



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년08월20일
(11) 등록번호 10-1890062
(24) 등록일자 2018년08월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/443 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61K 35/64 (2015.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/443 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0036816
(22) 출원일자 2017년03월23일
심사청구일자 2017년03월23일
(56) 선행기술조사문헌
KR101725070 B1
KR1020140065489 A

(73) 특허권자
동아대학교 산학협력단
부산광역시 사하구 낙동대로550번길 37, 동아대학교 내 (하단동)
세종대학교 산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
전미라
부산광역시 해운대구 좌동순환로299번길 11, 203동 1602호 (좌동, 벽산2차아파트)
윤금주
부산광역시 사하구 장평로41번길 19, 1동 208호 (장림동, 벽산마마빌라)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 11 항

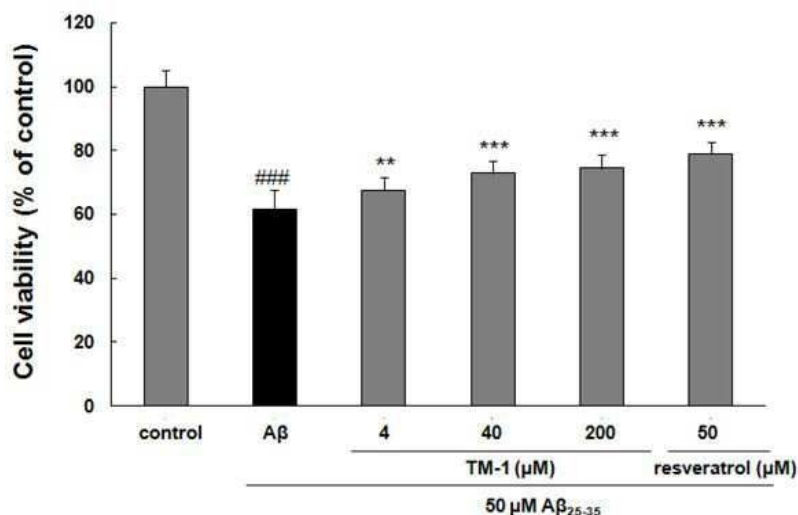
심사관 : 광희찬

(54) 발명의 명칭 갈색거저리로부터 분리한 화합물을 함유하는 퇴행성 뇌질환 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 갈색거저리(*Tenebrio molitor*)로부터 분리한 화합물을 함유하는 퇴행성 뇌질환 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 화합물 TM-1은 갈색거저리에 존재하는 화합물로서, 세포 독성이 거의 없는 반면, A β 로 유도한 독성에 대해 신경세포를 보호하고, 산화적 스트레스 억제할 뿐만 아니라 염증성 반응조절 전사인자인 NF- κ B 및 상위 단계인 JNK 및 p38 MAPKs의 인산화를 억제할 통해 염증성 biomarker들의 발현을 차단시키는 항 염증 효능을 가지고 있으므로, 화합물 TM-1은 퇴행성 뇌질환(특히, 알츠하이머성 치매) 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 35/64 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

(72) 발명자

이천아

부산광역시 사하구 감천로73번길 25 (감천동)

이승은

경상남도 김해시 평전로 219, 202동 607호 (내동,
한진사원아파트)

윤은영

서울특별시 광진구 능동로 209, 다산관 104호 (군
자동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 311006-3

부처명 국립농업과학원

연구관리전문기관 국립농업과학원

연구사업명 위탁연구

연구과제명 곤충자원의 식약용 소재화를 위한 약리성 검정 및 독성 평가

기 여 율 50/100

주관기관 동아대학교 산학협력단

연구기간 2013.08.01 ~ 2014.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017-0103

부처명 부산광역시

연구관리전문기관 부산광역시

연구사업명 Brain Busan 21 project

연구과제명 식품유래 고령친화 생리활성물질의 탐색

기 여 율 50/100

주관기관 동아대학교 산학협력단

연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31

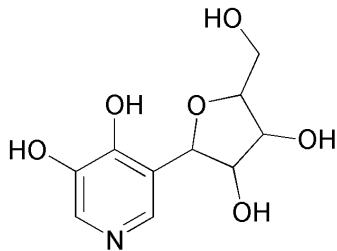
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병, 경도인지장애, 뇌졸중, 치매, 크로이츠펔트-야콥병, 다발성경화증, 파킨슨병, 루게릭병, 헌팅턴병, 픽병, 근위축성 측삭 경화증 및 중풍으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병 또는 치매인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 베타-아밀로이드 단백질($A\beta$)에 의해 유도되는 PC12 (pheochromocytoma 12) 세포의 독성을 저감하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 베타-아밀로이드 단백질($A\beta$)에 의해 유도되는 PC12 (pheochromocytoma 12) 세포에서의 산화적 스트레스를 저감하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 베타-아밀로이드 단백질($A\beta$)에 의해 유도되는 PC12 (pheochromocytoma 12) 세포에서의 세포자살을 저감하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 베타-아밀로이드 단백질($A\beta$)에 의해 유도되는 PC12 (pheochromocytoma 12) 세포에서의 염증매개인자 iNOS 및 COX-2를 저감하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 8

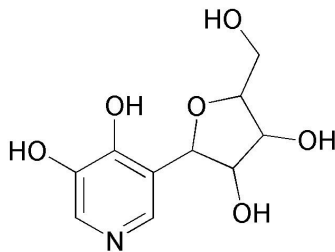
제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 베타-아밀로이드 단백질($A\beta$)에 의해 유도되는 PC12 (pheochromocytoma 12) 세포에서의 NF- κ B 및 I- κ B 발현을 저감하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 9

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

[화학식 1]



청구항 10

제9항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병, 경도인지장애, 뇌졸중, 치매, 크로이츠펔트-야콥병, 다발성경화증, 파킨슨병, 루게릭병, 헌팅턴병, 픽병, 근위축성 측삭 경화증 및 중풍으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병 또는 치매인 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 갈색거저리(*Tenebrio molitor*)로부터 분리한 화합물을 함유하는 퇴행성 뇌질환 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0003] 알츠하이머성 치매(Alzheimer's disease; AD)는 점진적인 신경계 손실로 인한 기억, 인지 기능 손상 등이 나타나는 신경퇴행성 질환이다. AD의 주요 병리학적 특징 중 하나인 신경반은 A β 축적으로 생성된다. A β 는 아밀로이드 전구단백질(amyloid precursor protein, APP)에서 β -secretase (BACE1)와 γ -secretase에 의해 순차적으로 절단되어 생성되며, A β 가 신경 세포에서 발생시키는 산화적 스트레스 및 염증반응은 AD 진행에 관여하게 된다.
- [0005] 뇌신경세포에서 A β 로 인해 생성된 산화적 스트레스는 신경 세포막의 과산화를 일으키고, DNA와 RNA 손상 및 단백질 변성을 일으키며 세포 사멸을 야기한다. 산화적 스트레스로 인해 발생하는 활성산소종(reactive oxygen species:ROS)은 미토콘드리아에서 시토크롬 C의 유리화 caspase-3 활성화를 일으켜 세포사멸을 가져오며, 세포 내에 Ca²⁺의 증가는 caspase-2의 활성화를 가져와 DNA 손상을 초래한다.
- [0007] NF- κ B는 면역 및 염증 반응을 조절하는 전사 유전자 단백질로, A β 로 유발된 염증성 사이토카인 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NF- κ B는 정상시에는 I- κ B와 결합되어 불활성화된 상태로 존재하지만, A β 와 같은 자극에 의해 I- κ B kinases (IKK) 복합체가 활성화되고 I- κ B가 인산화 되면 NF- κ B를 유리시키게 된다. I- κ B로부터 유리된 NF- κ B는 핵 내로 이동하여 전염증성 사이토카인 및 iNOS, COX-2와 같은 염증 매개 단백질의 전사를 촉진한다.
- [0009] 갈색거저리는 딱정벌레목 거저리과 (*Coleoptera Tenebrionidae*)에 속하는 곤충으로 중국, 캄보디아, 태국 및 베트남에서는 식용으로 널리 사용되고 있으며, 단백질 함량이 풍부하고 필수아미노산 조성이 좋은 것으로 밝혀진 바 있다. 갈색거저리 유충은 지난 2014년 식품의약품안전처로부터 한시적 식품원료로 인정되었으며, 2016년 일반식품원료로 승인받아 국내 최초로 식용이 허가된 곤충이다.
- [0011] 현재까지 유용곤충자원인 갈색거저리는 항염증 (등록 제10-1424125000호), 항비만(등록 제10-1651907000호), 항당뇨 (등록 제10-1651908000호) 등의 약리적 효과가 밝혀졌다. 또한, 앞서 본 발명자들은 갈색거저리 추출물의 치매 예방효과를 밝혔으며(등록 제10-1404566호), 갈색거저리로부터 분리한 신규 화합물 3-[2,3-dihydroxy-4-(hydroxymethyl) tetrahydrofuran-1-yl]pyridine-4,5-diol의 분리 동정에 성공하였으며, 이를 TM-1이라 명명하였다 (출원 제10-2016-0041492호). 하지만, 갈색거저리에 함유되어 있는 유용 물질 TM-1의 항알츠하이머성 치매 기전에 대한 체계적인 연구는 전무한 실정이다.
- [0013] 본 발명자는 갈색거저리에서 최초로 분리된 성분인 TM-1의 A β 를 유도한 PC12 세포에서 산화 및 염증 반응 억제 효과를 확인하고, 그 기전을 규명하여 본 발명을 완성하였다. 따라서, 본 발명의 목적은 TM-1을 유효성분으로 함유하는 A β 에 의한 세포 독성 및 염증 반응 억제용 조성물로서의 기능성을 알아보는 데 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0015] (특허문헌 0001) 등록특허공보 10-1424125호

