



등록특허 10-2456307



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년10월19일

(11) 등록번호 10-2456307

(24) 등록일자 2022년10월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/7016 (2006.01) A23L 33/125 (2016.01)

A61P 29/00 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01) A61P 9/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/7016 (2013.01)

A23L 33/125 (2020.05)

(21) 출원번호 10-2021-0154141

(22) 출원일자 2021년11월10일

심사청구일자 2021년11월10일

(56) 선행기술조사문헌

W02021195011 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

주식회사 진캠

대전광역시 유성구 테크노2로 187, 에이동 201호

(용산동, 미건테크노월드2차)

(72) 발명자

허경선

대전광역시 유성구 대학로 99, 충남대학교 약학대

학 302(궁동)

진유진

대전광역시 유성구 대학로 99, 충남대학교 약학대

학 302(궁동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 공간

전체 청구항 수 : 총 4 항

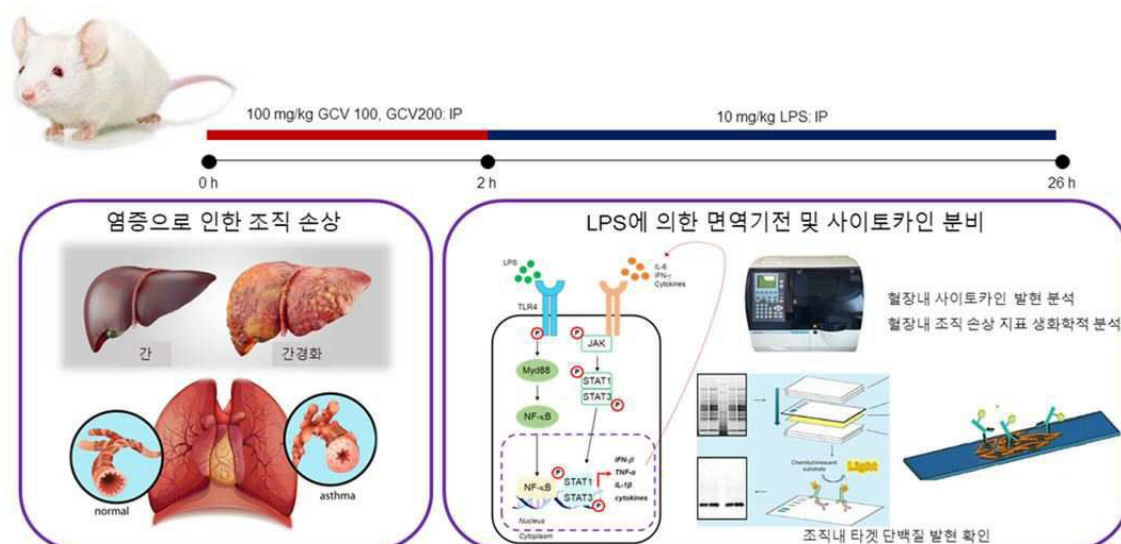
심사관 : 신영신

(54) 발명의 명칭 3' -시알릴락토오스, 6' -시알릴락토오스 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 감염에 의한 다발성 장기부전의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 3' -시알릴락토오스, 6' -시알릴락토오스 또는 이의 염을 유효성분으로 함유하는 감염에 의한 다발성 장기부전의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 3' -시알릴락토오스 또는 6' -시알릴락토오스를 LPS 유도 급성 염증 마우스모델에 투여한 결과, 쥐의 혈액 내 염증성 사이토카인의 증가를 억제하고, 간과 폐의 손상을 억제함으로써 사이토카인 폭풍 관련 염증 관련 질환의 예방, 치료 및 개선에 도움을 줄 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2018.01)

A61P 31/00 (2018.01)

A61P 43/00 (2018.01)

A61P 9/04 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

(72) 발명자

전혜수

대전광역시 유성구 대학로 99, 충남대학교 약학대학 302(궁동)

김리라

대전광역시 유성구 테크노2로 187, A동 201호(용산동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1425151868

과제번호 S3003516

부처명 중소벤처기업부

과제관리(전문)기관명 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 중소기업기술혁신개발(R&D)

연구과제명 광범위 항바이러스 신약후보물질 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 (주)진캠프

연구기간 2020.09.21 ~ 2022.09.20

명세서

청구범위

청구항 1

3' -시알릴락토오스, 6' -시알릴락토오스 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 감염에 의한 LPS-유발성 급성 간부전 예방 또는 치료용 조성물에 있어서,

상기 감염은 세균 또는 바이러스 감염에 의한 것인 감염에 의한 LPS-유발성 급성 간부전 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 감염은 간염바이러스에 의해 감염인 것을 특징으로 하는 감염에 의한 LPS-유발성 급성 간부전 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 조성물은 감염에 의한 LDH, GPT, GOT, CPK 또는 BUN의 증가를 억제하는 것을 특징으로 하는 감염에 의한 LPS-유발성 급성 간부전 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

3' -시알릴락토오스, 6' -시알릴락토오스 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 감염에 의한 LPS-유발성 급성 간부전 예방 또는 개선용 건강기능식품에 있어서,

상기 감염은 세균 또는 바이러스 감염에 의한 것인 감염에 의한 LPS-유발성 급성 간부전 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술분야

