



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년10월07일
(11) 등록번호 10-1448155
(24) 등록일자 2014년09월30일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/52 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-0072457
- (22) 출원일자 2013년06월24일
심사청구일자 2013년06월24일
- (56) 선행기술조사문헌
World J. Emerg Med, Vol. 1, No. 3, pp. 216-223, 2010
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 285, NO. 13, pp. 10850-10861, 2010
KR1020110136215 A
EUR J CELL BIOL. Vol. 83, No. 10, pp. 583-590, 2004

- (73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
- (72) 발명자
김동운
대전 서구 둔산북로 160, 7동 1003호 (둔산동, 한마루삼성아파트)
이원형
대전 유성구 엑스포로 448, 402동 1403호 (전민동, 엑스포아파트)
장은희
대전 중구 문화로 282, 기숙사 202호 (대사동, 충남대학교병원)
- (74) 대리인
김순용

전체 청구항 수 : 총 6 항

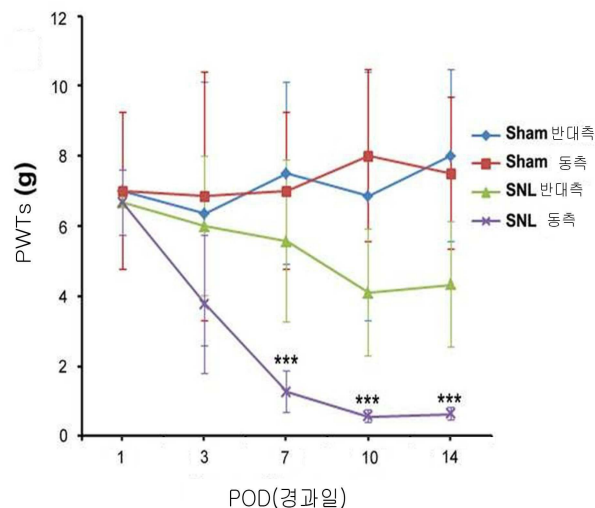
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 3-메틸아데닌을 유효성분으로 함유하는 신경병증성 통증의 억제 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 3-메틸아데닌(3-methyladenine; 3-MA)을 유효성분으로 함유하는 신경병증성 통증의 억제 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 3-메틸아데닌은 척수후각의 신경세포에서 LC3 및 베클린 1의 발현을 유의하게 억제함으로써, GABA(gamma-aminobutyric acid)성 신경세포의 자가포식 작용을 억제하고, 척수후각의 과흥분을 유도하는 통증의 신호전달을 저해함으로써, 통증을 억제하는 효과가 우수하므로, 신경병증성 통증의 억제 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	A070001
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	지역임상시험센터
연구사업명	보건의료기술진흥사업
연구과제명	지역임상시험센터
기 여 율	1/1
주관기관	한국보건산업진흥원
연구기간	2008.05.01 ~ 2013.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

3-메틸아데닌(3-methyladenine)을 유효성분으로 함유하는, 신경병증성 통증 억제 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 3-메틸아데닌은 LC3(microtubule-associated protein 1 light chain 3) 또는 베클린 1(becnine 1)의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는, 신경병증성 통증 억제 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 3-메틸 아데닌은 GABA(gamma-aminobutyricacid)성 신경세포의 자가포식 작용을 저해하는 것을 특징으로 하는, 신경병증성 통증 억제 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 신경병증성 통증은 중추 신경병증성 통증 또는 말초 신경병증성 통증인 것을 특징으로 하는, 신경병증성 통증 억제 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

3-메틸아데닌(3-methyladenine)을 유효성분으로 함유하는, 신경병증성 통증 억제 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 신경병증성 통증은 중추 신경병증성 통증 또는 말초 신경병증성 통증인 것을 특징으로 하는, 신경병증성 통증 억제 또는 개선용 식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 3-메틸아데닌(3-methyladenine; 3-MA)을 유효성분으로 함유하는 신경병증성 통증을 억제 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 통증은 환자들이 병원을 찾게 되는 가장 흔한 원인이 되는 증상이다. 통증은 개인의 삶을 황폐하게 하고 나아가 사회 및 경제적 손실을 가져오므로, 반드시 해결되어야 하는 의학적 선결과제이다. 대부분의 의학적 질환은 통증을 주요 증상으로 동반하며, 각 질환의 원인에 따라 상이한 특징을 가지고 있어 통증의 치료에도 각기 다른 치료방법을 선택하여야 한다. 예를 들어, 맹장염에 의한 복부 통증은 수술로 염증이 있는 맹장을 제거해야만 억제할 수 있으며, 관절염에 의한 관절통은 소염진통제와 물리치료를 사용하여야만 억제할 수 있다. 한편, 신경의 손상에 의한 극심한 통증(예를 들어 신경병증성 통증)은 통상의 통증억제 방법으로 전혀 통증이 조절되지 않아 이에 대한 새로운 치료 방법이 요구되고 있는 실정이다.

[0003] 통증은 물리적 자극 또는 신경적 자극에 의해 고통을 느끼는 현상으로, 주관적인 경험에 의존하여 통증 정도의

차이가 존재한다. 통증은 학습 및 기억 등의 신경 생물학적 반응과 많은 점에서 유사하다. 통증은 중추신경계의 특정 부위에서 인식된다. 통증은 일반적으로 통각, 즉 말초성 자극(유해한)에 의해 통증 신호가 중추신경계로 전달되어 유발되는 기전을 가지나, 항상 통각과 연관되어 유발되는 것은 아니다. 다양한 종류의 광범위한 임상적 통증이 존재하며, 이들은 상이한 근원적인 병리 메카니즘들로부터 유발되는 것으로 알려져 있다.

[0004] 통증은 인식의 근원에 따라 크게 급성 통증, 만성 통증 및 신경병증성 통증으로 분류될 수 있다.

[0005] 신경병증성 통증(neuropathic pain; NPP)은 신경손상, 비정상적 신경기능에 의해 유발되는 복합 난치성 만성통증으로, 급성통증과 다르게 신경계 이상에 의해 이미 존재하던 질병이상으로 지속적인 통증을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한, 신경병증성 통증은 대부분 조직손상을 동반하며, 신경섬유 자체를 손상시키고, 신경의 장애 또는 부상을 입히는 것으로 알려져 있다. 신경병증성 질환은 외상, 염증, 허혈성 손상, 대사산물에 의한 신경 손상 등에 의해 야기되는 것으로 알려져 있다.

[0006] 신경병증성 통증은 털이 닿는 듯한 자극에도 통증을 호소하는 이질통; 아픈 자극에 대한 통증의 증강을 보이는 통각과민; 쏘는 듯한 통증, 저린 증상, 전기가 오는 것과 같은 이상 감각을 유발하는 작열성 통증;을 유발하며, 이러한 증상은 단일증상보다는 복합적 증상으로 나타나는 경우가 많은 것으로 알려져 있다.

[0007] 신경병증성 통증은 크게 말초 신경병증성 통증 및 중추 신경병증성 통증으로 분류된다. 말초 신경병증성 통증은 신경손상, 삼차신경통, 포착성 신경병증, 만성요통, 수술후 통증 등의 말초 감각신경들의 손상 또는 감염에 의해 유발되며, 중추 신경병증성 통증은 뇌/척수 외상, 뇌졸중, 다발성 경화증 등의 중추신경계(CNS) 및/또는 척수에 대한 손상에 의해 유발되는 것으로 알려져 있다. 한편, 말초 신경병증성 통증 및 중추 신경병증성 통증은 명확한 초기 신경 손상없이도 유발될 수 있어 근원적인 병리 메카니즘이 일정하지 않다.