발명의 내용

해결하려는 과제

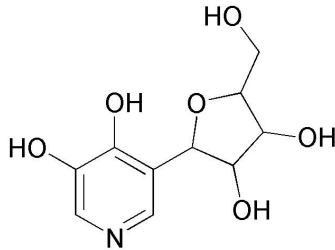
- [0016] 본 발명의 목적은 갈색거저리(*Tenebrio molitor*)로부터 분리한 화합물을 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 다른 목적은 갈색거저리(*Tenebrio molitor*)로부터 분리한 화합물을 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0020] 상기 목적을 달성하기 위하여,
- [0021] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 퇴행성 뇌질환 예

방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[화합식 1]



또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 퇴행성 뇌 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

본 발명에 따른 화합물 TM-1은 갈색거저리에 존재하는 화합물로서, 세포 독성이 거의 없는 반면, A β 로 유도한 독성에 대해 신경세포를 보호하고, 산화적 스트레스 억제할 뿐 만 아니라 염증성 반응조절 전사인자인 NF- κ B 및 상위 단계인 JNK 및 p38 MAPKs의 인산화를 억제해 통해 염증성 biomarker들의 발현을 차단시키는 항 염증 효능을 가지고 있으므로, 화합물 TM-1은 퇴행성 뇌질환(특히, 알츠하이머성 치매) 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 화합물 TM-1의 베타-아밀로이드 단백질(A β_{25-35})에 대한 세포생존율을 보여주는 도면이다.

도 2는 유세포분석을 통한 화합물 TM-1의 베타-아밀로이드 단백질(A β_{25-35})에 대한 세포생존율을 보여주는 도면이다.

도 3은 화합물 TM-1의 A β_{25-35} 유도 활성산소종 저해 효과를 나타내는 도면이다.

도 4는 화합물 TM-1의 A β_{25-35} 유도 산화질소 저해 효과를 나타내는 도면이다.

도 5는 형광염색을 통한 화합물 TM-1의 A β_{25-35} 유도 apoptosis 억제 효과를 나타낸 도면이다.

도 6은 유세포 분석을 통한 화합물 TM-1의 A β_{25-35} 유도 apoptosis 억제 효과를 나타낸 도면이다.

도 7은 화합물 TM-1의 A β_{25-35} 처리 시 활성화된 caspase-3 감소효과를 나타낸 도면이다.

도 8은 화합물 TM-1의 A β_{25-35} 을 처리한 PC12 세포에 대한 세포주기에 미치는 영향을 관찰한 도면이다.

도 9는 화합물 TM-1의 A β_{25-35} 유도 염증 매개인자 iNOS 및 COX-2 발현 저해 효과를 나타낸 도면이다.

도 10은 A β_{25-35} 유도 NF- κ B 및 I- κ B 인산화에 미치는 화합물 TM-1의 영향을 보여주는 도면이다.

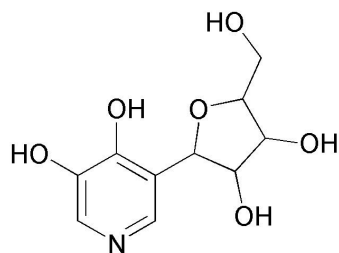
도 11은 A β_{25-35} 처리시 증가한 MAPKs에 대해 화합물 TM-1의 저해 효과를 보여주는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 퇴행성 뇌 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0033] [화학적식 1]



[0034]

[0036] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 퇴행성 뇌 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0038] 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병, 경도인지장애, 뇌졸중, 치매, 크로이츠펔트-야콥병, 외상성 두부 손상, 뇌 농양, 뇌종양, 다발성경화증, 파킨슨병, 루게릭병, 헌팅턴병, 픽병, 근위축성 측삭 경화증, 간질, 허혈, 중풍, 주의력결핍-과잉행동장애, 정신분열증, 우울증, 조울증, 외상 후 스트레스 장애, 척수손상, 척수염 등일 수 있고, 바람직하게는 알츠하이머병 또는 치매, 더욱 바람직하게는 알츠하이머성 치매일 수 있다.

[0040] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 베타-아밀로이드 단백질($A\beta$)에 의해 유도되는 PC12 (pheochromocytoma 12) 세포의 독성을 저감하는 것을 특징으로 한다(실험예 1 참조).

[0042] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 베타-아밀로이드 단백질($A\beta$)에 의해 유도되는 PC12 (pheochromocytoma 12) 세포에서의 산화적 스트레스를 저감하는 것을 특징으로 한다(실험예 2 참조).

[0044] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 베타-아밀로이드 단백질($A\beta$)에 의해 유도되는 PC12 (pheochromocytoma 12) 세포에서의 세포자살을 저감하는 것을 특징으로 한다(실험예 3 참조).

[0046] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 베타-아밀로이드 단백질($A\beta$)에 의해 유도되는 PC12 (pheochromocytoma 12) 세포에서의 염증매개인자 iNOS 및 COX-2를 저감하는 것을 특징으로 한다(실험예 5 참조).

[0048] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 베타-아밀로이드 단백질($A\beta$)에 의해 유도되는 PC12 (pheochromocytoma 12) 세포에서의 NF- κ B 및 I- κ B 발현을 저감하는 것을 특징으로 한다(실험예 6 참조).

[0050] 약학적으로 허용가능한 염

[0051] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 약학적으로 허용가능한 염이란 표현은 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 화학식 1의 염기 화합물의 이로온 효능을 떨어뜨리지 않는 화학식 1의 염기 화합물의 어떠한 유기 또는 무기 부가염을 의미한다. 이들 염은 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 질산, 황산, 과염소산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콘산, 숙신산, 타타르산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산, 옥살산, (D) 또는 (L) 말산, 말레산, 메테인설폰산, 에테인설폰산, 4-톨루엔설폰산, 살리실산, 시트르산, 벤조산 또는 말론산 등을 사용할 수 있다. 또한, 이들 염은 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등) 및 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염 등) 등을 포함한다. 예를 들면, 산부가염으로는 아세테이트, 아스파테이트, 벤즈에이트, 베실레이트, 바이카보네이트/카보네이트, 바이설페이트/설페이트, 보레이트, 캄실레이트, 시트레이트, 에디실레이트, 에실레이트, 포메이트, 퓨마레이트, 글루세이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 헥사플루오로포스페이트, 하이벤제이트, 하이드로클로라이드/클로라이드, 하이드로브로마이드/브로마이드, 하이드로요오디드/요오디드, 이세티오네이트, 락테이트, 말레이트, 말리에이트, 말로네이트, 메실레이트, 메틸설페이트, 나프틸레이트, 2-나프틸레이트, 니코티네이트, 나이트레이트, 오로테이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 포스페이트/수소 포스페이트/이수소 포스페이트, 사카레이트, 스테아레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 토실레이트, 트리플루오로아세테이트, 알루미늄, 알기닌, 벤자틴, 칼슘, 콜린, 디에틸아민, 디올아민, 글라이신, 라이신, 마그네슘, 메글루민, 올아민, 칼륨, 나트륨, 트로메타민, 아연염 등이 포함될 수 있으며, 이들 중 하이드로클로라이드 또는 트리플루오로아세테이트가 바람직하다.