- [0001] 본 발명은 3' -시알릴락토오스, 6' -시알릴락토오스 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 감염에 의한 다발성 장기부전의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 다발성 장기 부전(多發性臟器不全, 영어: multiple organ dysfunction syndrome, MODS, multiple organ failure, MOF) 또는 총체적 장기 부전은 몸속 장기들이 제 기능을 하지 못하고 멈추거나 심하게 둔해지는 상태를 뜻한다. 원인은 여러 가지가 될 수 있으며, 폐렴, 신장염, 후두염 등을 유발하는 균이 온몸에 돌아다니는 균 혈증 상태일 때나, 패혈증과 같은 증상이 나타날 때, 암으로 인한 항생제 복용으로 면역력이 약해졌을 때 발생할 수 있다.
- [0003] 특히 최근까지 전 세계적으로 2억 이상의 확진자와 455만명의 사망자를 내고 있는 코로나바이러스(COVID-19)의 경우, 기저질환이 있는 70세 이상의 고령에서 높은 사망률을 보고하고 있으나, 감염 전에 특별한 기저 질환이 없는 젊은 환자 중, 급격히 위중한 상태에 빠지게 되어 사망에 이르는 경우가 발생하면서, 바이러스 감염에 의하여 발생하는 “사이토카인 폭풍”이 화두에 오르게 되었다.
- [0004] 사이토카인 폭풍(cytokine storm)은 외부에서 침투한 바이러스에 대항하기 위한 인체 내 면역체계의 과도한 반응이 정상 세포까지 공격하여 일어나는 대규모 염증 반응으로, 사이토카인 방출 증후군(cytokine release syndrome) 또는 고사이토카인혈증(hypercytopenia)으로 불린다. 즉, 외부 바이러스 등의 침투에 의하여 면역 물질인 사이토카인의 과다 분비로 인해 발열이 과도하게 일어나고, 이러한 40도 이상의 고열에 인체 단백질이 노출되면서 단백질 변형이 일어날 수 있다. 그 결과, 정상세포가 면역 세포에 의해 공격을 받을 수 있으며, 면역체계가 과민 반응을 일으켜 신체조직을 파괴하는 과정에서 장기부전의 2차 피해가 발생하게 된다.
- [0005] 스페인 독감 때 주로 25세~45세의 건강한 사람들에게서 매우 높은 사망률을 보인 원인으로 사이토카인 폭풍이 지목되었으며, 조류독감(H5N1)에서도 사이토카인 폭풍으로 유발된 다발성 장기부전 때문에 높은 폐사율이 나타났다. 또한 에볼라 바이러스에서도 같은 증상이 보고되었다.
- [0006] 국내에서는 2015년 메르스 감염자가 확산되었을 때 기저 질환이 없는 젊은 연령대에서 상태 악화를 보이는 환자들이 나타나면서 사이토카인 폭풍 및 다발성 장기부전에 대해서 거론되기 시작하였으며, 코로나-19 대유행에서 사이토카인 폭풍이 일부에서 주요 사인으로 지목하게 되고 있다.
- [0007] 따라서 다발성 장기부전을 일으키는 사이토카인 폭풍이 진행되는 경우, 이를 멈추기 위한 신속한 조치가 이루어져야 하며, 이에 따라 면역시스템 조절 및 면역 과잉반응의 특정 원인을 차단할 수 있는 효과적인 치료제 개발에 대한 연구가 시급한 실정이다.
- [0008] 한편, 시알릴락토스는 포유류의 어미가 새끼에게 주는 주요 영양분인 락토스(유당)에 시알산이 붙어 있는 형태로, 모유의 초유에 가장 많이 들어있는 모유 올리고당 중 하나다. 두뇌 발달과 인지력 개선, 면역기능에 도움을 주는 물질로, 신생아의 병원체에 대한 면역 보호 효과가 있으며, 특히 인플루엔자 바이러스, HIV-1 및 로타바이러스와 같은 박테리아 및 바이러스의 부착 및 감염을 억제하는 것으로 알려져 있다. 또한 콜레라 독소의 결합을 억제하는 것으로 알려져 있다.
- [0009] 종래 선행기술로 한국공개특허 제10-2020-0023226호에는 다가의 시알릴 올리고당 잔기를 포함하는 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물이 기재되어 있으나, 본 발명의 3' -시알릴락토오스, 6' -시알릴락토오스 또는 이의 염을 유효성분으로 함유하는 사이토카인 폭풍 관련 염증질환 예방 또는 치료용 조성물과는 그 구성 및 효과에서 차이가 있다.
- [0010] 한국등록특허 제2065575호에는 인플루엔자 바이러스의 표면에 존재하는 헤마글루티닌과 결합하여 인플루엔자 바이러스의 감염과정을 억제하는 코어와 그의 표면에 결합된 시알산, 시알릴락토스 또는 이들의 유도체를 포함하는 결합체 및 그 용도가 기재되어 있으나, 역시 본 발명의 구성 및 효과와는 차이가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2020-0023226호, 다가의 시알릴 올리고당 잔기를 포함하는 화합물 및 이를

유효성분으로 포함하는 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물, 2020년03월04일. 공개.

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제2065575호, 코어와 그의 표면에 결합된 시알산, 시알릴락토스 또는 이들의 유도체를 포함하는 결합체 및 그의 용도, 2020년01월07일. 등록.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 3' -시알릴락토오스, 6' -시알릴락토오스 또는 이의 염을 유효성분으로 함유하는 감염에 의한 다발성 장기부전의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 3' -시알릴락토오스, 6' -시알릴락토오스 또는 이의 염을 유효성분으로 함유하는 감염에 의한 다발성 장기부전의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0014] 상기 감염은 세균 감염, 바이러스 감염 및 기타 감염질환을 포함한다. 상기 세균 감염은 살모넬라(Salmonella) 속, 클라미도필라(Chlamydomphila) 속, 콕시엘라(Coxiella) 속, 리케치아(Rickettsia) 속, 보렐리아(Borrelia) 속, 바르토넬라(Bartonella) 속, 클라미디아(Chlamydia) 속, 레지오넬라(Legionella), 아나플라스마(Anaplasma) 속, 에를리치아(Ehrlichia) 속, 로칼리마에(Rochalimaea) 속, 브루셀라(Brucella) 속, 프란시셀라(Francisella) 속, 네이세리아(Neisseria) 속, 노카르디아(Nocardia) 속, 로도코커스(Rhodococcus) 속, 스타필로코커스(Staphylococcus) 속, 마이코플라스마(Mycoplasma) 속, 마이코박테리움(Mycobacterium) 속, 예르시니아(Yersinia) 속, 에스케리치아(Escherichia) 속, 엔테로코커스(Enterococcus) 속, 리스테리아(Listeria) 속, 및 스트렙토코커스(Streptococcus)속으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 세균에 의한 감염일 수 있다.

[0015] 또한 상기 바이러스 감염은 인플루엔자바이러스(influenza virus), 신종인플루엔자 A 바이러스(Influenza A virus subtype H1N1), 조류인플루엔자바이러스(avian influenza virus), 리노바이러스(rhinovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 코로나바이러스(coronavirus), 파라인플루엔자바이러스(parainfluenza virus), 호흡기 합포체 바이러스(respiratory syncytial virus), 포진 바이러스(Herpesvirus, HSV), 및 간염바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 바이러스에 의해 감염될 수 있다. 또한 상기 코로나바이러스(coronavirus)는 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 (SARS-CoV), 제2형 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 (SARS-Cov-2), 중등호흡기증후군 코로나바이러스 (MERS-CoV), 인간 코로나바이러스 229E (HCoV-229E), 인간 코로나바이러스 OC43 (HCoV-OC43), 인간 코로나바이러스 NL63 (HCoV-NL63) 및 인간 코로나바이러스 HKU1 로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 이상일 수 있다.

[0016] 상기 기타 감염질환은 원충류 또는 곰팡이에 의한 감염될 수 있으며, 말라리아, 크립토스포리아증, 크립토코쿠스증, 칸디다증, 아메바증, 톡소플라스마증, 아스페르길루스증, 편모충증, 주폐포자충 감염, 스포로트리쿰증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 이상일 수 있다.