[0008] 국제통증학 협회(IASP, 시애틀, 워싱턴, USA)에서는 말초 신경병증성 통증을 말초신경계의 일차 손상 또는 장애에 의해 개시되거나 또는 유발된 통증으로 정의하였으며, 중추 신경병증성 통증을 중추신경계의 일차 손상 또는 장애에 의해 개시되거나 유발되는 통증으로 정의하고 있다.

[0009] 말초 신경병증성 통증 또는 중추 신경병증성 통증은 손상 부위에 대한 해부학적 위치에 의해서만 구별되는 것이 아니라, 통증의 메카니즘에 의해서도 구분되어지고 있다. 즉, 신경병증성 통증은 특정한 통증 증상 간 또는 약물간의 작용 메카니즘과 효과 사이의 명확한 관계성이 없어 이에 대한 치료가 어려운 실정이다.

[0010] 신경병증성 통증의 치료는 현재 약물치료, 교감신경치료, 신경자극술, 심리요법이 병용되고 있으며, 그중 약물치료가 가장 효과가 좋은 것으로 알려져 있다. 그러나, 약물치료는 약물의 내성으로 인한 독성 및 부작용, 고비용으로 인한 부담 등의 문제점이 있어 새로운 약물의 개발이 꾸준히 요구되고 있는 실정이다. 또한, 이러한 다양한 복합적인 치료방법에도 불구하고 신경병증성 통증은 억제되지 않는 경우가 있어 평생 참을 수 없는 통증으로 고통받을 수 있다. 이 경우, 환자는 우울증, 사회적 고립, 자살 등의 극단적인 선택을 하게 되어 사회적 문제를 일으키게 된다.

[0011] 현재, 신경병증성 통증 억제제로는 칼슘 채널에 작용하는 가바펜틴(Gabapentin), 프레가발린(Pregabalin) 등의 항경련제; 나트륨 채널에 작용하는 카바마제핀(Carbamazepine) 등의 항경련제; SNRI(Serotonin Norepinephrine Reuptake Inhibitor) 계열의 항우울제; 및 응급시에만 추천되는 아편류;의 총 4가지 계열의 약학 제제만이 임상적으로 사용되고 있으며, 이들은 모두 통증이 발생한 이후의 대응에만 관여하는 것으로 알려져 있다. 이들 억제제들은 대부분 병용되고 있으며, 모두 유사한 부작용을 유발하므로, 장기간 사용할 경우 오히려 환자의 상태를 더욱 악화시킬 수 있다는 단점이 있다. 또한, 이러한 억제제들의 병용은 부작용의 위험성에 비해 통증의 치료 효과는 상대적으로 저조하다는 문제점이 있다.

[0012] 신경병증성 통증 억제제는 환자에게 장기적으로 투여되어야 하기 때문에, 약물 자체의 독성 및 부작용이 적어야 하며, 경구투여가 가능해야 한다. 따라서, 신경병증성 통증을 억제하는 효과가 우수하고 독성 및 부작용이 적은 새로운 약물 및 기능성 식품 등에 관한 개발이 시급하다.

[0013] 한편, 아포토시스(apoptosis)는 예정된 세포 사멸의 과정으로, 항상성 유지, 발생, 세포분화와 같은 생명체의 다양한 생리작용을 정상적으로 유지하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, 아포토시스는 바이러스가 감염된 세포나 암 등의 악성 세포를 제거하는 체내 방어작용을 하는 것으로 알려져 있다. 아포토시스의 장애 또는 실패는 암, 퇴행성 신경질환, 면역장애 질환 등의 다양한 질환에 대한 병리적 원인으로 작용하는 것으로 알려져 있다. 아포토시스 과정에 밀접하게 관여하는 자가포식(autophagy) 작용은 세포가 스스로 소화효소인 라이소좀을 이용해 세포내 불필요한 노폐물, 단백질, 세포소기관 등을 분해하는 작용을 말한다.

[0014] 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하고 독성 및 부작용이 적으며 신경병증성 통증을 억제하는 효과가 우수한 물질에 관해 연구하던 중, 3-메틸아데닌이 척수후각의 신경세포에서 LC3 및 베클린 1의 발현을 유의하게 억제함으로써, GABA(γ -aminobutyric acid)성 신경세포의 자가포식 작용을 억제하고, 척수후각의 과흥분을 유도하는 통증의 신호전달을 저해함으로써, 통증을 억제하는 효과가 우수함을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 목적은 3-메틸아데닌(3-methyladenine)을 유효성분으로 함유하는 신경병증성 통증 억제 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 상기 3-메틸아데닌을 유효성분으로 함유하는 신경병증성 통증 억제 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명은 3-메틸아데닌(3-methyladenine)을 유효성분으로 함유하는 신경병증성 통증 억제 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 3-메틸아데닌을 유효성분으로 함유하는 신경병증성 통증 억제 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 3-메틸아데닌은 척수후각의 신경세포에서 LC3 및 베클린 1의 발현을 유의하게 억제함으로써, GABA(γ -aminobutyric acid)성 신경세포의 자가포식 작용을 억제하고, 척수후각의 과흥분을 유도하는 통증의 신호전달을 저해함으로써, 통증을 억제하는 효과가 우수하므로, 신경병증성 통증을 억제 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 본 발명에 따른 SNL(spinal nerve ligation) 처리군 및 sham 처리군의 통증 임계값(PWTs)을 척수신경 결찰 수술후 경과일(POD)에 따라 측정한 결과를 나타낸 도이다. (통증 임계값의 50%의 평균±표준편차으로 표현, 각 동물의 기준선을 $n = 6$, *** $P < 0.001$ 으로 표준화함).

도 2는 본 발명에 따른 SNL 처리군 및 sham 처리군의 척수후각에서 LC3 및 베클린 1의 발현을 척수신경 결찰 수술후 14일에 면역조직화학분석으로 측정한 결과를 나타낸 도이다(스케일 바는 Aa-d, Ba-d에서 50 μm 를 의미하고, Ae,f 및 Be,f에서는 20 μm 를 의미함.).

도 3은 본 발명에 따른 SNL 처리군의 척수후각에서 LC3 및 베클린 1-IR 세포에 대한 정량분석을 암시야 현미경을 이용한 이미지 분석으로 측정한 결과를 나타낸 도이다(*, $P < 0.05$), 평균±표준편차, $n=6$, paired t-test).

도 4는 본 발명에 따른 SNL 처리군의 LC3 및 베클린 1의 발현을 LC3 및 베클린 1에 대항하는 항체로 신경세포 마커인 NeuN, 성상세포 마커인 GFAP를 이용하여 이중면역형광염색분석으로 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명에 따른 SNL 처리군의 LC3의 발현을 LC3에 대항하는 항체로 미세아교세포 마커인 Iba1 및 성숙 회소돌기 아교세포 마커인 대장 용종증 대장균(APC)을 이용하여 이중면역형광염색분석으로 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명에 따른 SNL 처리군의 LC3 및 베클린 1-IR 신경세포의 이중면역형광염색분석 결과를 나타낸 도이다.

다(스케일바: 20 μ m).