[0052] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 화학식 1로 표시되는 화합물을 유기용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤, 메틸렌클로라이드, 아세토니트릴 등에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물

을 여과, 건조하여 제조되거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조하거나 유기용매 하에서 결정화시켜서 제조할 수 있다.

[0053] 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, 금속염으로는 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.

[0054] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물 및 이의 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 이성질체, 광학 이성질체 등을 모두 포함한다.

[0056] 약학적 조성물

[0057] 본 발명의 화합물은 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있으며, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.

[0058] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0059] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0060] 또한, 본 발명의 화합물의 인체에 대한 효과적인 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로 약 0.001-100 mg/kg/일이며, 바람직하게는 0.01-35 mg/kg/일이다. 몸무게가 70kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.07-7000 mg/일이며, 바람직하게는 0.7-2500 mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

[0062] 건강기능식품 조성물

[0063] 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 또는 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0064] 상기 염증성 질환 또는 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 구체적 예는 상술한 바와 같다.

[0065] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물은 염증성 질환 또는 멜라닌 색소 과다 침착 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 식품, 음료 등의 건강기능식품에 첨가할 수 있다.

[0066] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0067] 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품 조성물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강기능식품 중의 상기 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 유지를 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.

[0068] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 외에는 다른 성분에

는 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 당알코올이다. 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 건강기능성 식품 조성물 100 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0069] 상기 외에 본 발명의 화학식 1의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품 조성물은 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 건강기능식품 조성물은 천연 과일주스 및 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0070] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 화학식 1의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0072] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0074] 실험재료 및 실험방법

[0075] 세포배양

[0076] 실험에 사용된 집쥐의 부신 수질 크롬친화성 세포종에서 유래한 PC12 (pheochromocytoma 12) 세포는 ATCC에서 분양받아 사용하였으며 세포는 RPMI1640 배지에 10% fetal bovine serum(FBS)와 5% horse serum 및 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

[0078] 세포독성 평가 (MTT assay)

[0079] PC12 세포를 RPMI1640 배지를 이용하여 96 well plate에 1×10^5 cells/well로 넣고 24시간 배양한 후 4, 40, 200 μM 농도의 TM-1을 넣고 1시간 배양 후 48 시간 aggregation 시킨 Aβ₂₅₋₃₅ 50 μM을 첨가하여 24 시간 배양하였다. 이후, MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide) 용액과 3 시간 반응시키고 상층액을 제거한 후 생성된 formazan은 DMSO로 용해하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0081] 활성산소종 억제 효과 측정 (ROS assay)

[0082] 세포독성 평가와 동일한 농도범위에서 TM-1의 ROS 생성 억제활성을 확인하였다. PC12 세포를 근접 빛이 차단된 96 well plate에 24시간 배양 후 ROS를 선택적으로 염색시키는 형광염료 CH₂DCF-DA를 차광 상태에서 30분간 배양하였다. 반응 종료 직후, HBSS로 세척 후 형광측정장치를 이용하여 485 nm/535 nm 파장에서 형광값을 측정하여 Aβ₂₅₋₃₅ 처리군에 대해 상대적인 수치로 나타내었다.

[0084] NO 생성량 측정

[0085] 생성된 일산화질소는 세포 배양액에 Griess 시약을 첨가하는 방법으로 아질산염(nitrite) 형태의 일산화질소량을 측정하였다. 세포 배양액 100 μL와 동량의 Griess 시약[1% 설파닐아미드(sulfanilamide), 0.1% N-1-나프틸 에틸렌 디아민(N-1-naphylethylene diamine) in 2.5% 인산(phosphoric acid)]을 혼합하여 96 well plate에서 10분간 반응시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산나트륨(Sodium nitrite)을 이용해 표준곡선을 구하고 이와 비교하여 생성된 일산화질소 생성량을 산출하였다.

[0087] PC12 세포의 형태 및 세포사멸 저해 양상 분석

[0088] 세포의 형태학적 변화는 Hoechst33342 dye를 이용하여 측정하였다. 세포를 8 well plate에 분주하여 TM-1를 농도별로 처리, 1시간 후 Aβ₂₅₋₃₅를 처리하고 24시간 뒤 배양한 세포를 4% 포르말데히드로 20분간 고정시킨 후 PBS로 세척하였다. Hoechst33342 (1 μg/mL)를 첨가하고 실온에서 15분간 반응시킨 다음 형광현미경(Olympus,

Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

[0089] 또한, A β ₂₅₋₃₅ 처리로 야기된 세포사멸의 양상을 구체적으로 알아보기 위해 Annexin V & Dead Cell Kit (Merk Milipore, USA)를 이용하여 분석하였다. 배양한 세포는 trypsin EDTA를 넣고 회수하여 PBS로 세척 후 annexin V&Dead Cell 용액을 첨가하여 어두운 곳에서 20분 반응시킨 뒤, 유세포 분석기(Milipore, USA)를 이용하여 세포 사멸 유형을 분석하였다.

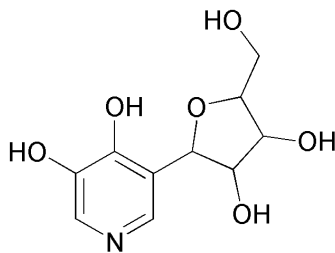
[0091] **세포주기 측정**

[0092] TM-1과 A β ₂₅₋₃₅를 처리한 후 well 에 부착된 세포는 trypsin-EDTA 용액을 가해 떼어내어 PBS로 세포 부유액을 만들었다. 세포 부유액은 70% 에탄올로 -20℃에서 3시간 이상 고정시킨 후, Muse cell cycle 용액을 넣어 유세포 분석기를 이용하여 제조사의 지시에 따라 실험하였다.

[0094] **Western blot**

[0095] PC12 세포를 6 well plate에 3×10^6 cells/well로 넣고 24시간 후, TM-1을 넣고 1시간 배양하고 이후 A β ₂₅₋₃₅를 첨가하였다. 세포를 차가운 PBS로 2회 세척하고 protease inhibitor가 포함된 lysis buffer를 이용해 1시간 동안 세포를 용해시킨 후 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 단백질을 상등액만 분리하였다. 단백질 농도는 BSA(bovine serum albumin)을 표준으로 정량하였다. 정량한 단백질을 10% 폴리아크릴아마이드 겔에 전기영동하고 PVDF막(poly-vinylidene difluoride membrane)에 15V, 300 mA 로 30분 동안 전이시켰다. 단백질을 전이된 막을 5% 탈지분유를 포함한 1X PBST에 넣고 1시간 blocking 시킨 후, 1차 항체와 overnight으로 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 막은 1X PBST 로 8회 세척한 후, 2차 항체를 4℃에서 2시간 반응한 뒤 1X PBST로 세척하였다. 단백질은 Ez Capture ST(ATTO, Tokyo, Japan)로 결과를 확인하였다.

[0097] **<실시예 1> 갈색거저리로부터 분리한 화합물 TM-1**



[0098] **<실험예 1> 화합물 TM-1의 A β ₂₅₋₃₅ 유도 PC12 세포에서의 세포보호효과**

[0101] 도 1은 화합물 TM-1의 베타-아밀로이드 단백질(A β ₂₅₋₃₅)에 대한 세포생존율을 보여주는 도면이다.
[0102] 도 2는 유세포분석을 통한 화합물 TM-1의 베타-아밀로이드 단백질(A β ₂₅₋₃₅)에 대한 세포생존율을 보여주는 도면이다.

[0104] 도 1에 나타난 바와 같이, 50 μ M A β ₂₅₋₃₅ 처리 시 40% 가량 PC12 세포 생존률이 감소한 반면, 화합물 TM-1을 4, 40, 200 μ M 전처리한 경우 각각 67.65 ± 3.78 , 72.84 ± 3.98 , $74.54 \pm 4.07\%$ 까지 회복시켰다 ($p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.001$).