[0017] 상기 다발성 장기부전은 상기 감염 등에 의하여 신체에 염증성 반응이 가속화되면서 단기간에 복수의 장기 기능이 저하 또는 상실되어 생명 유지에 위험이 초래된 것을 말한다. '총체적 장기 부전'이라고도 불리며 영어로는 'Multiple Organ Failure(MOF)', 'Multiple Organ Dysfunction Syndrome(MODS)', 'Total Organ Failure(TOF)', 'Multisystem Organ Failure(MSOF)' 등으로 불린다. 상기 다발성 장기부전은 심부전, 호흡부전, 신부전, 간부전 등을 포함하며, 생명유지 활동이 극히 어려워져 사망할 확률이 매우 높아진다.

[0018] 상기 다발성 장기부전은 상기 감염에 의하여 유도되는 사이토카인 폭풍에 의하여 발생할 수 있다. 사이토카인 방출 증후군(cytokine release syndrome) 또는 고사이토카인혈증(hypercytoinemia)으로도 불리는 사이토카인 폭풍(cytokine storm)은 외부에서 침투한 바이러스 등에 대항하기 위한 인체 내 면역체계의 과도한 반응이 정상 세포까지 공격하여 일어나는 대규모 염증 반응이다.

[0019] 본 발명의 3' -시알릴락토오스, 6' -시알릴락토오스 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 LPS에 의하여 증가되는 염증성 사이토카인 TNF- α , IL- β 및 GM-CSF의 증가를 억제할 수 있다. 또한 LPS에 의한 증가되는 LDH, GPT, GOT, CPK 및 BUN의 수치를 저감시킴으로써 염증반응을 개선할 수 있

다.

- [0020] 본 발명의 3' -시알릴락토오스, 6' -시알릴락토오스 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 LPS에 의하여 증가하는 간 및 폐 조직의 조직 손상도를 저감시킬 수 있다.
- [0021] 본 발명은 3' -시알릴락토오스, 6' -시알릴락토오스 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0022] 상기 3' -시알릴락토오스, 6' -시알릴락토오스 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 약학적 조성물로 제공될 수 있다. 상기 3' -시알릴락토오스 또는 6' -시알릴락토오스는 전체 약학 조성물 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.001~50중량%, 더 바람직하게는 0.001~40중량%, 가장 바람직하게는 0.001~30중량%로 하여 첨가될 수 있다.
- [0023] 상기 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 액제, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제, 감미제, 산미제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 가용화된 데커시놀에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토즈, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제, 산미제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween)-61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여 경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 500mg/kg/일의 범위이다. 바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 200mg/kg/일이며, 더 바람직한 투여량은 1mg/kg/일 내지 200mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 약학적 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사 및 피부 도포에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 3' -시알릴락토오스 또는 6' -시알릴락토오스는 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.
- [0026] 본 발명은 3' -시알릴락토오스, 6' -시알릴락토오스 또는 이의 염 및 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0027] 상기 건강기능식품은 3' -시알릴락토오스 또는 6' -시알릴락토오스가 전체 식품 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.001~50중량%, 더 바람직하게는 0.001~30중량%, 가장 바람직하게는 0.001~10중량%로 하여 첨가될 수 있다.
- [0028] 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성식품류 등이 있다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명은 3' -시알릴락토오스, 6' -시알릴락토오스 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 감염에 의한 다발성 장기부전의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 박테리아 또는 바이러스 감염으로 유도된 사이토카인 폭풍에 의한 중증화의 억제와 예방으로 이환율 및 사망률의 개선에 중요한 역할을 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 LPS 유도 급성 과잉 염증 mouse 모델을 활용한 실험 계획을 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 LPS 유도 급성 과잉 염증 mouse 모델에서 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)가 TNF- α (A), IL-1 β (B) 및 GM-CSF(C)에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 LPS 유도 급성 과잉 염증 mouse 모델에서 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)가 LDH(A), GPT(B), GOT(C), CPK(D) 및 BUN(E)에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 LPS 유도 급성 과잉 염증 mouse 모델에서 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)가 간 및 폐의 조직 손상에 미치는 영향을 나타낸 결과이다. (A) 간 조직 현미경 사진, (B) 간 손상 평가, (C) 폐 조직 현미경 사진, (D) 폐 손상 평가.
- 도 5는 LPS 유도 급성 과잉 염증 mouse 모델의 간에서 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)가 면역세포 침입에 미치는 영향을 나타낸 결과이다. (A) 간 조직에서 CD45 면역형광염색 사진, (B) 간 조직에서 CD45 형광 강도 평가 (C) 간 조직에서 면역세포 침윤 평가
- 도 6은 LPS 유도 급성 과잉 염증 mouse 모델의 폐에서 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)가 면역세포 침입에 미치는 영향을 나타낸 결과이다. (A) 폐 조직에서 CD45 면역형광염색 사진, (B) 폐 조직에서 CD45 형광 강도 평가 (C) 폐 조직에서 면역세포 침윤 평가
- 도 7은 LPS 유도 급성 과잉 염증 mouse 모델의 간 및 폐에서 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)가 STAT3 활성화에 미치는 영향을 나타낸 결과이다. (A) 간 조직에서 p-STAT3 면역형광염색 사진, (B) 간 조직에서 p-STAT3 형광 강도 평가 (C) 폐 조직에서 p-STAT3 면역형광염색 사진, (D) 폐 조직에서 p-STAT3 형광 강도 평가
- 도 8은 LPS 유도 급성 과잉 염증 mouse 모델의 간 및 폐에서 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)가 STAT1/STAT3 활성 기전에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.
- 도 9는 6' -시알릴락토오스(GCV200)의 SARS-CoV-2 Spike pseudotype virus assay 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.
- [0032] <실험예 1. LPS 유도 급성 과잉 염증 쥐(mouse) 모델에서 3' -시알릴락토오스 또는 6' -시알릴락토오스의 사이토카인 발현에 대한 효과 확인>
- [0033] 3' -시알릴락토오스 또는 6' -시알릴락토오스의 급성 염증성 장기 손상 보호 효과를 확인하기 위하여 LPS 유도 급성 과잉 염증 mouse 모델을 사용하여 3' -시알릴락토오스 또는 6' -시알릴락토오스의 장기 손상 보호 효능을 평가하였다.
- [0034] ICR 마우스에 10 mg/kg 리포폴리사카라이드(Lipopolysaccharide, LPS, 이하 LPS)를 복강내 주사(I.P. injection)로 24시간 동안 처리하여 급성 염증 모델을 제작하였다. 6개의 실험군을 표 1과 같이 나누고, 각 실험군 당 7~8마리의 ICR 마우스를 할당하였다. LPS에 의한 급성 과잉 염증을 유도하기 2시간 전에 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)를 각각 100 mg/kg 용량으로 복강내(I.P.) 투여하였다. 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)의 투여 및 LPS 처리 시간표는 도 1에 나타내었다.