도 7은 본 발명에 따른 SNL 처리군의 LC3, 베클린 1 및 칼레티닌 IR 세포에 대한 정량분석을 척수신경 결찰 수술 후 14일에 측정된 결과를 나타낸 도이다(바는 평균 $\pm$ 표준편차, 평균간의 차이는 paired t-test로 분석됨, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

도 8은 본 발명에 따른 SNL 처리군에 3-메틸아데닌을 척수강내 주입한 후, 통증 임계값(PWTs)을 척수신경 결찰 수술 후 경과일(POD)에 따라 측정된 결과를 나타낸 도이다(통증 임계값의 50%의 평균 $\pm$ 표준편차로 표현, 각 동물의 기준선을 $n = 6$, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 으로 표준화함).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 발명은 3-메틸아데닌(3-methyladenine)을 유효성분으로 함유하는 신경병증성 통증 억제 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0022] 상기 조성물은 약학적 조성물 및 식품 조성물을 포함한다.
- [0023] 이하 본 발명에 관하여 상세히 설명한다.
- [0024] 본 발명의 3-메틸아데닌은 척수후각의 신경세포에서 LC3 및 베클린 1의 발현을 유의하게 억제함으로써, GABA(gamma-aminobutyric acid)성 신경세포의 자가포식 작용을 억제하고, 척수후각의 과흥분을 유도하는 통증의 신호전달을 저해함으로써, 통증을 억제하는 효과가 우수하므로, 신경병증성 통증을 억제 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0025] 상기 신경병증성 통증은 중추 신경병증성 통증 및 말초 신경병증성 통증을 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 조성물은 3-메틸아데닌과 함께 신경병증성 통증에 대하여 예방 또는 치료의 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸 히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0029] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 3-메틸아데닌은 1일 0.001 mg/kg 내지 10000 mg/kg의 양으로 투여할 수 있으며, 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회 나누

어 투여할 수도 있다.

- [0030] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 조성물은 신경병증성 통증의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0032] 본 발명에서, "건강기능식품"이란, 질병의 예방 및 개선, 생체방어, 면역, 병후의 회복, 노화 억제 등 생체조절 기능을 가지는 식품을 말하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해해야 한다.
- [0033] 본 발명의 조성물은 신경병증성 통증의 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있다. 본 발명의 3-메틸아데닌을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 3-메틸아데닌을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 3-메틸아데닌은 원료에 대하여 15중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0034] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0035] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g 이다.
- [0036] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0037] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 제제예를 제시한다. 그러나 하기 실시예 및 제제예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 및 제제예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0038] **[실시예 1. L5 척수신경 결찰(SNL)에 의해 신경병증성 통증을 유발한 공동국소화동물 모델 제작]**
- [0039] 신경병증성 통증 유발(neuropathic pain; NPP) 실험동물 모델로 SD(Sprague-Dawley)계 수컷 흰쥐(rats, 180-200 g, Koatech, Korea)를 사용하였으며, 12:12시간 명:암으로 빛을 순환하는 환경조건의 케이지에서 개별적으로 사육하였다. 모든 실험은 국립충남대학교의 동물 관리 및 사용 위원회의 승인을 받고 수행되었으며, 통증연구 국제협회 및 건강 국립연구소의 윤리지침에 따라 수행되었다. 실험을 본격적으로 수행하기 1시간 전, 사육환경에서 분리하여 실험실로 수송하였으며, 실험실로 수송될 때까지 물과 음식을 자율배식으로 제한없이 공급하였다. 상기 흰쥐에게 나트륨 펜토바비탈(sodium pentobarbital)(50 mg/kg 복강주사)을 투여하여 마취한 후, L4 및 L5 척수 신경(spinal nerve)을 식별하기 위해 왼쪽 요추(L) 6 횡돌기를 신중하게 제거하였다. 왼쪽 L5 척수 신경을 3-0 견사로 단단히 결찰(ligation)하여 분리한 후, 완전히 지혈된 것을 확인하고 상처를 봉합하여 척수신경 결찰(spinal nerve ligation; SNL)에 의해 신경병증성 통증이 유발된 실험동물 모델을 제작하였다(SNL 처리군).

또한, 척수신경 결찰을 제외한 모든 과정을 상기 SNL 처리군과 동일하게 수행하여 척수신경 결찰을 하지 않은 실험동물 모델을 제작하였다(sham 처리군).

[실시예 2. 신경병증성 통증 유발 동물모델에서 척수신경 결찰에 의한 기계적 이질통 확인]

1. 척수신경 결찰에 의한 통증과민 평가

신경병증성 통증이 유발된 동물모델에서 척수신경 결찰에 의한 기계적 이질통의 유발 정도를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1에서 제작된 SNL 처리군과 sham 처리군에 대한 통증 임계값(paw withdrawal thresholds; PWTs) (또는 통증 과민 정도)을 신경결찰 수술후 경과일(post-surgery day; POD)에 따라 측정하였다.

구체적으로는, PWTs는 상-하 시험 범례(up-down testing paradigm) (Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., Yaksh, T.L., 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. J Neurosci Methods. 53, 55-63.)를 사용하여 SNL 처리군의 경우, 척수신경 결찰 수술의 하루전, 수술 당일, 수술후 3일, 7일, 10일, 14일에 각각 측정되었으며, 척수신경 결찰 수술을 하지 않은 sham 처리군의 경우, 수술 당일에 측정되었다. 로그단위(0.007, 0.016, 0.4, 0.6, 1, 1.4, 2, 4, 6, 8, 10, 15 g)의 힘으로 본 프라이 헤어(Von Frey hairs) (39337500, Touch Test™ Sensory Evaluator Kit of 20)를 각각 흰 쥐의 요추 제 5번 피부 분절에 해당하는 뒷발바닥의 후외측에 4초 내지 6초 동안 적용하여 기계적 자극을 준 후, PWTs를 측정하였다. 먼저, 로그단위 2 g의 기계적 자극을 적용하였다. 긍정적인 회피반응이 확인될 경우, 작은 본 프라이 헤어를 사용하고, 부정적 회피반응이 확인될 경우, 더 높은 힘을 적용하면서 실험을 수행하여 통증에 대한 과민반응 정도를 측정하였다. 이의 결과를 도 1에 나타내었다.

도 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 SNL 처리군 및 sham 처리군의 PWTs를 척수신경 결찰 수술후 경과일(post-surgery day; POD)에 따라 측정한 결과, 본 발명의 SNL 처리군은 POD 7일에 동측의 PWTs가 기준(n=6)에 비하여 현저히 낮게 측정되었으며, 14일까지 유지되는 것을 확인하였다. 반면, sham 처리군은 PWTs가 기준에 비하여 유의한 변화를 보이지 않는 것으로 확인되었다. 또한, 본 발명의 SNL 처리군은 POD 7일에 동측의 PWTs가 sham 처리군(동측 및 반대측)에 비하여 현저히 낮게 측정되었으며, 14일까지 유지되는 것을 확인하였다.

따라서, 척수신경 결찰 수술에 의해 동측의 PWTs가 현저히 낮아지므로, 동측의 척수신경 손상에 의해 기계적 이질통이 유발됨을 확인하였다.

2. 통계 분석

행동 연구와 면역조직화학적 분석은 Paired t-test를 이용하여 통계적으로 분석하였다. 값은 평균±표준편차로 표시하였으며, 유의성은 $P < 0.05$ 로 설정하였다. 통계 소프트웨어 패키지 SigmaStat(Systat, San Jose, CA)는 모든 통계분석 수행을 위해 사용되었다.

[실시예 3. 신경병증성 통증 유발 동물모델에서 척수신경 결찰에 의한 척수내 후각에서의 LC3 및 베클린 1의 발현 측정]

신경병증성 통증 유발 동물모델에서 척수신경 결찰에 의한 척수내 후각에서의 LC3 및 베클린 1의 발현을 알아보기 위하여, 상기 실시예 1에서 제작된 SNL 처리군 및 sham 처리군에 대한 면역조직화학적분석을 신경결찰 수술 후 14일에 수행하였다.