[0105] 도 2에 나타난 바와 같이, 유세포분석기를 통해 세포생존율을 평가하였을 때도 $70.97 \pm 5.23\%$ 까지 감소한 세포 생존율을 화합물 TM-1의 40, 200 μ M 농도에서 각각 87.36 ± 0.08 , $90.67 \pm 0.11\%$ 까지 상승시켰다 ($p < 0.05$).

[0107] **<실험예 2> TM-1의 A β ₂₅₋₃₅ 유도 PC12 세포에서의 산화적 스트레스 억제효과**

[0108] ROS 표지자인 H₂DCFDA를 사용하여 TM-1의 세포 내의 산화적 스트레스 억제효과를 살펴보았다.

[0110] 도 3은 화합물 TM-1의 A β ₂₅₋₃₅ 유도 활성산소종 저해 효과를 나타내는 도면이다.

[0111] 도 4는 화합물 TM-1의 A β ₂₅₋₃₅ 유도 산화질소 저해 효과를 나타내는 도면이다.

[0113] 도 3에 나타난 바와 같이, 도 3의 왼쪽 그림을 살펴보면, A β 를 처리했을 때 ROS에 의한 형광발현이 강하게 나타나는 것을 육안으로도 관찰할 수 있었고, 그에 반해 화합물 TM-1을 처리한 군에서는 농도 의존적으로 형광발

현이 줄어들어 200 μ M에서는 무처리군과 비슷하게 모습을 확인할 수 있었다. 도 3의 아래쪽 막대그래프 상에서도 화합물 TM-1의 4, 40, 200 μ M에서 각각 91.89 ± 3.43 , 77.67 ± 3.53 , $71.27 \pm 2.81\%$ 로 유의적인 ROS 생성 저해효과를 보였다 ($p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.001$).

[0114] 도 4에 나타난 바와 같이, $A\beta_{25-35}$ 로 인해 상승한 NO 수준은($p < 0.001$) TM-1 처리 시 현저하게 감소되었다. 특히 전체 농도구간에서 양성 대조군인 resveratrol (50 μ M)과 비슷한 수준의 유의적인 효과를 보였다. 너는 많은 산소를 소비하는 데 비해 비교적 항산화 방어 체계가 부족하기 때문에 산화적 스트레스에 취약하므로, 화합물 TM-1이 ROS와 NO 생성을 억제함으로써 세포를 보호할 것으로 사료된다.

[0116] <실험예 3> 화합물 TM-1의 $A\beta_{25-35}$ 유도 PC12 세포에서의 세포자살 감소 효과

[0117] 도 5는 형광염색을 통한 화합물 TM-1의 $A\beta_{25-35}$ 유도 apoptosis 억제 효과를 나타낸 도면이다.

[0118] 도 6은 유세포 분석을 통한 화합물 TM-1의 $A\beta_{25-35}$ 유도 apoptosis 억제 효과를 나타낸 도면이다.

[0119] 도 7은 화합물 TM-1의 $A\beta_{25-35}$ 처리 시 활성화된 caspase-3 감소효과를 나타낸 도면이다.

[0121] 도 5에 나타난 바와 같이, Hoechst 33342 염색 시 50 μ M $A\beta_{25-35}$ 투여한 세포는 대조군에 비해 핵 밀집, 세포질의 수축 (shrinkage) 등의 특징을 나타내며 세포자살을 $31.79 \pm 2.84\%$ 까지 상승하였으나 화합물 TM-1은 4, 40 및 200 μ M에서 각각 20.26 ± 2.37 , 18.00 ± 2.52 , $14.17 \pm 1.59\%$ 까지 감소시켰다 ($p < 0.001$).

[0122] 도 6에 나타난 바와 같이, 유세포 분석을 통해 전기/후기 세포자살로 구분하여 살펴본 결과, $A\beta_{25-35}$ 는 후기 세포자살에 영향을 끼치는 것을 알 수 있었다. 그러나 화합물 TM-1은 후기 세포자살을 완화시키는 효능이 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0123] 도 7에 나타난 바와 같이, 세포자살에 중요한 역할을 하는 caspase-3은 대조군에 비해 $A\beta_{25-35}$ 처리한 세포에서 그 수준이 유의적으로 상승하였으나 ($p < 0.001$), 화합물 TM-1 처리 시 전농도 구간에서 그 수준을 감소시켰으며, 특히 40 μ M 이상에서 양성대조군과 유사한 수준까지 회복시켰다.

[0125] <실험예 4> 화합물 TM-1의 $A\beta_{25-35}$ 유도 PC12 세포에서의 세포주기 조절 효과

[0126] 도 8은 화합물 TM-1의 $A\beta_{25-35}$ 을 처리한 PC12 세포에 대한 세포주기에 미치는 영향을 관찰한 도면이다.

[0128] 도 8에 나타난 바와 같이, $A\beta_{25-35}$ 는 G0/G1기를 $65.10 \pm 1.13\%$ 에서 $76.35 \pm 1.20\%$ 까지 증가시키고 ($p < 0.01$), G2/M기를 $8.35 \pm 0.35\%$ 에서 $5.70 \pm 0.28\%$ 로 감소시켰다 ($p < 0.05$). 그러나, 화합물 TM-1은 40 및 200 μ M를 처리한 세포의 G0/G1 구간에서 $A\beta_{25-35}$ 처리군에 비해 세포가 각각 7.30%, 10.15% 감소시켰으며, S기 또한 화합물 TM-1의 농도가 증가할수록 $A\beta_{25-35}$ 처리군보다 그 비율이 증가하는 것을 확인하였다. 이는 TM-1을 처리하였을 때, $A\beta_{25-35}$ 독성으로 인해 G0/G1 단계에 arrest된 세포를 회복시킨 것을 의미한다.

[0130] <실험예 5> 화합물 TM-1의 $A\beta_{25-35}$ 유도 PC12 세포에서의 염증 매개인자 iNOS, COX-2 감소효과

[0131] 도 9는 화합물 TM-1의 $A\beta_{25-35}$ 유도 염증 매개인자 iNOS 및 COX-2 발현 저해 효과를 나타낸 도면이다.

[0133] 도 9에 나타난 바와 같이, $A\beta_{25-35}$ 는 유의적으로 염증 매개인자인 iNOS와 COX-2의 발현을 상승시켰으나($p < 0.01$), 화합물 TM-1은 200 μ M에서 유의적으로 iNOS발현을 감소시켰다($p < 0.01$). 또한, 화합물 TM-1의 40, 200 μ M에서 농도 의존적으로 COX-2 발현을 줄였다.

[0135] <실험예 6> 화합물 TM-1의 $A\beta_{25-35}$ 유도 PC12 세포에서의 NF- κ B 와 I- κ B 발현 감소효과

[0136] $A\beta_{25-35}$ 유도 독성에 의해 세포질에 존재하던 NF- κ B는 I- κ B와 분리되어 핵 내로 이동함으로써 표적 유전자의 promoter 부위에 있는 κ B 결합 자리에 결합하여 염증에 관여하는 cytokines, iNOS, COX-2 와 같은 염증 매개물질의 전사를 촉진한다.

[0138] 도 10은 $A\beta_{25-35}$ 유도 NF- κ B 및 I- κ B 인산화에 미치는 화합물 TM-1의 영향을 보여주는 도면이다.

[0140] 도 10에 나타난 바와 같이, $A\beta_{25-35}$ 는 NF- κ B subunit인 p65의 인산화와 p-I κ B 발현을 각각 $316.83 \pm 18.08\%$ 과 $225.96 \pm 12.24\%$ 까지 상승시켰으나, 고농도의 화합물 TM-1은 이들의 생성을 대조군 수준까지 감소시켰다. 이러한

결과는 화합물 TM-1 처리가 $A\beta_{25-35}$ 에 의한 NF- κ B 단백질의 핵 내 이동을 억제함으로써 $A\beta_{25-35}$ 에 의해 유도되는 주요 염증신호전달경로인 NF- κ B pathway를 차단했음을 의미한다.