표 1

Group	Treatments	Mice number
1	Vehicle	7
2	GCV100 100 mg/kg	8
3	GCV200 100 mg/kg	8
4	LPS 10 mg/kg	8
5	LPS + GCV100	8
6	LPS + GCV200	8

- [0036] LPS 24시간 처리 후 혈액을 채취하여 혈청 내 TNF- α (A), IL-1 β (B) 및 GM-CSF의 분비량을 ELISA 분석을 통해 확인하고 도 2에 나타내었다. 각 사이토카인량은 운반체(Vehicle, V도)만을 처리한 대조군에 대한 상대값으로 표시하였다.
- [0037] IL-1 β 는 염증과 면역 반응을 조절하는 핵심 사이토카인으로 세포 내부의 NF- κ B와 MAPK 등의 신호 전달 경로를 활성화시켜 TNF- α , GM-CSF 같은 염증성 사이토카인들과 염증과 면역 반응들에 관여하는 다양한 단백질들의 발현을 유도한다. 또한 TNF- α 는 주로 대식세포에 의해 분비되는 전 염증성 사이토카인으로 면역 세포의 조절, 세포 증식, 분화 등에 관여한다. IL-1 β 의 영향을 받는 또 다른 염증성 사이토카인인 GM-CSF는 과립구와 대식세포의 생성을 재생함으로써 중요한 사이토카인 효과를 보인다.
- [0038] 도 2에서 보는 바와 같이, LPS에 의하여 혈청 내 TNF- α 의 수준은 5500% 이상 증가하였으며, 3'-시알릴락토오스(GCV100) 또는 6'-시알릴락토오스(GCV200) 각 100 mg/kg에 의하여 혈청 내 TNF- α 의 수준은 감소하는 경향을 나타내었다. IL-1 β 및 GM-CSF의 혈청 내 분비량 또한 LPS에 의하여 급격히 증가하였으며, 증가한 사이토카인은 3'-시알릴락토오스(GCV100) 또는 6'-시알릴락토오스(GCV200)에 의하여 감소하였다. 특히 3'-시알릴락토오스(GCV100) 처리는 LPS 유도에 의하여 증가된 IL-1 β 및 GM-CSF의 혈청 내 수준을 모두 유의하게 감소시켰으며, 6'-시알릴락토오스(GCV200) 또한 LPS 유도에 의하여 증가된 GM-CSF의 혈청 내 수준을 유의하게 감소시켰다.
- [0039] 상기 결과에서 보는 바와 같이, 3'-시알릴락토오스(GCV100) 또는 6'-시알릴락토오스(GCV200)의 투여는 LPS로 증가된 TNF- α , IL-1 β , GM-CSF를 감소시키는 것을 확인하였다.
- [0040] <실험예 2. LPS 유도 급성 과잉 염증 mouse 모델에서 3'-시알릴락토오스 또는 6'-시알릴락토오스의 장기 손상 지표 대한 효과 확인>
- [0041] 상기 실험예 1에서 수득한 각 실험군의 혈청으로부터 대사 상태, 장기의 손상 정도를 평가할 수 지표인 글루타민 옥사로아세틱 트랜스아미나제(Glutamate Oxaloacetate Transaminase, GOT), 글루타민-피루베이트 트랜스아미나제(Glutamic Pyruvic Transaminase, GPT), 크레아틴 인산화효소(Creatine Phosphokinase, CPK), 혈액요소질소(blood urea nitrogen, BUN) 및 젖산탈수소효소(Lactate Dehydrogenase, LDH)를 생화학적 분석을 통해 확인하고, 이를 도 3에 나타내었다.
- [0042] 혈중 젖산탈수소효소(Lactate Dehydrogenase, LDH)는 여러 조직 세포 중에 함유되어 있으며 악성종양, 간 질환, 심장 질환 등에서 고활성을 보이는 경우가 많아 질환 스크리닝을 위한 분석에 이용되고 있으며, 글루타민 옥사로아세틱 트랜스아미나제(Glutamate Oxaloacetate Transaminase, GOT) 및 글루타민-피루베이트 트랜스아미나제(Glutamic Pyruvic Transaminase, GPT)는 혈액을 통해 간으로 들어온 아미노산들을 glutamate로 전달하는 효소로, 간에 풍부하게 존재하며 간세포가 파괴될 시에 혈중으로 유출되어 간 손상의 지표로 사용 가능하다. 또한, 다양한 조직과 세포 유형에서 발견되는 크레아틴 인산화효소(Creatine Phosphokinase, CPK)는 근육 조직의 손상을 분석할 수 있으며, 혈액요소질소(blood urea nitrogen, BUN)는 단백질 분해 중 체내에서 생성되는 질소 요소 수치를 의미하며 신장 손상의 지표가 된다.
- [0043] 도 3에서 보는 바와 같이, LPS 투여는 LDH, GOT, GPT, CPK 및 BUN의 농도를 현저히 증가시켰으며, 3'-시알릴락토오스(GCV100) 또는 6'-시알릴락토오스(GCV200) 각 100 mg/kg 처리에 의하여 CPK 및 BUN의 수준이 유의하게 감소하였다. 또한, 3'-시알릴락토오스(GCV100) 처리에 의하여 GPT 수준이 유의하게 감소하였고, 6'-시알릴락토오스(GCV200) 처리에 의하여 LDH 및 GOT 수준이 유의하게 감소하였다. 그리고 통계적으로 유의성을 나타내지 않은 모든 실험군에서 LPS 유도에 의해 증가된 장기 손상지표는 3'-시알릴락토오스(GCV100) 또는 6'-시알릴락토오스(GCV200)에 의하여 감소하는 경향을 나타내었다.
- [0044] <실험예 3. 헤마톡실린과 예오신(H&E) 염색을 통한 조직 손상도 분석>
- [0045] 상기 실험예 1에서 동물을 희생시킨 후 적출한 간과 폐의 조직을 H&E 염색을 통하여 조직 손상도를 분석하였다. 적출한 간과 폐의 조직을 4% 포르말린(Formalin)으로 고정하고, 탈수분 과정을 통하여 파라핀을 이용하여 조직을 고정한 다음, 파라핀에 끼워진 조직을 조직절단기를 통하여 5 μ m 두께로 잘랐다. 잘려진 조직을 자일렌(xylene)을 통한 파라핀 제거와 에탄올을 통한 탈수분과정을 진행 후 헤마톡실린(hematoxylin) 시약을 통한 조직 내 세포 핵 염색과 예오신 Y(eosin Y)를 통한 조직내 세포 질 염색을 진행하였다. 염색 완료 후, 현미경을 통하여 조직내 손상도를 확인하고 장기 손상도 기준에 따라 평가하여 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0046] 간조직의 손상도는 아무런 이상이 없는 정상상태인 경우 0단계, 염증으로 인한 조직 내 상처가 있는 경우, 지방

간과 같은 1단계, 많은 상처와 면역세포인 호중성 과립구의 조직내 침입으로 간병변과 같이 보이는 경우 2단계, 간경화증과 같은 조직내 많은 상처와 세포내 손상으로 인한 세포벽 붕괴가 생성되어 괴사(necrosis)가 보이는 경우 3단계 이상으로 판단하였다.