구체적으로는, SD계 수컷 흰쥐(rat)에 나트륨 펜토바비탈(50 mg/kg 복강주사)을 투여하여 마취한 후, 해파린 인산완충용액(PBS, pH 7.4)과 함께 검심관류로 관류하였다. 이때, 상기 인산완충용액은 15분간 4% 파라포름알데하이드로 관류됨으로써 얻어졌다. 척수의 요추 확장(L4-L6) 부위를 즉시 제거하고, 하룻밤 동안 동일한 고정액에 넣은 다음 파라핀에 박았다. 파라핀에 박힌 조직 배열의 4- μ m 절편(section)은 일련의 알코올 등급에서 재수화되었고 탈파라핀화되었다. 항원은 15분간 121°C로 조절된 최종온도에서 전자 진공 히스토프로세서(microwave vacuum histoprocessor) (RHS-1, Milestone, Bergamo, Italy)로 시료를 가열함으로써, 0.01 M 구연산 완충용액(citrate buffer) (pH 6.0)과 함께 조사되었다. 면역조직화학적 분석을 위해, 0.3 % 과산화수소를 사용하여 내인성 과산화효소의 활성을 차단하였다. 상기 절편을 20분 동안 단백질 차단 용액(Dako, Glostrup, Denmark)으로 처리한 후, 대부분의 LC3(1:200, #AP1801a, ABGENT) 및 베클린 1(1:500, # AP1818a, ABGENT)에 반응하는 특이적

다클론 항혈청으로 하룻밤 동안 습기가 있는 4℃ 온도의 챔버에서 배양하였다. 이를 PBS로 세척한 후, 조직을 비오티ن 항-토끼 IgG 및 스트렙타비딘 과산화효소 복합체(Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)에 노출시켰다. 면역 염색은 디아미노벤지딘(diaminobenzidine; DAB)으로 시각화하였고, 표본을 폴리마운트(Polymount) (Polysciences 주식 회사, 워싱턴, PA)를 사용하여 고정하였다. 이의 결과를 도 2에 나타내었다.

[0052] 도 2에 나타난 바와 같이, 신경결찰 수술후 14일에 흰쥐의 척수후각에서 LC3 및 베클린 1 발현을 면역조직화학 분석을 통해 측정한 결과, SNL 처리군은 동측 척수후각에서 LC3 및 베클린 1 둘다 발현이 유도되었으며, 특히, 표면 요추 후각(superficial lumbar dorsal horn)에서 LC3 및 베클린 1 발현이 현저하게 유도되었음을 확인하였다. 또한, SNL 처리군은 naive 및 sham 처리군에 비하여 LC3 및 베클린 1 발현을 현저하게 유도하였다. 반면, naive 및 sham 처리군은 LC3 및 베클린 1을 낮은 수준으로 발현하였으며, LC3 및 베클린 1 발현에 대한 naive 및 sham 처리군 간의 유의한 차이는 확인되지 않았다.

[0053] 따라서, 척수신경 결찰 수술에 의해 동측 L5 척수후각에서 LC3 및 베클린 1 단백질 수준이 유의하게 증가하므로, 동측의 척수신경 손상에 의해 자가포식 작용이 유발되었음을 확인하였다.

[0054] [실시예 4. 신경병증성 통증 유발 동물모델에서 척수신경 결찰에 의한 척수내 후각에서의 LC3 및 베클린 1-IR 세포의 정량분석]

[0055] 신경병증성 통증 유발 동물모델에서 척수신경 결찰에 의한 척수내 후각에서의 LC3 및 베클린 1-면역반응 세포 (Immunoreactive cell; IR cell)에 대한 정량분석을 수행하기 위하여, 암시야 현미경(dark field microscopy)(Zeiss Axioscope, Hallbergmoos, Germany)을 이용하여 척수 분절에 대한 이미지 분석을 수행하였다.

[0056] LC3 및 베클린 1-IR 세포는 척수 분절의 동측 및 반대측에서 모두 정량화되었으며, 상기 LC3 및 베클린 1-IR 세포의 정량분석은 회색 물질의 랜드마크가 각 척수 염측을 정의하고 분절 수준을 결정하였음을 최초로 보고한 종래의 보고서에 기재된 방법에 따라 수행되었다(Abbadie, C., Besson, J.M., 1994. Chronic treatments with aspirin or acetaminophen reduce both the development of polyarthritis and Fos-like immunoreactivity in rat lumbar spinal cord. Pain. 57, 45-54.).

[0057] 구체적으로, 요추 확장 척수 분절로부터 5개의 척수 절편을 무작위로 선별한후, 각 절편을 컴퓨터-보조용 이미지 분석 시스템(Image J, NIH, USA)과 연결된 Axioscope A1(Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 4096 그레이 수준으로 디지털화하였다. 측정되는 각 이미지에 대한 임계값을 유지하고 면역 염색의 미묘한 오차를 고려하기 위해, 배경 삭제 및 음영 보정 작업을 수행한 다음, 각 이미지의 평균 그레이 수준을 최소 85% 더 어렵게 조정하여 신경세포의 수를 측정하였다. 현미경 조명 및 데이터 수집에 대한 설정은 전체 분석 절차를 통해 고정되었다. 흰쥐로부터 절편 당 LC3 및 베클린 1-IR 세포의 평균수를 얻었다. 이때, 얻어진 평균수는 각 그룹에서 최소 5마리의 쥐에 대한 평균이고 그룹 데이터로 제시되었다. LC3 및 베클린 1-IR-양성 세포는 다중 표면 후각 부위(various superficial dorsal horn regions) (SDH, laminae I and II)에서 정량화되었다. 이 부위는 이전에 정의된 대로, 세포구조학적(cytoarchitectonic) 기준에 기초하여 확인되었다. 각 후각 부위에서 IR-양성 세포 프로파일과 관련된 모든 수치 결과(numerical results)는 단위면적당 LC3 및 베클린 1-IR 세포수로 표현되었으며, 이의 결과를 도 3에 나타내었다.

[0058] 도 3에 나타난 바와 같이, 척수신경 결찰에 의해 신경병증성 통증이 유발된 흰 쥐의 척수후각에서 LC3 및 베클린 1-IR 세포의 정량분석을 이미지 분석법을 이용하여 수행한 결과, 척수신경 결찰 수술후, 동측 척수후각에서 LC3 및 베클린 1-IR 세포수가 반대측에 비하여 현저히 증가한 것을 확인하였다. 반면, 몇몇 소수의 LC3 및 베클린 1-양성-IR 세포도 반대측 척수후각에서 발견된 것을 확인하였다.

[0059] 따라서, 척수신경 결찰에 의해 동측 L5 척수후각에서 LC3 및 베클린 1 단백질 IR 세포수가 유의하게 증가하므로, 자가포식 작용이 유발되었음을 확인하였다.

[0060] [실시예 5. 신경병증성 통증 유발 동물모델에서 척수신경 결찰에 의한 LC3 및 베클린 1 발현 IR 세포의 발현 측정]

[0061] 신경병증성 통증 유발 동물모델에서 척수신경 결찰에 의한 신경세포 및 정상세포에서의 LC3 및 베클린 1의 공동 국소화(colocalized) 여부를 알아보기 위하여, LC3 및 베클린 1에 대항하는 항체로 신경세포 마커인 NeuN, 정상

세포 마커인 GFAP를, LC3에 대항하는 항체로 미세아교세포 마커인 Iba1 및 성숙 희소돌기 아교세포 마커인 대장 용종증 대장균(APC)를 이용하여 2회 이중면역형광염색분석을 수행하였다.