[0142] <실험예 7> 화합물 TM-1의 $A\beta_{25-35}$ 유도 PC12 세포에서의 MAPKs 인산화 감소효과

[0143] TM-1의 NF- κ B 활성 저해가 MAPK 경로를 통한 것인지 조사하기 위해, $A\beta_{25-35}$ 로 유도된 ERK1/2, JNK의 인산화에 미치는 영향을 조사하였다.

[0145] 도 11은 $A\beta_{25-35}$ 처리시 증가한 MAPKs에 대해 화합물 TM-1의 저해 효과를 보여주는 도면이다.

[0147] 도 11에 나타난 바와 같이, $A\beta_{25-35}$ 는 ERK1/2과 JNK 의 인산화를 각각 $248.65 \pm 49.33\%$, $246.92 \pm 15.49\%$ 로 강하게 유도하였으나($p < 0.001$), 화합물 TM-1 처리 시 p-ERK는 40 μ M 이상의 농도에서, p-JNK는 전 농도구간에서 현저히 억제되는 것을 관찰하였다. 이를 통해 화합물 TM-1의 항염증 효능이 ERK와 JNK 신호 전달 억제를 통하여 이루어질 수 있음을 의미한다.

[0149] 약제의 제조예

[0150] 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 목적에 따라 여러 형태로 제제화가 가능하다. 하기는 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 활성성분으로 함유시킨 몇몇 제제화 방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0152] <약제 제조예 1> 산제의 제조

[0153] 화학식 1의 화합물 2 g

[0154] 유당 1 g

[0155] 상기의 성분을 혼합한 후, 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0157] <약제 제조예 2> 정제의 제조

[0158] 화학식 1의 화합물 100 mg

[0159] 옥수수전분 100 mg

[0160] 유 당 100 mg

[0161] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0162] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0164] <약제 제조예 3> 캡슐제의 제조

[0165] 화학식 1의 화합물 100 mg

[0166] 옥수수전분 100 mg

[0167] 유 당 100 mg

[0168] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0169] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0171] <약제 제조예 4> 주사제의 제조

[0172] 화학식 1의 화합물 10 μ g/ml

[0173] 묽은 염산 BP pH 3.5로 될 때까지

[0174] 주사용 염화나트륨 BP 최대 1 ml

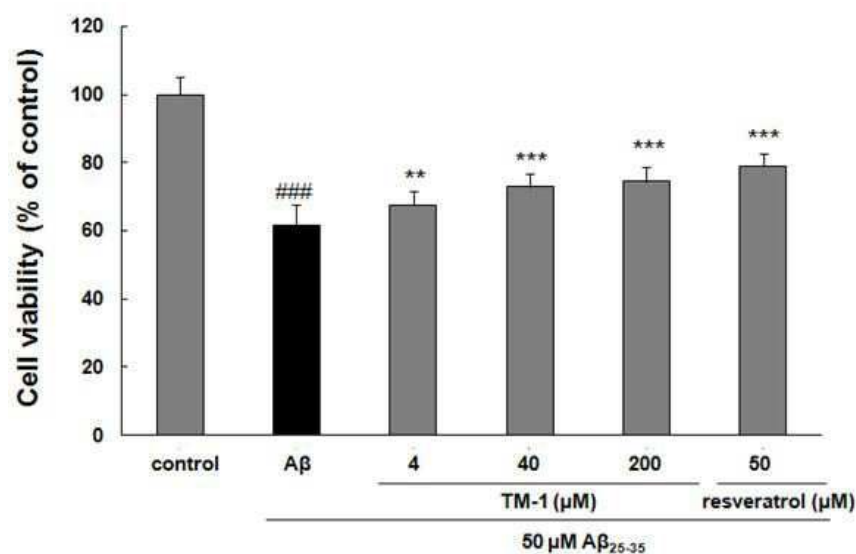
[0175] 적당한 용적의 주사용 염화나트륨 BP 중에 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물을 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 묽은 염산 BP를 사용하여 pH 3.5로 조절하고, 주사용 염화나트륨 BP를 사용하여 용적을 조절하고 충분히 혼합하였다. 용액을 투명 유리로 된 5 ml 타입 I 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자에 봉입시키고, 120 $^{\circ}$ C에서 15 분 이상 오토클레이브시켜 살균하여 주사액제를 제조하였다.

[0177]	<약제 제조에 5> 경비흡수제 (Nasal spray)의 제조	
[0178]	화학식 1의 화합물	1.0 g
[0179]	아세트산나트륨	0.3 g
[0180]	메틸파라벤	0.1 g
[0181]	프로필파라벤	0.02 g
[0182]	염화나트륨	적량
[0183]	HCl 또는 NaOH	pH 조정 적량
[0184]	정제수	적량
[0185]	통상의 경비흡수제의 제조방법에 따라, 염수 (0.9% NaCl, w/v, 용매는 정제수) 1 mL당 화학식 1의 화합물 3 mg 이 포함되도록 제조하고, 이를 불투명한 스프레이 용기에 충전하고 멸균시켜 경비흡수제를 제조하였다.	
[0187]	<약제 제조에 6> 액제의 제조	
[0188]	화학식 1의 화합물	100 mg
[0189]	이성화당	10 g
[0190]	만니톨	5 g
[0191]	정제수	적량
[0192]	통상의 액제의 제조방법에 따라, 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬 향을 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체 100 mL로 조절한 후 갈색 병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조하였다.	
[0194]	<u>건강기능식품의 제조에</u>	
[0195]	본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 목적에 따라 여러 형태의 건강기능식품으로 제조 가능하다. 하기는 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 활성성분으로 함유시킨 몇몇 건강기능식품의 제조방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.	
[0197]	<건강기능식품 제조에 1> 건강기능식품의 제조	
[0198]	화학식 1로 표시되는 화합물	100 mg
[0199]	비타민 혼합물	적량
[0200]	비타민 A 아세테이트	70 μg
[0201]	비타민 E	1.0 mg
[0202]	비타민 B1	0.13 mg
[0203]	비타민 B2	0.15 mg
[0204]	비타민 B6	0.5 mg
[0205]	비타민 B12	0.2 μg
[0206]	비타민 C	10 mg
[0207]	비오틴	10 μg
[0208]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0209]	엽산	50 μg
[0210]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0211]	무기질 혼합물	적량
[0212]	황산제1철	1.75 mg

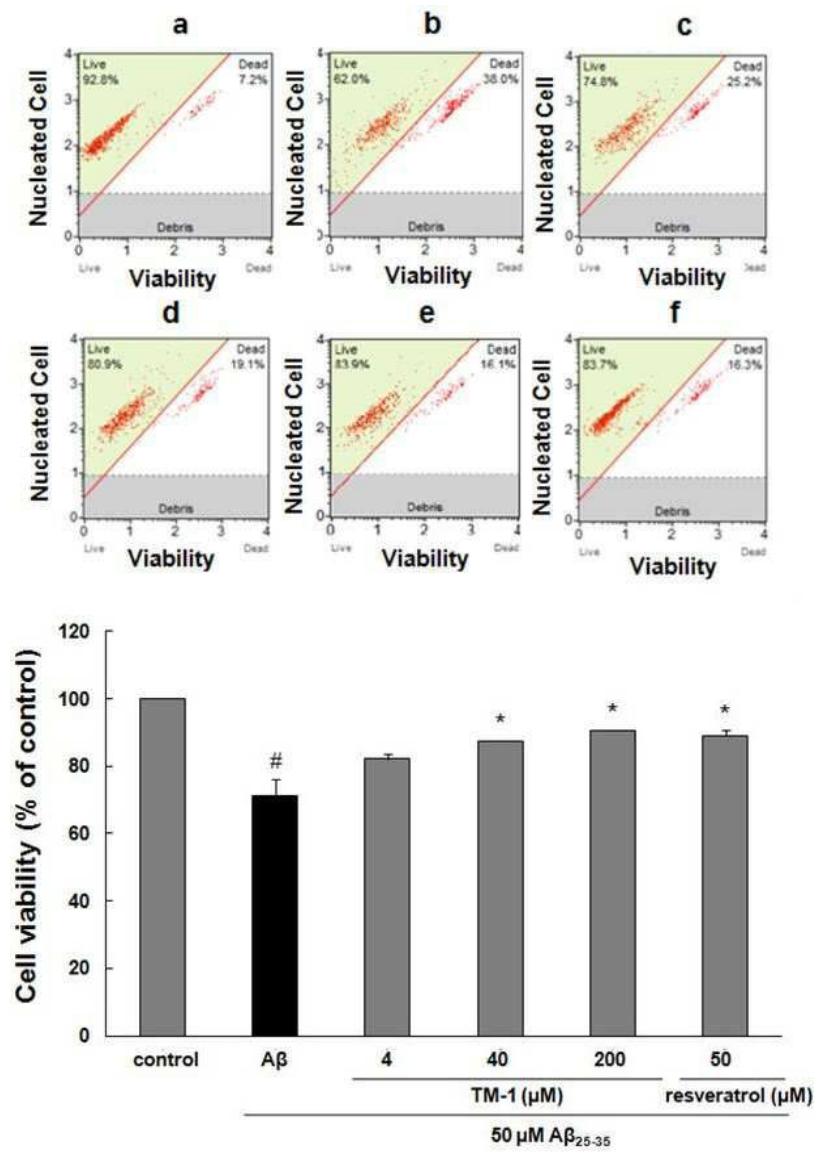
[0213]	산화아연	0.82 mg
[0214]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0215]	제1인산칼륨	15 mg
[0216]	제2인산칼슘	55 mg
[0217]	구연산칼륨	90 mg
[0218]	탄산칼슘	100 mg
[0219]	염화마그네슘	24.8 mg
[0220]	상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강기능성 식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능성 식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강기능성 식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.	
[0222]	<건강기능식품 제조에 > 건강 기능 음료의 제조	
[0223]	화학식 1로 표시되는 화합물	100 mg
[0224]	구연산	100 mg
[0225]	올리고당	100 mg
[0226]	매실농축액	2 mg
[0227]	타우린	100 mg
[0228]	정제수를 가하여 전체	500 mL
[0229]	통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 1 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다. 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요 계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.	

