등액을 ELISA 키트(R&D systems INC.)을 이용하여 TNF- α 의 정도를 측정된 결과, 하이포테마이신이 3 μ M, 10 μ M 및 30 μ M에서 TNF- α 의 생성을 통계적으로 유의하게 억제하는 것을 확인하였다(도 2).

[0036] RAW 264.7 세포를 배양 후 하이포테마이신을 전처리 한 후 리포폴리사카라이드를 처리한 RAW 264.7 세포로부터 추출한 RNA를 qRT-PCR 법을 이용하여 mRNA 발현량을 확인 한 결과 10 μ M 및 30 μ M에서 TNF- α mRNA의 발현을 통계적으로 유의하게 억제함을 확인하였다(도 3).

[0037] 아울러, RAW 264.7 세포를 배양하고, 하이포테마이신을 전처리 한 후 리포폴리사카라이드를 처리한 RAW 264.7 세포의 경우 TNF- α 의 경우와는 다르게 30 μ M까지 NO의 생성을 억제하지 못함을 확인하였다(도 4).

[0038] 따라서, 본 발명의 하이포테마이신을 전처리한 경우 활성화된 대식세포에 의한 TNF- α 생성 및 TNF- α mRNA 발현이 억제되므로, 하이포테마이신을 활성화된 대식세포에 의하여 유도되는 질환인 대식세포 활성화 증후군, 간경화 및 비만으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 질환에 대한 예방 및 치료용 약학적 조성물 또는 예방 및 개선용 식품 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용할 수 있다.

[0039] 본 발명의 하이포테마이신은 임상투여시 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

[0040] 본 발명의 하이포테마이신은 실제의 비경구의 여러가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 리우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명의 하이포테마이신은 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 텍스트란과 같은 카보하이드레이트, 아스코르브 산(ascorbic acid) 또는 글루타치온과 같은 황산화제(antioxidants), 킬레이트화제(chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.

[0042] 본 발명의 하이포테마이신의 유효용량은 0.0001 내지 100 mg/kg 이고, 바람직하게는 0.01 내지는 10 mg/kg 이며, 하루 1 회 내지 3 회 투여될 수 있다.

[0043] 본 발명의 약학적 조성물에서 본 발명의 하이포테마이신의 총 유효량은 볼루스(bolus) 형태 혹은 상대적으로 짧은 기간 동안 주입(infusion) 등에 의해 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)이 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기 농도는 약의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 나이 및 건강상태 등 다양한 요인들을 고려하여 환자의 유효 투여량이 결정되는 것이므로 이러한 점을 고려할 때, 이 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 하이포테마이신의 약학적 조성물로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다.

[0044] 또한, 본 발명은 하이포테마이신을 유효성분으로 포함하는 대식세포 활성화 증후군 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다.

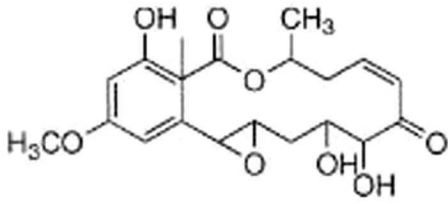
[0045] 또한, 본 발명은 하이포테마이신을 유효성분으로 포함하는 간경화 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0046] 아울러, 본 발명은 하이포테마이신을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0047] 상기 식품 조성물은 건강식품일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0048] 상기 하이포테마이신은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이다.

[0049] <화학식 1>



[0050]

[0051] 상기 화합물의 일반 화학명은((1aR,3S,4S,9S,15bR,Z)-3,4,12-trihydroxy-14-methoxy-9-methyl-3,4,8,9-tetrahydro-1aH-benzo[c]oxireno[2,3-e][1]oxacyclotetradecine-5,11(2H,15bH)-dione)이다.

[0052] 상기 식품 조성물의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강 기능식품을 모두 포함한다.

[0053] 본 발명의 하이포테마이신을 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강기능식품 중의 상기 하이포테마이신의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0054] 본 발명의 하이포테마이신을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 발효물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 g 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0055] 상기 외에 본 발명의 하이포테마이신은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 하이포테마이신은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 하이포테마이신은 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0056] 이하, 실시예 및 제조예에 의하여 본 발명을 상세히 설명한다.