[0062] 먼저, LC3 및 베클린 1에 대항하는 항체로 신경세포 마커인 NeuN, 성상세포 마커인 GFAP를 이용하여 이중면역형 광염색분석을 수행하였다.

[0063] 구체적으로는, 동일 절편에서 동시에 한 쌍의 항원의 존재를 입증하기 위하여, 토끼 LC3 및 베클린 1은 단클론 항체(monoclonal antibodies)들 중의 하나를 사용하였다. 상기 단클론 항체는 항신경아교세포 섬유성 산성 단백질(antiglial fibrillary acidic protein) (GFAP, 1:1000, #AM020, Biogenex), 항-NeuN(anti-NeuN) (1:100, MAB377, Millipore) 및 단클론 항-칼레티닌(anti-Calretinin) (1:500, #6B3, Swant)이다. 상기 설명한 바와 같이 절편은 LC3 및 베클린 1에 대해 면역 반응하였으나, CY3-복합 항-토끼 2차 항체가 사용되었다(1:500, Amersham, Buckinghamshire, UK). 분절은 이후 GFAP, NeuN 및 칼레티닌 면역세포화학 및 CY2-복합 항-마우스 2차 항체(1:200, 아머 셴(Amersham))에 대해 한번 더 처리하고, 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(4',6-diamidino-2-phenylindole; DAPI) 대비 염색제로 착색하여 대조하였다. 이중 염색 분절은 Axiophot 현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 관찰하였다. 이의 결과를 도 4에 나타내었다.

[0064] 도 4에 나타난 바와 같이, 대부분의 신경세포에서는 LC3 및 베클린 1의 발현이 현저히 증가하여, LC3 및 베클린 1-IR 세포가 표면 후각에서 신경세포 마커인 NeuN와 공동국소화되는 것을 확인하였다. 또한, 일부 성상세포에서도 LC3 및 베클린 1의 발현이 증가하여, 일부 LC3 및 베클린 1-IR 세포가 성상세포 마커인 GFAP와 공동국소화되는 것을 확인하였다.

[0065] 이후, LC3에 대항하는 항체로 미세아교세포 마커인 Iba1 및 성숙 희소돌기 아교세포 마커인 대장 용종증 대장균(APC)을 이용하여 상기와 같은 방법으로 이중면역형광염색분석을 수행하였으며, 이의 결과를 하기 도 5에 나타내었다.

[0066] 도 5에 나타난 바와 같이, 대부분의 신경세포에서는 LC3의 발현이 현저히 증가하여, LC3 IR-세포가 표면 후각에서 미세아교세포 마커인 Iba1과 공동국소화되는 것을 확인하였다. 또한, 일부 성상세포에서도 LC3의 발현이 증가하여, 일부 LC3 IR-세포가 APC와 공동국소화되는 것을 확인하였다.

[0067] 따라서, 신경병증성 통증 유발 동물모델에서 LC3 및 베클린 1-IR 세포는 대부분의 신경세포에서 공동국소화되고, 몇몇 소수의 성상세포에서 공동국소화되어 자가포식 작용을 유발함을 확인하였다.

[0068] **[실시예 6. 신경병증성 통증 유발 동물모델에서 척수신경 결찰에 의한 척수후각의 GABA성 인터뉴런에서 LC3 및 베클린 1의 발현 증가]**

[0069] 신경병증성 통증 유발 동물모델에서 척수신경 결찰에 의한 척수후각의 GABA(gamma-aminobutyricacid)성 신경세포의 유형을 알아보기 위하여, LC3, 베클린 1 및 칼레티닌 IR 세포에 대한 이중면역형광염색분석 및 정량분석을 수행하였다. 척추 염층 (I) 내지 (III)에 위치한 GABA성 인터뉴런(interneurons)은 통증 신호전달 및 통각 활성화에 관여하는 신경세포이며, 칼레티닌(Calretinin)은 척수신경 결찰후, 요추에서 GABA성 인터뉴런의 모집단에 대한 마커로 사용되었다.

[0070] 먼저, LC3 및 베클린 1-IR 신경세포의 GABA성 신경세포 유형을 분석하기 위하여, 상기 실시예 5에 기재된 이중면역형광염색분석과 동일한 방법으로 LC3 및 베클린 1-IR 신경세포의 이중면역형광염색분석을 수행하였다. 이의 결과를 도 6에 나타내었다.

[0071] 도 6에 나타난 바와 같이, LC3 및 베클린 1 IR-세포는 표면 후각에서 GABA성 신경세포의 모집단 마커인 칼레티닌과 공동국소화되는 것을 확인하였다.

[0072] 이후, 상기 실시예 4에 기재된 정량분석과 동일한 방법으로 LC3, 베클린 1 및 칼레티닌 IR 세포에 대한 정량분석을 수행하였다. 척수신경 결찰 수술후 14일에 척수후각의 동측 및 반대측에서의 LC3, 베클린 1 및 칼레티닌의 IR 세포수, 및 그들의 평균 세포수를 측정하였다. 이의 결과를 도 7에 나타내었다.

[0073] 도 7에 나타난 바와 같이, 척수신경 결찰 수술후 14일에 동측 및 반대측 척수후각의 LC3, 베클린 1 및 칼레티닌 IR 세포수 및 그들의 평균 비율을 측정한 결과, 칼레티닌 IR GABA성 인터뉴런이 동측 척수후각에서 그들의 반대 측에 비하여 90% 이상이 LC3 및 베클린 1을 발현하는 것을 확인하였다.

[0074] 따라서, 신경병증성 통증 유발 동물모델에서 칼레티닌 IR-GABA성 인터뉴런이 대부분 LC3 및 베클린 1의 발현을 유의하게 증가시켜 자가포식 작용을 유발함을 확인하였다.

[0075] [실시예 7. 3-메틸아데닌의 L5 척수신경 결찰에 의해 유도된 신경병증성 통증 억제활성]

[0076] 자가포식 억제제인 3-메틸아데닌(3-methyladenine; 3-MA)의 신경병증성 통증 억제활성을 알아보기 위하여, 신경 병증성 통증 실험동물 모델에게 3-MA를 투여한 후 PWTs를 측정하였다.

[0077] 구체적으로는, 상기 실시예 1에서 제작된 SNL 처리군에게 POD 3일에 30 μ g의 3-MA(sigma, M9281)를 10 μ l의 식 염수에 녹여 척수강내 주사로 투여하였다. 3-MA 투여를 제외한 전과정을 상기 실시예 2와 동일하게 수행하였다. 이의 결과를 도 8에 나타내었다.

[0078] 도 8에 나타난 바와 같이, SNL 처리군에게 3-메틸아데닌을 투여한 결과, POD 7일부터 기계적 이질통이 감소하였으며, POD 14일에는 기계적 이질통이 기준선에 대하여 감소된 것을 확인하였다. 또한, POD 10일에는 기계적 이질통이 최고 수준으로 감소된 것을 확인하였다.

[0079] 따라서, 본 발명의 3-메틸아데닌은 척수내 후각에서 기계적 이질통을 유의하게 감소시키므로, 척수신경 결찰에 의해 유도된 신경병증성 통증을 억제하는 효과가 우수함을 확인하였다.

[0080] 이하 본 발명의 3-메틸아데닌을 함유하는 신경병증성 통증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 신경병증성 통 증의 예방 또는 개선용 식품 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설 명하고자 함이다.