도면

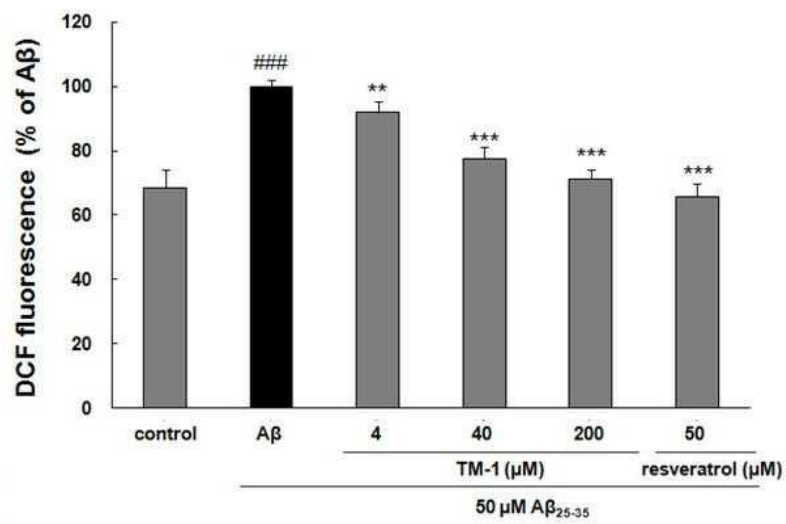
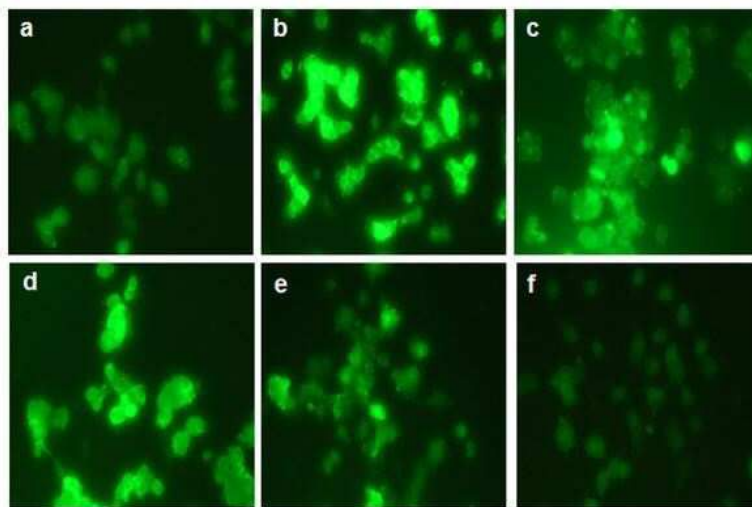
도면1