[0057] 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 제조예에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

[0058] **마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포배양**

[0059] RAW 264.7 세포를 배양하기 위하여 하기와 같이 실시하였다.

[0060] 구체적으로, 본 발명에 사용한 세포주는 마우스 대식세포주인 RAW 264.7(TIB-71, ATCC) 세포이며 이 세포의 배

양에는 10% 소태아혈청(fetal bovine serum), 100 U/ml의 페니실린(penicilin) 및 100 µg/ml의 스트렙토마이신(streptomycin)이 포함된 DME 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)(Invitrogen Life Technologies)을 이용하였다. 모든 세포를 37°C, 95% 습윤한 공기/5% CO₂ 인큐베이터(incubator)에서 배양하였으며 2~3일마다 새로운 배양액으로 계대배양하여 세포를 유지하였다.

실시예 2

[0061] 하이포테마이신의 세포독성 평가

[0062] 하이포테마이신의 세포독성을 평가하기 위하여 하기와 같이 실시하였다.

[0063] 구체적으로, RAW 264.7 세포를 5×10^5 cells/ml의 농도로 96-웰 마이크로플레이트(마이크로플레이트)에 200 µl/웰로 분주하고 하이포테마이신(Enzo Life Sciences, Catalogue #: ALX-380-116-M001)을 3, 10, 30, 100 및 300 nM의 넓은 범위의 농도로 1시간 동안 전처리를 한 후 200 ng/ml의 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포독성의 평가는 세포 증식 키트 II(Roche Applied Science)을 사용하여 수행하였으며 1 mg/ml의 소듐 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate와 0.0383 mg/ml의 N-methyldibenzopyrazine methyl sulfate를 50:1로 희석하여 XTT 표지(labeling) 혼합물을 만들었다. 배양액을 50µl를 제거한 후 XTT 표지 혼합물을 각 웰에 50 µl씩 첨가하여 1시간 동안 방치한 후 490 nm(참조 파장, 650 nm)에서 흡광도를 측정하였다.

[0064] 하이포테마이신이 유발하는 세포 독성 정도를 확인한 결과, 하이포테마이신 100 nM까지는 특별한 세포독성을 유발하지 않았음을 확인하였다(도 1).

실시예 3

[0065] 하이포테마이신의 리포폴리사카라이드 유도 TNF-α 생성 억제 효과 측정

[0066] 하이포테마이신의 활성화된 대식세포에 의한 TNF-α 생성 억제 효과를 측정하기 위하여 하기와 같이 실시하였다.

[0067] 구체적으로, 상기 <실시예 1>로부터 배양한 RAW 264.7 세포를 5×10^5 cells/ml의 농도로 96-웰 마이크로플레이트에 200 µl/웰로 분주하고 안정화 후에 하이포테마이신을 3, 10과 30 nM로 1시간 동안 전처리 후 리포폴리사카라이드(Lipopolysaccharide; LPS)를 6시간 처리하여 상등액을 TNF-α 측정에 이용하였다. TNF-α의 측정은 ELISA 키트(R&D systems INC.)을 이용하여 제조사에서 권장하는 방법에 따라 수행하였다. 하이포테마이신은 Enzo Life Sciences(Catalogue #: ALX-380-116-M001)로부터 구입하여 사용하였다.

[0068] 그 결과, RAW 264.7 세포가 활성화되었을 때 TNF-α의 생성이 크게 증가한 반면, 하이포테마이신을 전처리를 한 경우 세포독성을 유발하지 않는 농도인 3 µM, 10 µM 및 30 µM에서 TNF-α의 생성을 통계적으로 유의하게 억제함을 확인하였다(도 2).

실시예 4

[0069] 하이포테마이신의 리포폴리사카라이드 유도 TNF-α mRNA 발현 억제 효과 측정

[0070] 하이포테마이신의 활성화된 대식세포에 의한 TNF-α mRNA 발현 억제 효과를 측정하기 위하여 하기와 같이 실시하였다.