[0047] 폐조직의 손상도는 염증으로 인한 작은 손상이 있는 경우 1단계, 염증으로 인한 폐조직 붕괴가 보이는 2단계, 폐포 중격의 비후와 폐포세포의 증식이 나타나는 경우 3단계, 폐의 염증으로 발생한 폐장염과 폐결절로 인한 구조적 붕괴가 나타나는 경우 4단계로 평가하였다.

[0048] 도 4A 및 4B에서 보는 바와 같이, LPS를 단독으로 투여군에서는 간손상도는 2~3단계로 평가되었으며, LPS에 의한 염증 유도 전 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)를 각 100 mg/kg 처리한 경우, 두 물질 모두에서 간 손상도가 1 단계로 감소되었다.

[0049] 또한 도 4C 및 4D에서 보는 바와 같이, LPS를 단독으로 투여군에서는 폐포의 두께가 증가되면서 구조적 붕괴가 관찰되면서 폐손상도는 3~4단계로 평가되었으며, LPS에 의한 염증 유도 전 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)를 각 100 mg/kg 처리한 경우, LPS 처리에 의한 폐의 구조적 붕괴는 관찰되지 않았으며 폐포의 두께가 두꺼워지는 점이 관찰되어 폐손상도가 1~2 단계로 감소되는 것을 확인하였다.

[0050] 본 실험결과, LPS로 유도된 염증모델에서 급성염증반응을 통한 간과 폐의 손상은 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)의 투여에 의해 감소되어 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)이 간과 폐의 손상 보호효과를 갖는 것을 확인하였다.

[0051] <실험예 4. CD45 면역형광염색기법>

[0052] 면역형광염색기법은 항체에 형광을 표지하여 잘려진 조직 내 항원과 반응시킨 후 형광을 쬔어 시료내 항원의 위치를 확인할 수 있는 검사이다. 상기 실시예 1에서 얻은 실험 동물의 간 및 폐 조직 내 CD45를 면역형광염색기법을 통하여 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)의 CD45 발현에 미치는 효과를 확인하였다.

[0053] CD45는 급성 및 만성염증반응에서의 면역세포 조절자로서, 특히 T cell 또는 B cell과 직접적으로 항원수용체와 반응하여 염증세포의 신호전달기전을 조절한다. 또한 인터페론 감마를 통한 STAT1 신호전달(STAT1 signaling pathway)에 의하여 대식세포의 염증반응을 증가시키는 마커 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0054] 상기 실시예 3에서 얻은 간 및 폐 조직을 파라핀에 고정시키고 5 μ m로 절단 및 파라핀 제거, 탈수분 과정을 거친 후 CD45항체를 2 시간동안 반응시켰다. 반응 후, 형광이 결합된 2차 항체를 반응시킨 다음, 반응종료 후, DAPI로 핵을 염색하고 형광 강도 및 침윤 면역세포수를 계산하여 그 결과를 도 5 및 6에 나타내었다.

[0055] 간 조직에서는 도 5A 및 5B에서 보는 바와 같이, LPS-유도 과염증 간에서 대조군(Vehicle)과 비교하여 CD45의 발현이 3배이상 증가되었으며, 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)를 각 100 mg/kg 처리한 경우, CD45의 발현이 1/2로 감소하는 것을 확인하였다. 또한 도 5C에서 보는 바와 같이, LPS-유도 과염증 간에서 대조군(Vehicle)과 비교하여 간 조직 내 침투되었던 면역세포의 개수는 대조군(Vehicle)과 비교하여 2배이상 증가하였으며, 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)를 각 100 mg/kg 처리한 경우, 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 간과 폐조직내 침윤 면역세포수(infiltrated immune cell) 분석의 경우, Hematoxylin&Eosin에 염색된 조직사진을 분석하였다. 조직사진 내 hematoxylin으로 염색된 핵의 morphology 차이를 통해서 면역세포를 판별 후 각 조직내 침투한 면역세포의 수를 분석하였고, 그래프 내 데이터는 대조구인 control 그룹과의 배수 차이로 표시하였다.

[0056] 또한 폐 조직에서 도 6A 및 6B에서 보는 바와 같이, LPS에 의해 증가되었던 CD45의 발현이 GCV100과 GCV200처리에 의하여 1/2배 가까이 각각 감소되었으며, 더불어 도 6C에서 보는 바와 같이, 폐 조직에 침투되었던 면역세포의 개수도 GCV100과 GCV 200처리군에서 모두 유의적으로 감소하였다.

[0057] <실험예 5. 면역형광염색기법 통한 조직내 STAT3 활성화 확인>

[0058] STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) 활성화는 LPS에 의해 유도된 TLR4 (Toll like receptor 4) 활성을 통한 면역기작 중 하나이다. LPS에 의해 활성화된 TLR4는 골수 분화 1차 반응 88(Myeloid differentiation primary response 88, Myd88)을 활성을 통해 NF- κ B라는 전사인자의 활성을 조절함으로써 인터페론, 인터루킨(interleukin), 그리고 사이토카인들의 유전자 발현을 유도하며, 이와같이 발현된 염증성 사이토카인들은 세포 밖으로 배출되면서 각자의 수용체(receptor)를 활성화시킨다. 이렇게 활성화된 receptor 중에 인터페론 리셉터가 있으며, 인터페론 감마에 의해 활성화된 리셉터는 STAT3의 활성을 증가시킨다. 활성화된 STAT3는

핵 안으로 들어가 전사인자로서 면역 반응 물질들의 발현을 증가시킨다.