[0081] [제제예 1. 약학적 제제의 제조]

[0082] 1. 산제의 제조

[0083] 3-메틸아데닌 20 mg

[0084] 유당 100 mg

[0085] 탈크 10 mg

[0086] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0087] 2. 정제의 제조

[0088] 3-메틸아데닌 10 mg

[0089] 옥수수전분 100 mg

[0090] 유당 100 mg

[0091] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0092] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0093] 3. 캡슐제의 제조

[0094] 3-메틸아데닌 10 mg

[0095]	결정성 셀룰로오스	3 mg
[0096]	락토오스	14.8 mg
[0097]	마그네슘 스테아레이트	0.2 mg
[0098]	통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.	
[0099]	4. 주사제의 제조	
[0100]	3-메틸아데닌	10 mg
[0101]	만니톨	180 mg
[0102]	주사용 멸균 증류수	2974 mg
[0103]	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	26 mg
[0104]	통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.	
[0105]	5. 액제의 제조	
[0106]	3-메틸아데닌	20 mg
[0107]	이성화당	10 g
[0108]	만니톨	5 g
[0109]	정제수	적량
[0110]	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.	
[0111]	[제제예 2. 식품 제제의 제조]	
[0112]	1. 건강식품의 제조	
[0113]	3-메틸아데닌	100 mg
[0114]	비타민 혼합물	적량
[0115]	비타민 A 아세테이트	70 g
[0116]	비타민 E	1.0 mg
[0117]	비타민 B1	0.13 mg
[0118]	비타민 B2	0.15 mg
[0119]	비타민 B6	0.5 mg
[0120]	비타민 B12	0.2 g
[0121]	비타민 C	10 mg
[0122]	비오틴	10 g
[0123]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0124]	엽산	50 g
[0125]	판토텐산 칼슘	0.5 mg

[0126]	무기질 혼합물	적량
[0127]	황산제1철	1.75 mg
[0128]	산화아연	0.82 mg
[0129]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0130]	제1인산칼륨	15 mg
[0131]	제2인산칼슘	55 mg
[0132]	구연산칼륨	90 mg
[0133]	탄산칼슘	100 mg
[0134]	염화마그네슘	24.8 mg

[0135] 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.

[0136] 2. 건강음료의 제조

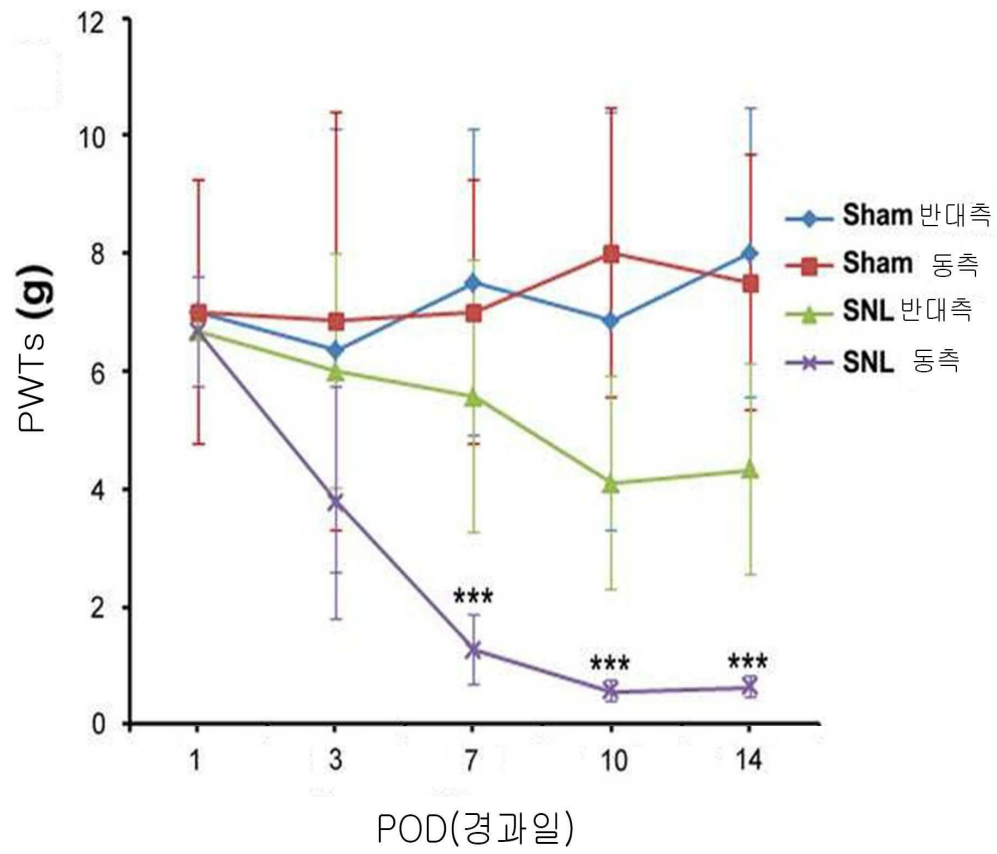
[0137]	3-메틸아데닌	100 mg
[0138]	비타민 C	15 g
[0139]	비타민 E(분말)	100 g
[0140]	젖산철	19.75 g
[0141]	산화아연	3.5 g
[0142]	니코틴산아미드	3.5 g
[0143]	비타민 A	0.2 g
[0144]	비타민 B1	0.25 g
[0145]	비타민 B2	0.3g
[0146]	물	정량

[0147] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

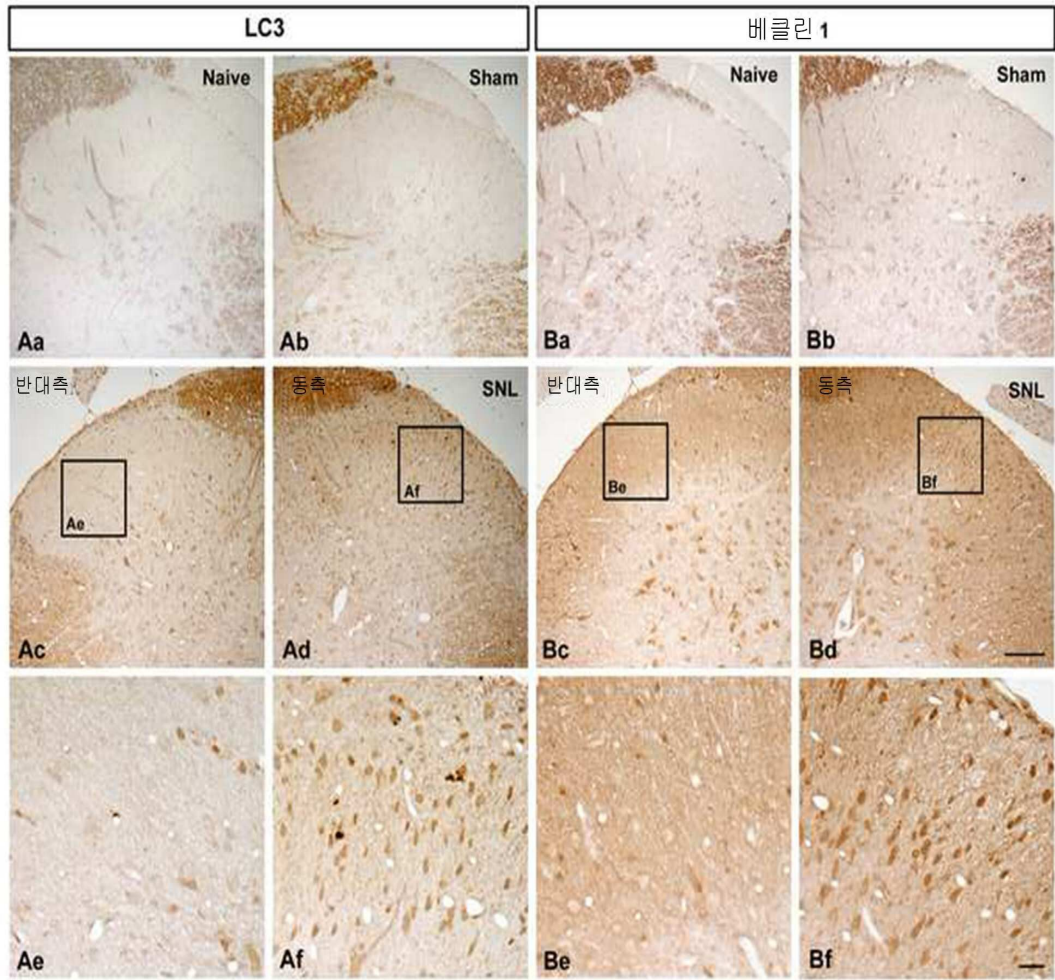
[0148] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