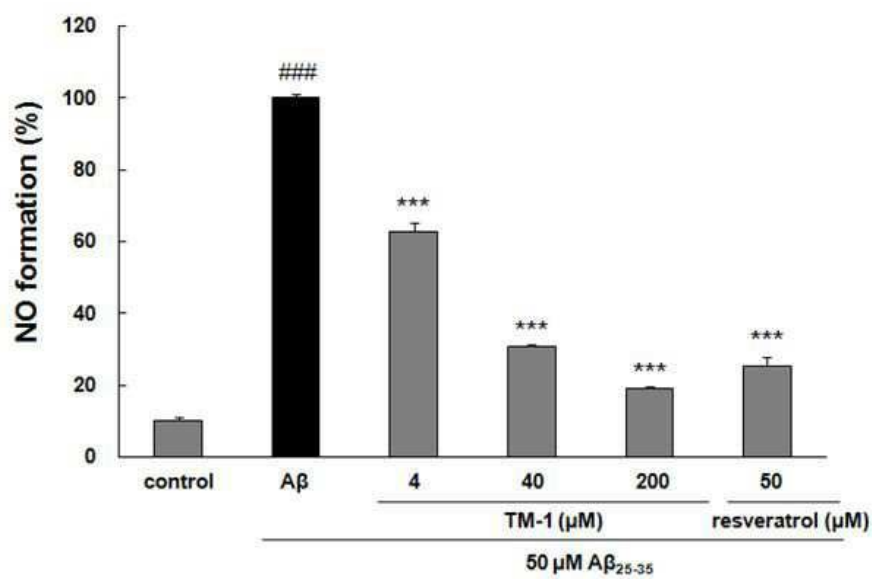
도면2



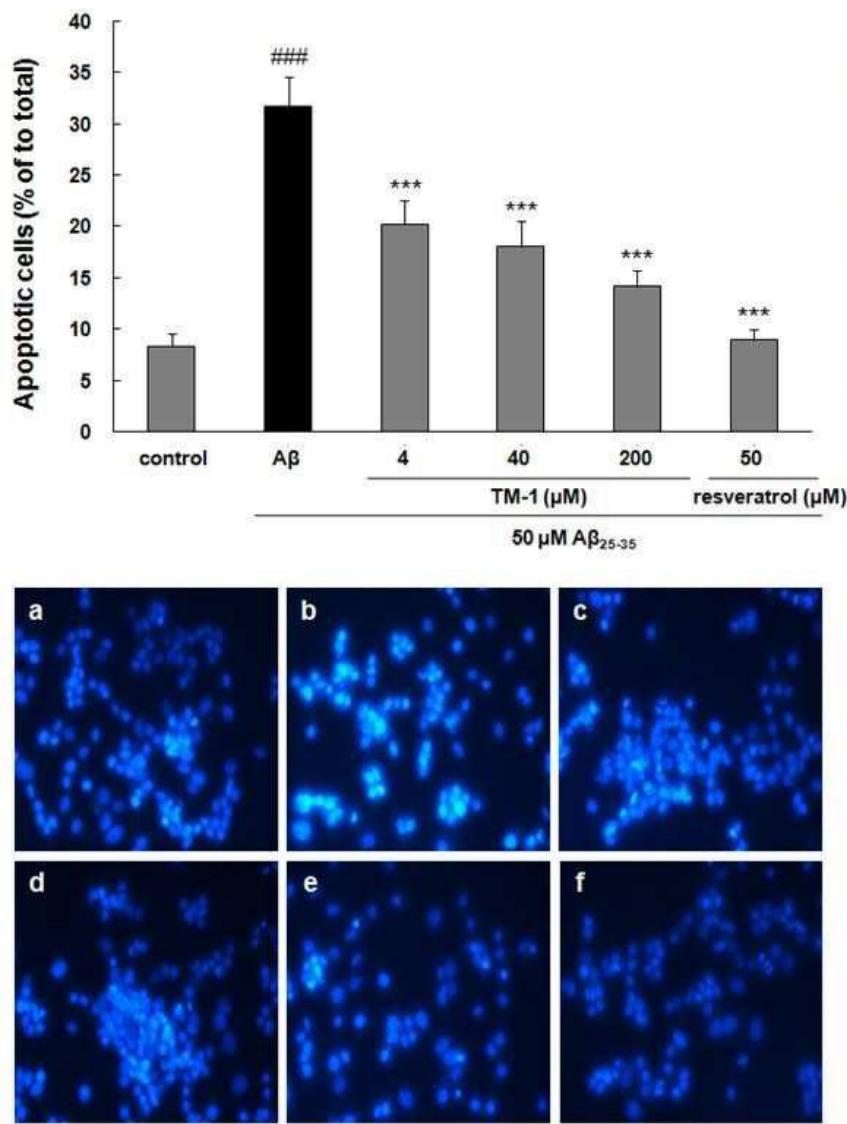
도면3



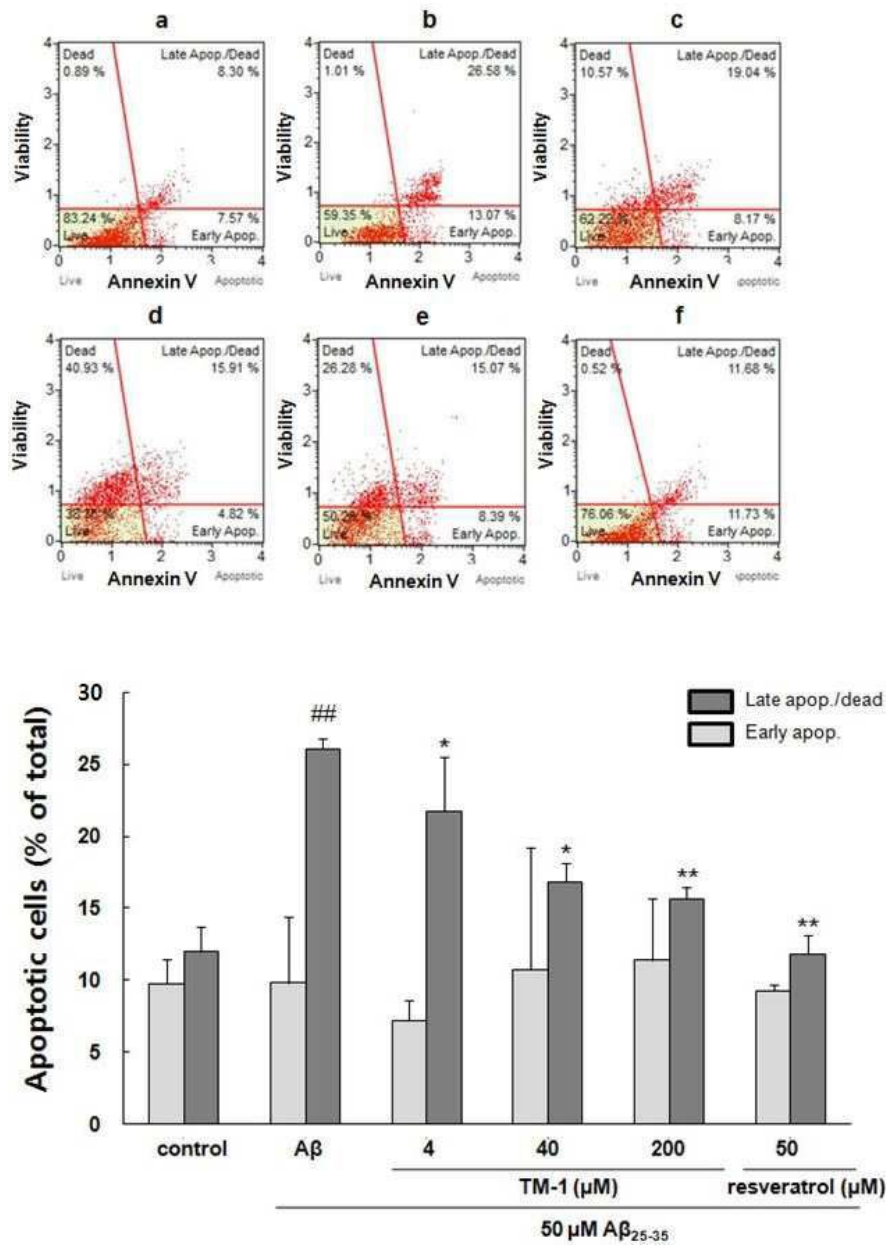
도면4



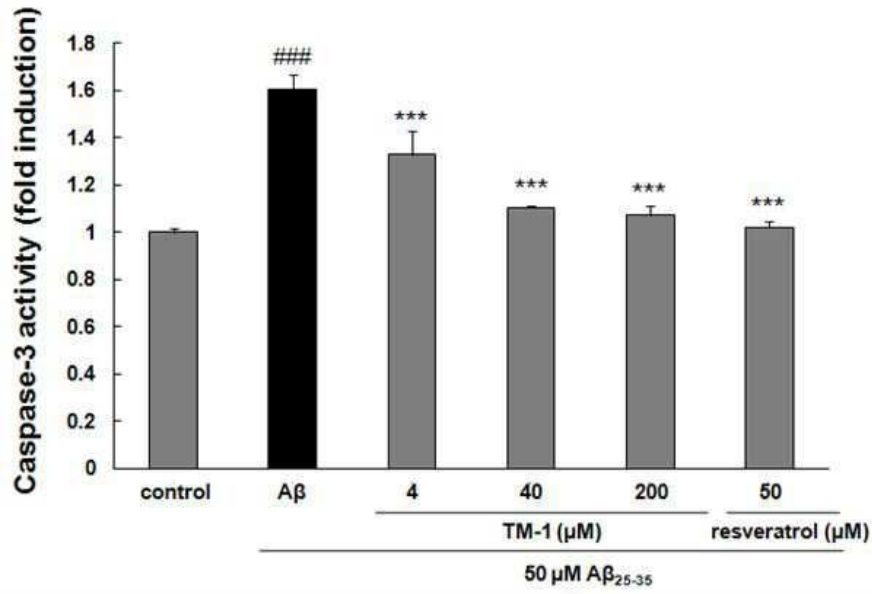