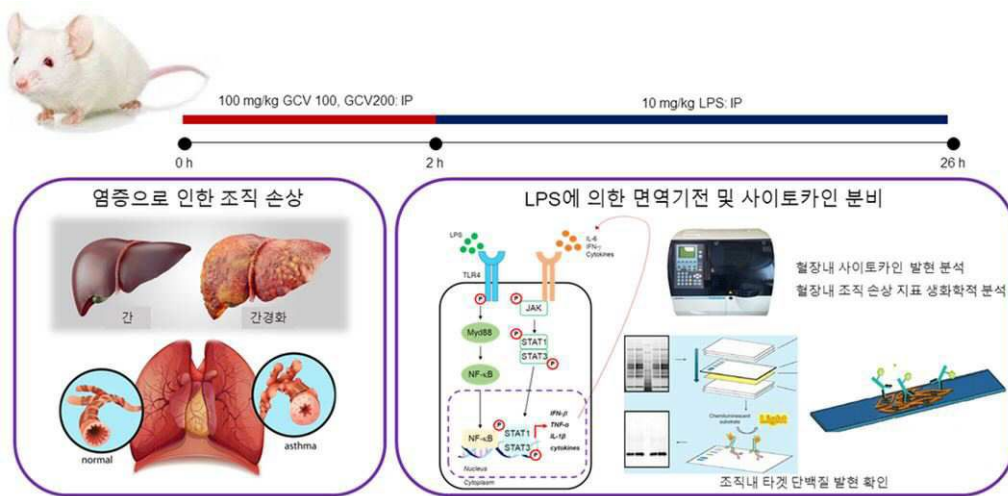
- [0059] 본 발명자들은 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)가 LPS에 의하여 유도되는 과염증 동물모델에서 염증반응을 억제하는 기전을 확인하기 위하여 면역형광염색기법 통한 조직 내 STAT3 발현을 확인하였다.
- [0060] 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 얻은 실험 동물의 간 및 폐 조직 내 STAT3를 면역형광염색기법을 실시예 4의 방법을 변형하여 조직 내 STAT3 발현을 확인하고 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0061] 도 7A 및 7B에서 보는 바와 같이, LPS는 간에서의 STAT3 발현을 음성대조군과 비교하여 3배이상 증가시켰으며, 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200) 전처리 시, LPS에 의해 증가된 STAT3 발현을 약 50% 감소시켰다.
- [0062] 폐 조직에서 또한 도 7C 및 7D에서 보는 바와 같이, LPS에 의해 증가되었던 STAT3 발현이 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)에 의하여 유의적으로 감소하였다.
- [0063] <실험예 6. 웨스턴 블랏을 통한 조직내 STAT1/3 단백질 발현 확인>
- [0064] 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)가 LPS에 의하여 유도되는 과염증 동물모델에서 염증반응을 억제하는 기전을 확인하기 위하여 STAT1/3 단백질발현을 웨스턴 블랏을 통해 확인하였다.
- [0065] 실시예 1과 동일한 방법으로 적출한 간과 폐는 -70℃에 보관한 후 6 mg 조직을 2X SDS buffer를 이용하여 용해시키고, 용해시킨 조직은 SDS-PAGE gel에 loading 한 후 항 STAT1 및 STAT3 항체를 이용하여 웨스턴 블랏을 실시하고 도 8에 나타내었다.
- [0066] STAT1은 STAT3와 함께 면역기전 관련 인자로, 인터루킨-6(interleukin-6)의 하위 기전이나 TLR4의 하위기전을 통하여 활성화되며, NF-κB와 결합하여 면역반응과 관련이 있는 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다.
- [0067] 도 8에서 보는 바와 같이, 대조군(Veh)과 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200) 단독처리군에서는 간 조직에서 STAT1과 STAT3의 활성 변화는 없었지만, LPS와 동시 처리군에서 STAT1과 STAT3의 활성이 모두 증가하였다. 그러나, 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)를 전처리한 경우, LPS에 의해 증가된 STAT1과 STAT3의 활성을 모두 억제하는 것을 확인하였다. 또한 폐조직에서도 폐 조직에서도 LPS 처리는 STAT1과 STAT3의 활성을 모두 증가시켰으며, 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)를 처리한 경우, LPS에 의해 증가된 STAT1과 STAT3의 활성을 모두 감소시켰다. 특히 6' -시알릴락토오스(GCV200) 처리군에서 더 뛰어난 억제효과를 확인하였다.
- [0068] 이와 같은 결과를 통하여 간과 폐조직에서 LPS에 의해 증가된 STAT1/STAT3 기전의 활성화는, LPS에 의해 유도된 급성 염증 반응으로 인해 증가한 STAT1/STAT3의 발현을 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)의 처리가 감소시켜 과염증 모델에서 항염증 효과를 가짐을 나타낸다.
- [0069] 급성 염증에 의한 과염염반응은 염증성 질환인 관절염과 아토피뿐만 아니라, 간, 폐, 그리고 신장과 같은 여러 조직의 손상을 야기시키며, 여러 염증유발인자들을 통하여 염증 기작이 시작되면, 대식세포들과 같은 염증세포들의 활성이 나타나게 된다. LPS에 의해 활성화된 대식세포는 TNF-α, IL-6, 그리고 IL-1β와 같은 전염증성 사이토카인들을 분비하게 되며, 이렇게 세포밖으로 분비된 전염증성 사이토카인들은 대식세포의 세포막에 존재하는 각자의 리셉터에 접합하게 되면서 리셉터는 활성화되어 각각 가지고 있는 염증 기전들을 활성화시킨다. 이들 염증 기전들은 다시 염증성 사이토카인을 분비하게 되면서 양성피드백으로 염증성 사이토카인이 농도가 과도하게 높아지게 된다.
- [0070] 본 발명은 LPS에 투여로 인해 유도된 급성 면역동물 모델에서 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)의 효과를 확인하였다.
- [0071] LPS 투여에 의해 각 조직의 손상도는 최소 1.6배에서 4배 이상 증가하였고, 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200) 투여에 의해 모두 유의적으로 감소되었다. 또한 LPS 투여에 의해 간은 간경화정도의 손상도를 보였고, 폐에서는 폐결절과 폐장염과 같은 질환의 모습을 보였으나, 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200) 투여로 각각 유의적으로 간과 폐손상이 모두 감소하였다. 특히 간의 경우는 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200) 투여하였을 때 LPS 처리에 의해 간경화와 같은 모습에서 지방간과 같은 약간의 염증이 보이는 수준으로 감소되었으며, 폐의 경우 LPS 처리에 의하여 폐 구조가 모두 무너지고, 염증으로 증식된 폐포가 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200) 투여 시, 폐

손상이 현저하게 감소되었다.