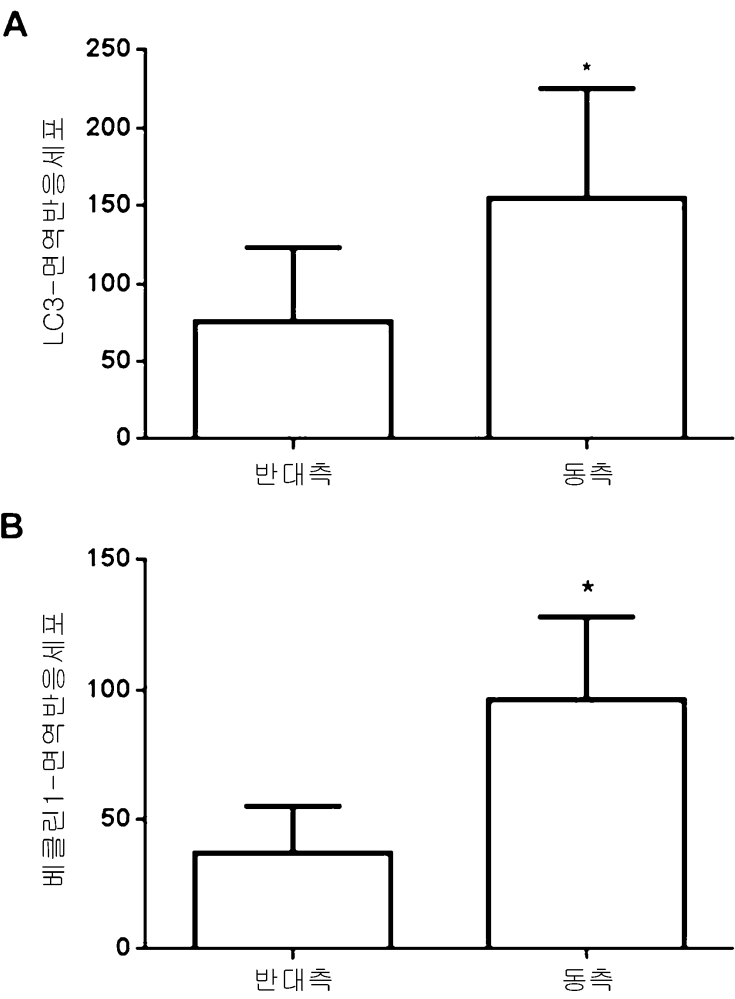
도면1



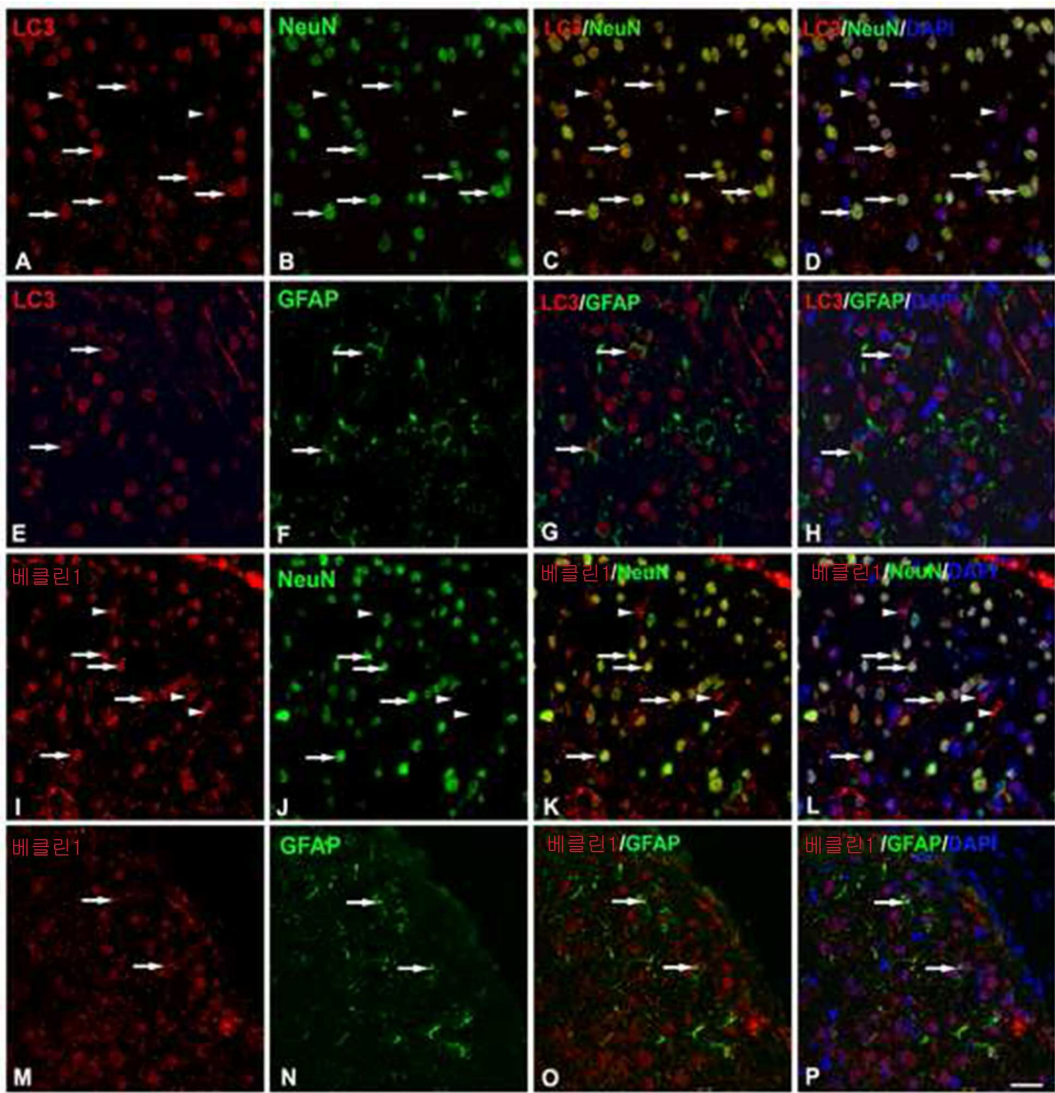
도면2



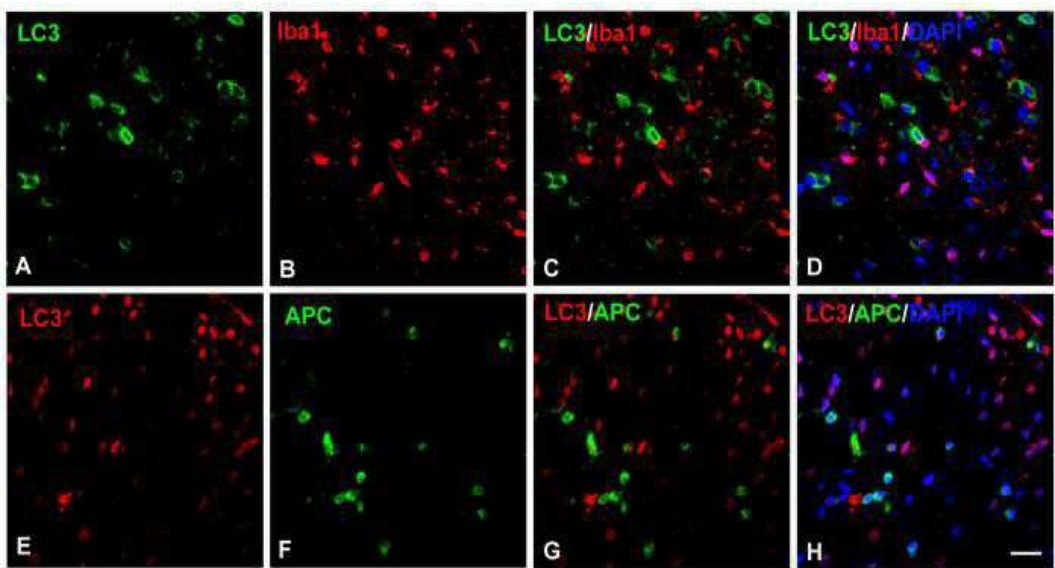