[0071] 구체적으로, RNA 획득을 위해 6-웰 조직 배양 플레이트에 5×10^5 cells/ml의 농도로 RAW 264.7 세포를 배양하여 각 실험 조건에 맞추어 실험을 하였다. 배양이 끝난 후 4°C에 보관된 PBS로 세척한 후 스크레이퍼(scraper)를 이용해서 세포를 모았으며, 이를 1,200 rpm, 4°C에서 2분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 펠릿(pellet)을 얻었다. 총 RNA는 RNeasy Plus Mini 키트(Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 제조사가 제공한 실험법에 따라 추출하였다. DEPC-DW로 녹인 RNA는 A260/280 비율(Versa Max 마이크로플레이트 리더, Molecular Devices)

로 흡광도를 측정해 순도와 농도를 확인하였다. 전사된 mRNA의 발현량 확인을 위해 qRT-PCR 법을 이용하였다. 동량의 RNA를 oligo(dt)₁₅ 프라이머를 이용해 cDNA로 합성한 후 Power SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems)시약과 7500 Fast 실시간 PCR 시스템(Applied Biosystems) PCR 기기를 이용하여 제공된 실험방법에 따라 실험하였다. 유전자 증폭을 위해 50℃로 20초 95℃로 10분간 샘플을 가열하고 95℃로 15초 56℃로 30초 72℃로 1분간 45번 반복하였다. 결과는 $\Delta\Delta C_t$ 법을 이용하여 나이브(naive)에 대한 실험군의 증폭 비율로 표현하였다. 실험에 사용한 프라이머의 서열은 다음과 같다. 마우스 TNF- α : 센스 서열 5' -CCT GTA GCC CAC GTC GTA GC-3' , 안티센스 서열 5' -TTG ACC TCA GCG CTG AGT TG-3; 마우스 β -actin: 센스서열 5' -TGG AAT CCT GTGGCA TCC ATG AAA C-3' , 안티센스 서열 5' -TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3' 이다.

[0072] 그 결과, RAW 264.7 세포가 활성화되었을 때 TNF- α mRNA의 발현이 크게 증가한 반면, 하이포테마이신을 전처리를 한 경우 세포독성을 유발하지 않는 농도인 10 μ M 및 30 μ M에서 TNF- α mRNA의 발현을 통계적으로 유의하게 억제함을 확인하였다(도 3).

실시예 5

[0073] **하이포테마이신의 리포폴리사카라이드 유도 산화질소(nitric oxide; NO) 생성에 대한 효과 측정**

[0074] 하이포테마이신의 리포폴리사카라이드 유도 산화질소(nitric oxide; NO) 생성에 대한 효과를 측정하기 위하여 하기와 같이 실시하였다.

[0075] 구체적으로, RAW 264.7 세포를 5 x 10⁵ cells/ml의 농도로 96-웰 마이크로플레이트에 200 μ l/웰로 분주하고 안정화 후에 하이포테마이신을 3, 10 및 30 nM로 1시간 동안 전처리를 후 리포폴리사카라이드를 24시간 처리하였다. 새로운 96-웰 마이크로플레이트에 배양액 50 μ l와 동량의 그리스 시약(DW 내 1% 설과닐아미드와 0.1% 나프틸에틸렌 디아미드를 포함한 2%(v/v) 인산)를 분주하여 실온에서 반응한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0076] 그 결과, RAW 264.7 세포가 활성화되었을 때 TNF- α 와 마찬가지로 NO의 생성이 크게 증가하였으나, 하이포테마이신을 전처리를 한 경우 TNF- α 의 경우와는 다르게 30 μ M까지 NO의 생성을 억제하지 못함을 확인하였다(도 4).

[0077] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 예시한다.

[0078] **<제조예 1> 약학적 제제의 제조**

[0079] **<1-1> 산제의 제조**

[0080] 본 발명의 하이포테마이신 20 mg

[0081] 유당 20 mg

[0082] 상기의 성분을 혼합한 후, 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0083] **<1-2> 정제의 제조**

[0084] 본 발명의 하이포테마이신 10 mg

[0085] 옥수수전분 100 mg

[0086] 유당 100 mg

[0087] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0088] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0089] <1-3> 캡슐제의 제조

[0090]	본 발명의 하이포테마이신	10 mg
[0091]	결정성 셀룰로오스	3 mg
[0092]	락토오스	14.8 mg
[0093]	스테아린산 마그네슘	0.2 mg