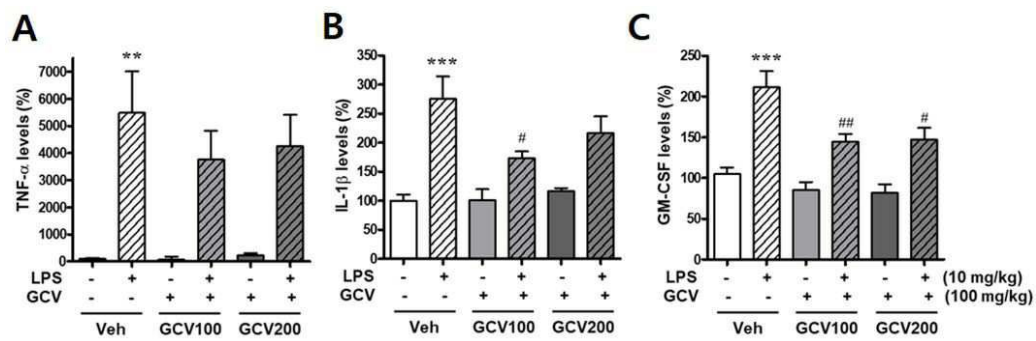
- [0072] 상기와 같은 효과는, 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200) 처리는 LPS 투여로 인한 급성염증에서의 간과 폐의 손상을 억제하고, 염증기전을 억제하였으며, 간과 폐조직에서 염증세포를 침윤을 억제하였다. 또한 LPS에 의하여 간과 폐 조직에서 2~3배 이상 증가된 STAT3의 발현을 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)가 각각 현저히 억제하는 것을 확인함으로써 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)가 STAT1/STAT3 활성 억제를 통하여 전염증성 사이토카인의 발현을 감소시킬 수 있음을 알 수 있었다.
- [0073] <실험예 7. 시험관내 사스-코브-2 스파이크 유사형 바이러스 검정(in vitro SARS-CoV-2 Spike pseudotype virus assay)>
- [0074] 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200)가 SARS-CoV-2의 스파이크 단백질의 발현을 억제할 수 있는지 확인하기 위하여 SARS-CoV-2 Spike pseudotype virus assay를 시행하였다.
- [0075] 100 복제수(copy number)의 VSV-G, SARS-CoV-2 spike (WT) 및 SARS-CoV-2 spike (D614G) pseudotype virus들에 6' -시알릴락토오스(GCV200)를 10~80 mM 농도로 처리하여 루시퍼레이즈 활성(luciferase activity)을 측정하여 도 9에 나타내었다.
- [0076] 도 9에서 보는 바와 같이, 6' -시알릴락토오스(GCV200)가 농도 의존적으로 SARS-CoV-2 야생형(Wild type) 및 D614G 변이 pseudotype virus의 세포내 유입을 억제하는 것을 확인하였다.
- [0077] <제제예 1. 약학적 제제>
- [0078] 제제예 1-1. 정제의 제조
- [0079] 본 발명의 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200) 200mg을 락토즈 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄하여 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활성 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.
- [0080] 제제예 1-2. 주사액제의 제조
- [0081] 본 발명의 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200) 100mg, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100ml를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.
- [0082] <제제예 2. 건강기능식품의 제조>
- [0083] 제제예 2-1. 건강기능식품의 제조
- [0084] 본 발명의 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200) 2g, 비타민 혼합물 적량, 비타민 A 아세테이트 70 μ g, 비타민 E 1.0mg, 비타민 B1 0.13mg, 비타민 B2 0.15mg, 비타민 B6 0.5mg, 비타민 B12 0.2 μ g, 비타민 C 10mg, 비오틴 10 μ g, 니코틴산아미드 1.7mg, 엽산 50 μ g, 판토텐산 칼슘 0.5mg, 무기질 혼합물 적량, 황산제1철 1.75mg, 산화아연 0.82mg, 탄산 마그네슘 25.3mg, 제1인산칼륨 15mg, 제2인산칼슘 55mg, 구연산칼륨 90mg, 탄산칼슘 100mg, 염화마그네슘 24.8mg을 섞어 과립으로 제조하였으나, 용도에 따라 다양한 제형으로 변형시켜 제조할 수 있다. 또한, 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하여 제조할 수 있다.
- [0085] 제제예 2-2. 건강기능성 음료의 제조
- [0086] 본 발명의 3' -시알릴락토오스(GCV100) 또는 6' -시알릴락토오스(GCV200) 1g, 구연산 0.1g, 프락토올리고당 100g, 정제수 900g을 섞어 통상의 음료 제조방법에 따라 교반, 가열, 여과, 살균, 냉장하여 음료를 제조하였다.