도면3



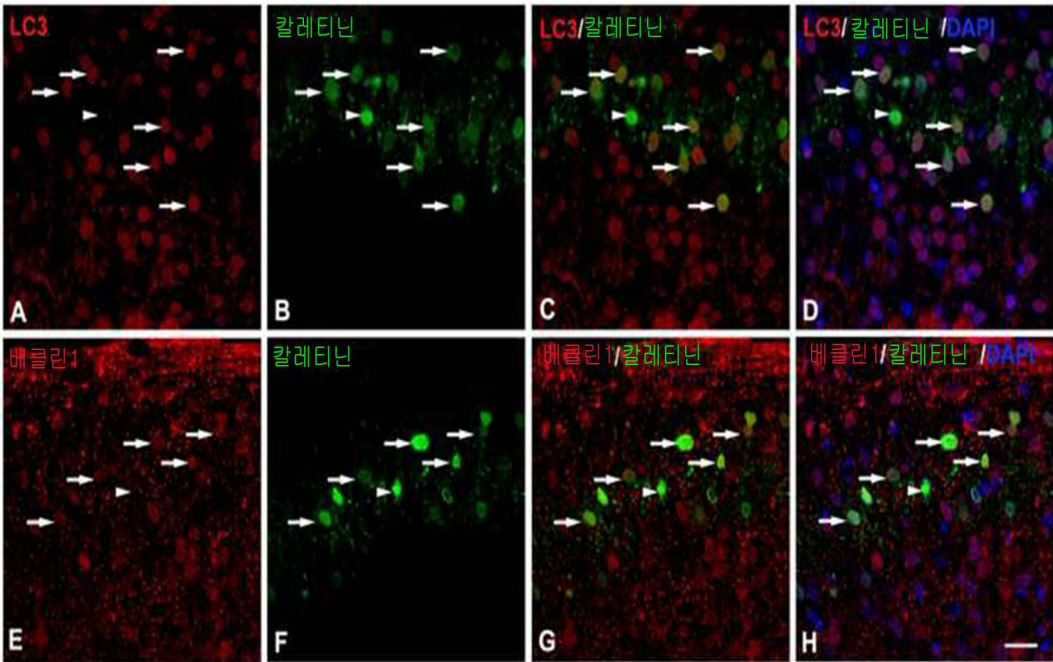
도면4



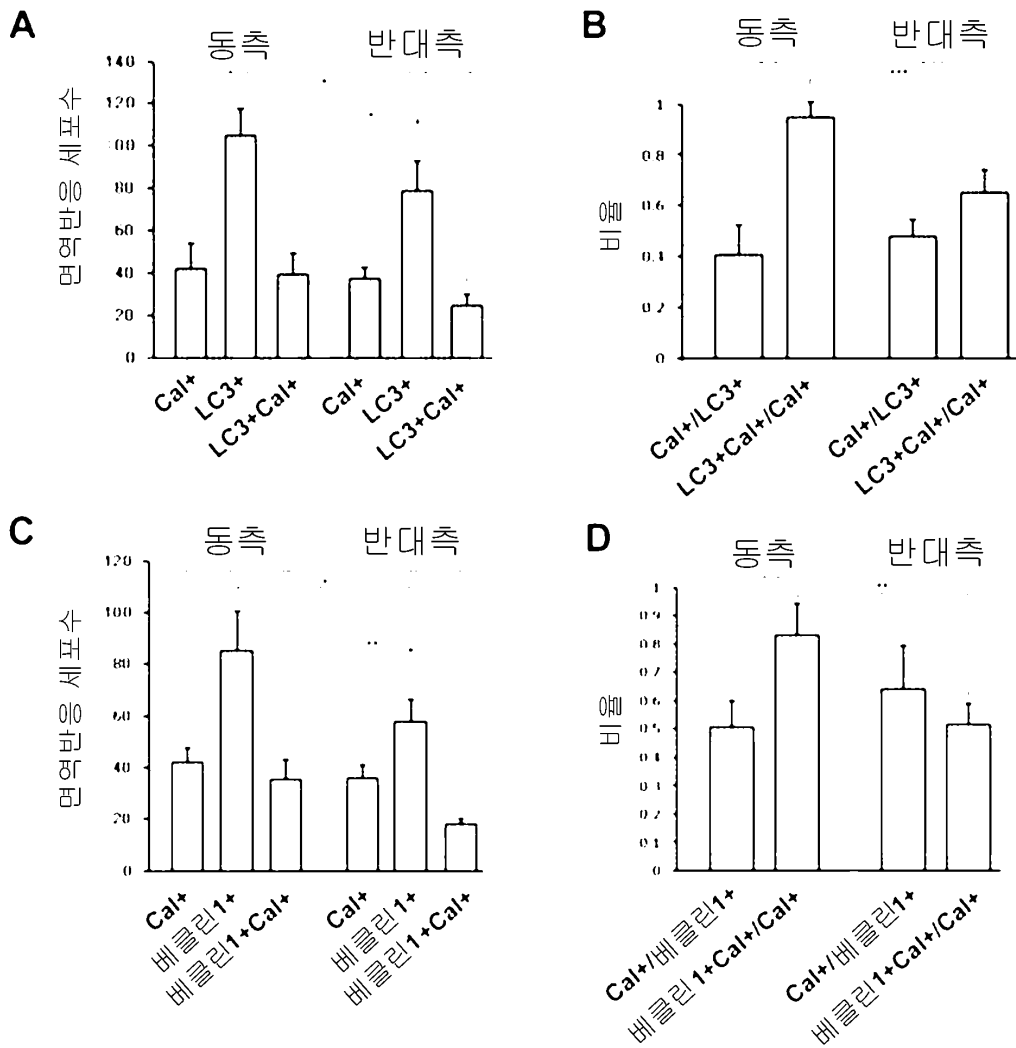
도면5



도면6



도면7



도면8