도면5



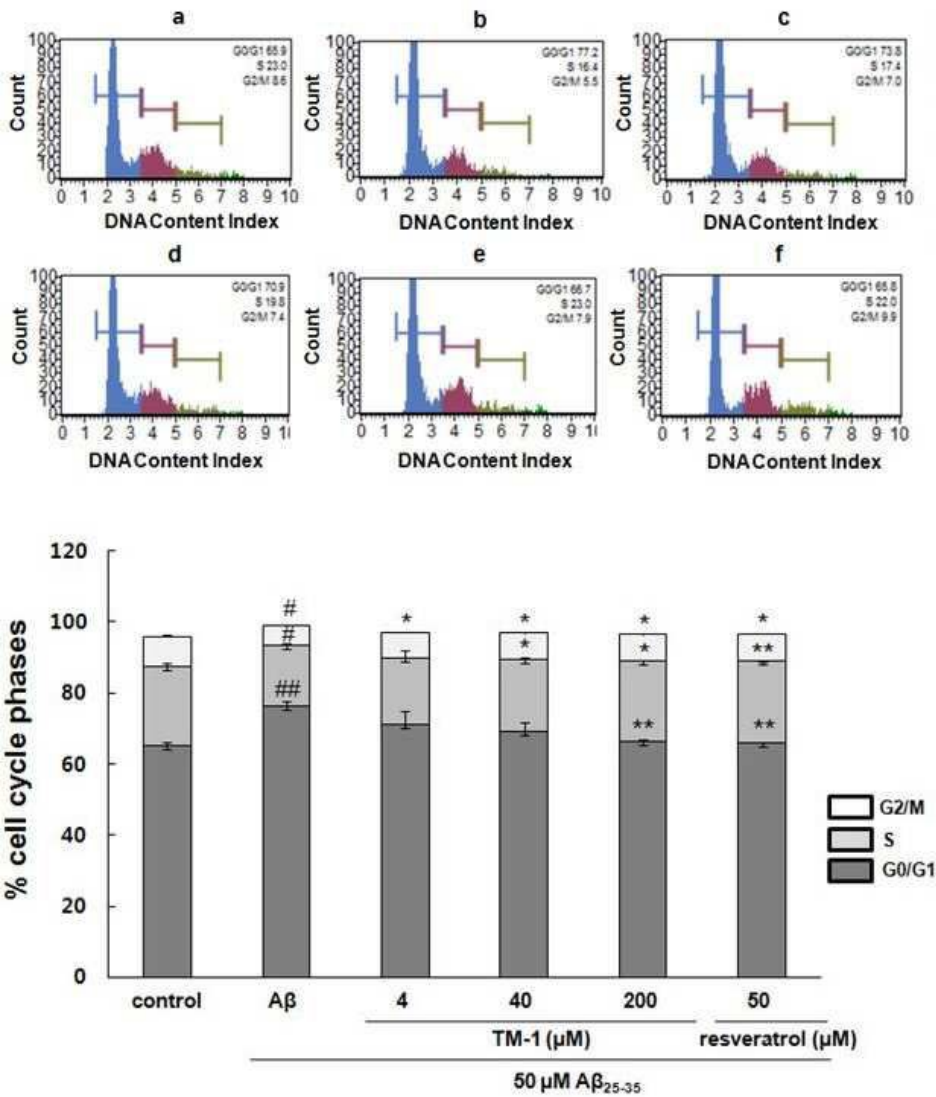
도면6



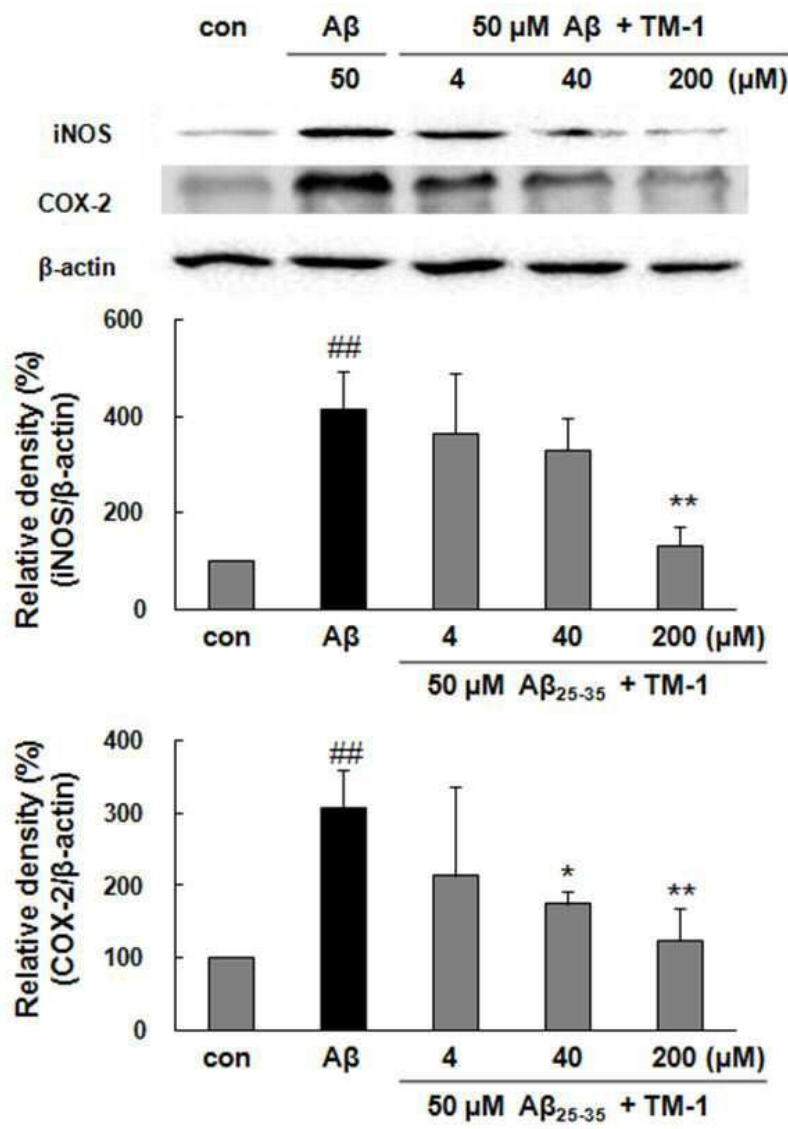
도면7



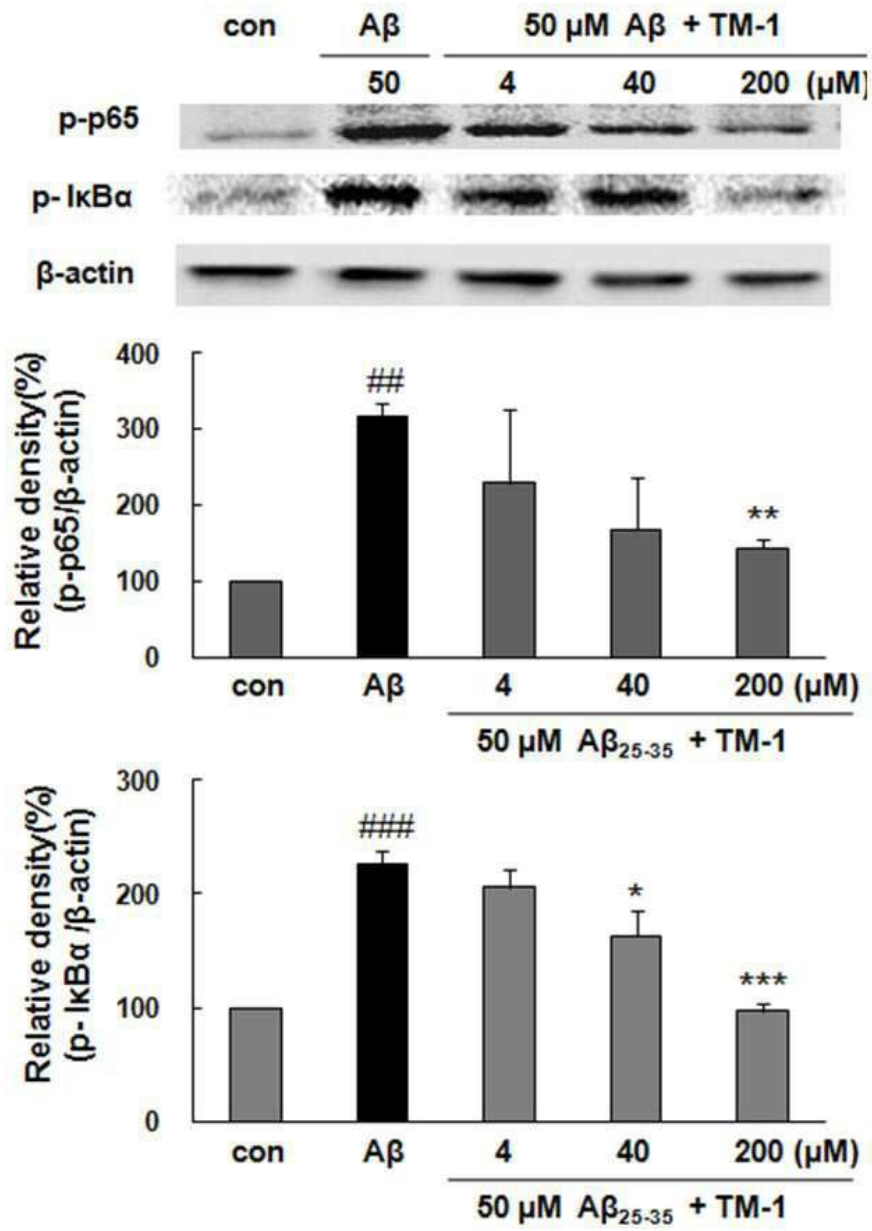
도면8



도면9



도면10



도면11