[0094] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0095] <1-4> 액제의 제조

[0096]	본 발명의 하이포테마이신	20 mg
[0097]	이성화당	10 g
[0098]	만니톨	5 g
[0099]	정제수	적량

[0100] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0101] <1-5> 주사제의 제조

[0102]	본 발명의 하이포테마이신	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
[0103]	묾은 염산 BP	pH 7.6로 될 때까지
[0104]	주이용 염화나트륨 BP	최대 1 ml

[0105] 적당한 용적의 주이용 염화나트륨 BP 중에 본 발명의 하이포테마이신을 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 묾은 염산 BP를 이용하여 pH 7.6로 조절하고, 주이용 염화나트륨 BP를 이용하여 용적을 조절하고 충분히 혼합하였다. 용액을 투명 유리로 된 5 ml 타입 I 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자하에 봉입시키고, 120°C에서 15 분 이상 오토클레이브시켜 살균하여 주사액제를 제조하였다.

[0106] <1-6> 환의 제조

[0107]	본 발명의 하이포테마이신	1 g
[0108]	유당	1.5 g
[0109]	글리세린	1 g
[0110]	자일리톨	0.5 g

[0111] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0112] <1-7> 과립의 제조

[0113]	본 발명의 하이포테마이신	150 mg
[0114]	대두 추출물	50 mg
[0115]	포도당	200 mg
[0116]	전분	600 mg

[0117] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.

[0118] <제조예 2> 식품의 제조

[0119] 본 발명의 하이포테마이신을 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.

[0120] <2-1> 밀가루 식품의 제조

[0121] 본 발명의 하이포테마이신 0.5 ~ 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 대식세포 활성화 증후군, 간경화 및 비만의 예방 및 치료용 건강식품을 제조하였다.

[0122] <2-2> 유제품(dairy products)의 제조

[0123] 본 발명의 하이포테마이신 5 ~ 10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0124] <2-3> 선식의 제조

[0125] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0126] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0127] 본 발명의 하이포테마이신을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0128] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 본 발명의 하이포테마이신의 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0129] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0130] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0131] 본 발명의 하이포테마이신(3 중량부),

[0132] 영지(0.5 중량부), 및

[0133] 지황(0.5 중량부).

[0134] <2-4> 건강보조식품의 제조

[0135] 본 발명의 하이포테마이신 100 mg

[0136] 비타민 혼합물 적량

[0137] 비타민 A 아세테이트 70 μg

[0138] 비타민 E 1.0 mg

[0139] 비타민 B1 0.13 mg

[0140] 비타민 B2 0.15 mg

[0141] 비타민 B6 0.5 mg

[0142] 비타민 B12 0.2 μg

[0143] 비타민 C 10 mg

[0144]	비오틴	10 μ g
[0145]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0146]	엽산	50 μ g
[0147]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0148]	무기질 혼합물	적량
[0149]	황산제1철	1.75 mg
[0150]	산화아연	0.82 mg
[0151]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0152]	제1인산칼륨	15 mg
[0153]	제2인산칼슘	55 mg
[0154]	구연산칼륨	90 mg
[0155]	탄산칼슘	100 mg
[0156]	염화마그네슘	24.8 mg

[0157] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0158] <제조예 3> 건강음료의 제조

[0159]	본 발명의 하이포테마이신	100 mg
[0160]	구연산	100 mg
[0161]	올리고당	100 mg
[0162]	매실농축액	2 mg
[0163]	타우린	100 mg
[0164]	정제수를 가하여 전체	500 ml