도면

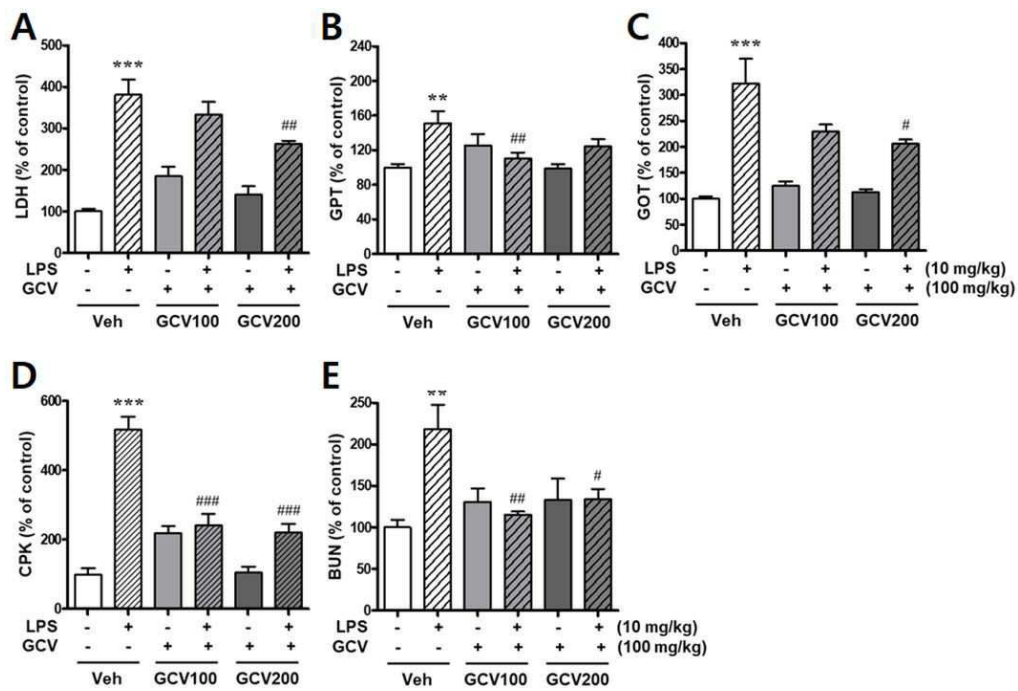
도면1



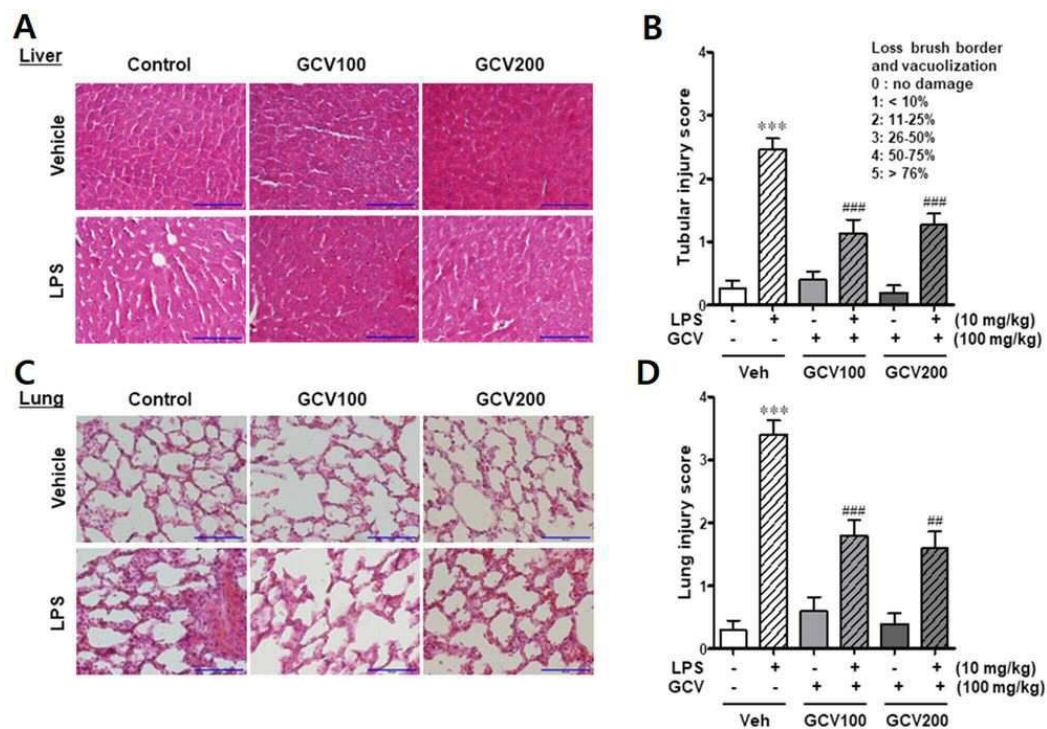
도면2



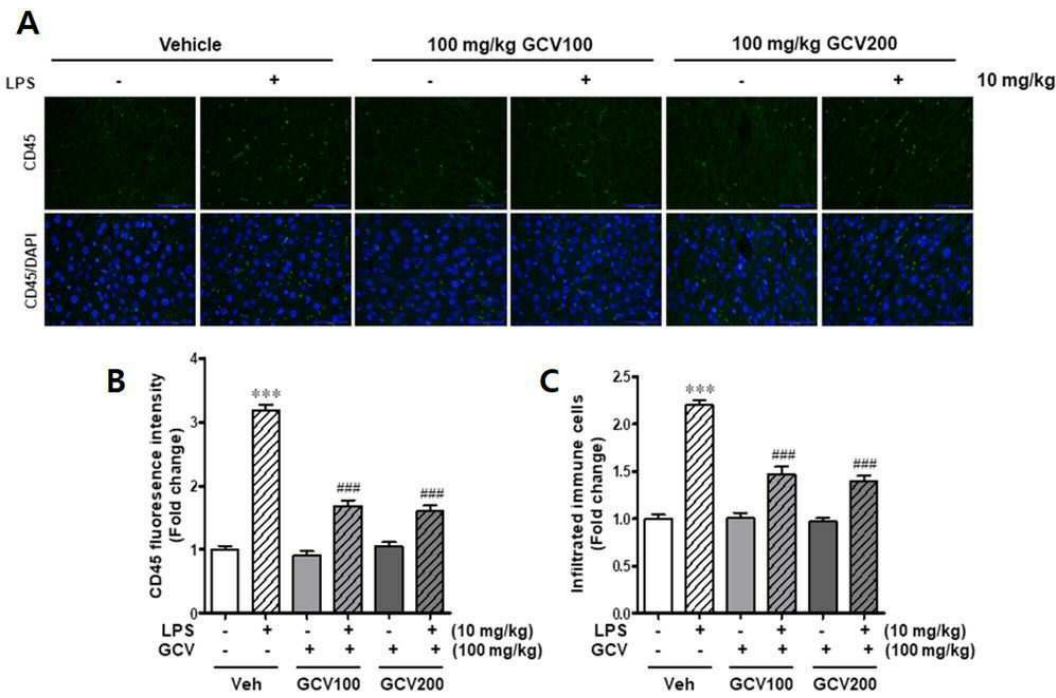
도면3



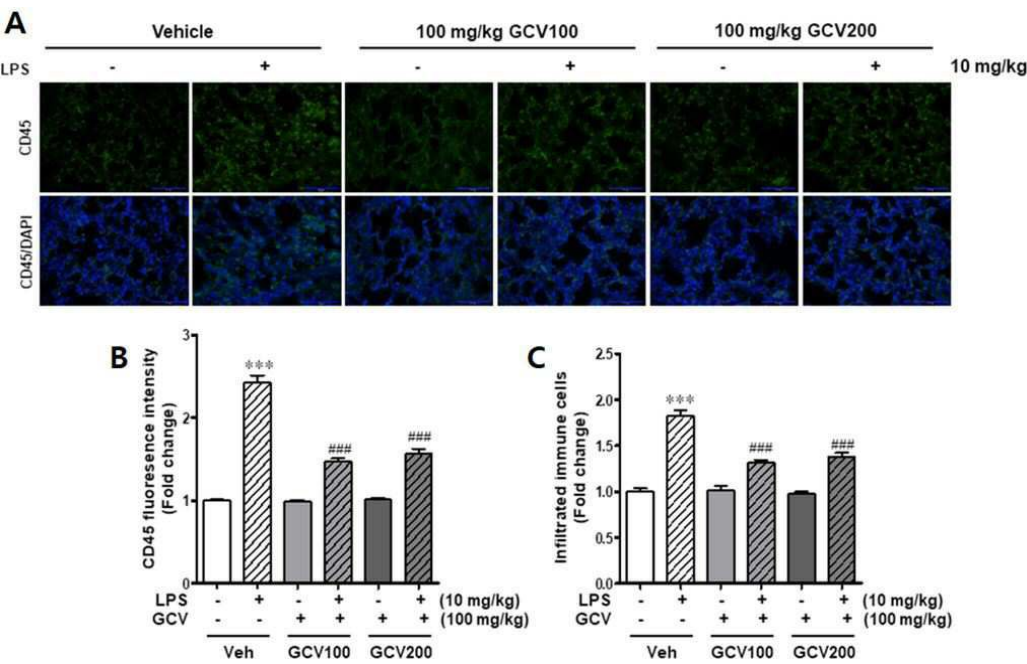
도면4



도면5



도면6



도면9