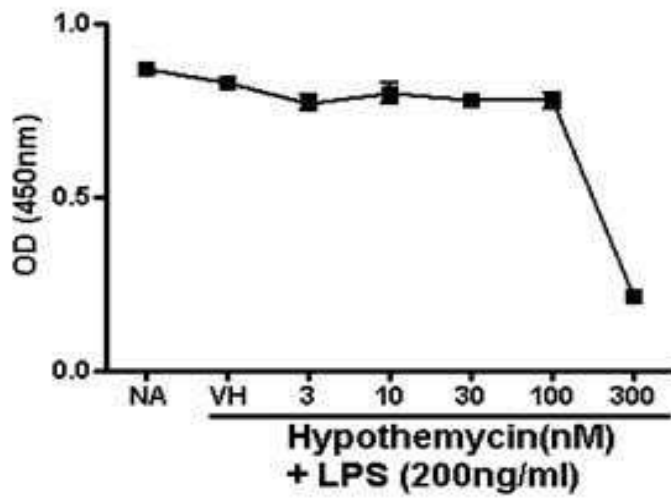
[0165] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 1 l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

[0166] 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

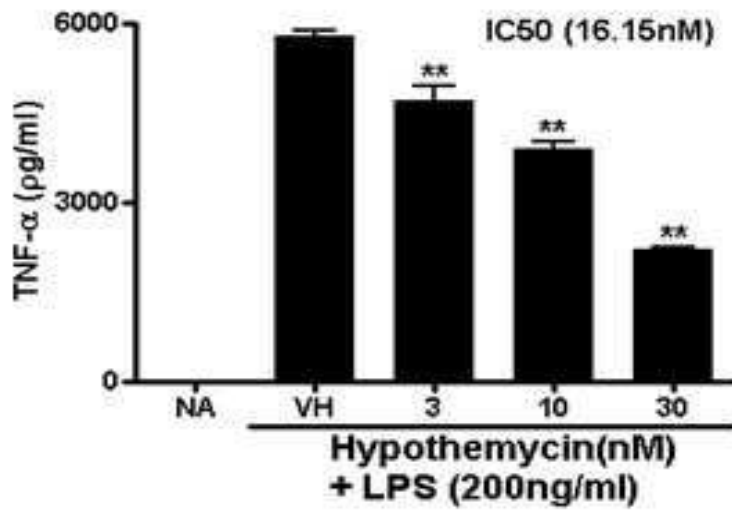
[0167] 이상의 본 발명은 상기에 기술된 실시예 및 제조예들에 의해 한정되지 않고, 통상의 기술자들에 의해 다양한 변형 및 변경을 가져올 수 있으며, 그외의 색채 화장품을 포함하는 다양한 용도의 화장품에 적용될 수 있는 것이고, 그 효능에 따라 인체에 얇게 도포하여 바를 수 있는 약제 즉, 연고로 제조에 이용될 수 있고, 이는 첨부된 청구항에서 정의되는 본 발명의 취지와 범위에 포함된다.

도면

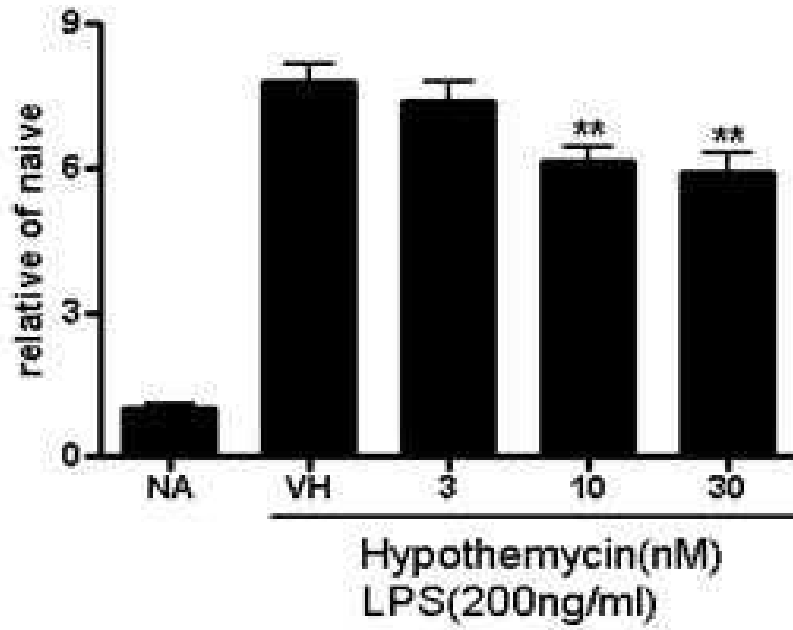
도면1



도면2



도면3



도면4

