



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0135544
(43) 공개일자 2017년12월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) A23L 1/305 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/16 (2013.01)
A23L 33/18 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0067622
(22) 출원일자 2016년05월31일
심사청구일자 2017년04월03일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
아주대학교산학협력단
경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)
(72) 발명자
홍순선
서울특별시 은평구 은평터널로 121-6, 101동 110 4호(신사동, 이랜드타운아파트)
박상규
경기도 수원시 영통구 월드컵로 206, 약학대학(원천동)
손미권
충청북도 청주시 상당구 낭성면 지산나박실길 8
(74) 대리인
김순용

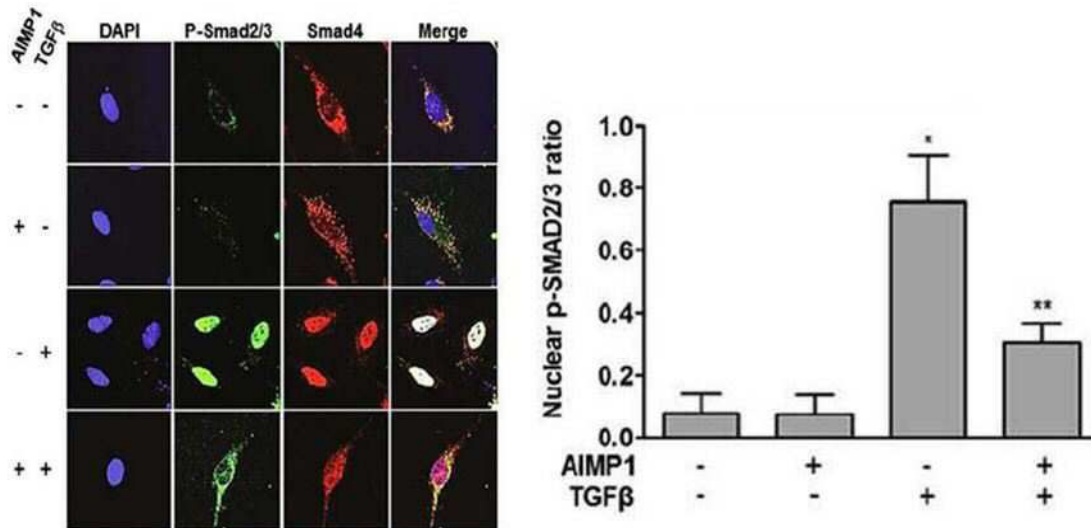
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 간질환 예방 또는 치료용 펩타이드 및 이를 유효성분으로 포함하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 AIMP1 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 AIMP1 펩타이드는 ERK(extracellular signal-regulated kinase) 활성화를 통해 smad2 위치를 조절하고, 콜라겐 I과 같은 섬유화 인자들의 발현을 억제함으로써 간섬유증, 더 나아가 간경화 등의 예방 및 치료에 뛰어난 효과를 가지므로, 간질환 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물 및 건강기능식품 등으로 유용하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 38/1709 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014M3C1A3051476
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 첨단융합기술개발사업
연구과제명 세포내 단백질 타겟 항체의 임상적 적용 기술
기 여 율 25/100
주관기관 인하대학교 산학협력단
연구기간 2016.03.01 ~ 2017.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014009392
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 선도연구센터 지원사업
연구과제명 저산소 표적 질환 연구센터
기 여 율 25/100
주관기관 인하대학교 산학협력단
연구기간 2016.03.01 ~ 2017.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015M3A9C4075818
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 전통천연물기반유전자-동의보감사업
연구과제명 간질환 대사체 MCMT 바이오마커 발굴
기 여 율 25/100
주관기관 인하대학교 산학협력단
연구기간 2015.12.01 ~ 2016.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012M3A9C6049719
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발-바이오의료기술개발사업
연구과제명 관상동맥스텐트용 줄기세포 동원/포획 약물개발 및 분화조절 연구
기 여 율 25/100
주관기관 아주대학교
연구기간 2012.10.01 ~ 2017.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

AIMP1(ARS-interacting multi-functional protein 1) 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 AIMP1 펩타이드는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 AIMP1 펩타이드는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 간질환은 간섬유증 또는 간경화증, 급만성 간염, 지방간 및 간암으로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 AIMP1 펩타이드는 콜라겐 I의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

AIMP1 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

AIMP1 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간기능 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 간질환 예방 또는 치료용 펩타이드 및 이를 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 간섬유화는 만성 간 내 염증으로 인한 세포 외 기질(extracellular matrix)의 과도한 침착으로 정의될 수 있으며 이러한 만성 간 내 염증이 지속되는 경우 간 세포수의 감소로 간섬유화는 간경변으로 발전된다.

[0004] 간섬유화에 관여하는 대표적인 세포로는 간성상세포(hepatic stellate cell), 쿠퍼세포(kuffer cell), 내피 세포(endothelial cell)등이 있다. 간 성상세포는 세포 외 기질을 생산하는 주 생산원으로, 교원질을 포함한 각종 세포 외 기질의 생성 증가에 관여한다. 쿠퍼세포는 간 내 동모양 혈관강(sinusoidal space) 내에 존재하며 활성화된 쿠퍼 세포에서 생성된 물질들을 주위간세포, 내피세포, 그리고 간성상세포에 영향을 주게 되어 간섬유화를 촉진시킨다. 내피세포는 간 내 혈류 조절에 중요한 역할을 하며, 이 외에도 염증이나 간섬유화 등에 의한 간성상세포의 증식에 관여하는 성장인자와 세포 외 기질의 생성에도 관여한다.

[0005] 간섬유화가 일어나게 되면 활성화된 간성상 세포가 기하급수적으로 증가하게 되고 이 세포는 전섬유생성(profibrogenic) 사이토 카인을 분비하여 결과적으로 α -SMA, 콜라겐, 그리고 메탈로프로테이나제 조직 억제제(TIMP)와 같은 세포 외 기질 관련 분자들을 생산한다.

[0006] 간 섬유화에 관여하는 대표적 세포 내 신호전달은 간성상세포의 가장 강력한 섬유화 촉진 사이토카인인 TGF- β 를 통해 이루어진다. 간성상세포로부터 생산된 TGF- β 는 유형 II 수용체와 결합하여 유형 I 수용체를 인산화시키고 이는 곧 smad2 및 smad3와 접촉하여 이들을 인산화시킨다. 이후 smad2 및 smad3 결합체는 smad4와 결합한 후 핵 내로 이동하며 목표유전자의 전사를 조절한다. 반면 Smad7은 유형I 수용체와 작용하여 smad2 및 smad3의 인산화를 방해하며 TGF- β 에 의한 smad 신호전달을 방해함으로써 간섬유화를 지연시키는데 작용한다.

[0007] 지금까지 간섬유화 과정은 비가역적인 반응으로 알려졌으나, 최근 임상 및 실험 연구를 통해 간섬유화 과정이 가역적 반응이며, 이를 통해 간섬유화 정도를 조절할 수 있음이 보고된 바 있다. 따라서 활성화된 간성상세포를 통한 간 섬유증의 진행 억제 연구가 주목을 받기 시작했다.

[0008] 한편, AIMP1 펩타이드는 저산소증, 저혈당증 등이 발생하는 경우 생성되는 물질로 혈관내피세포 및 면역세포에서 아고니스트(agonist) 또는 길항제(antagonist) 효과를 나타낸다. 한편, 아직까지 AIMP1 펩타이드가 간 질환에 미치는 영향과 그 메커니즘에 대해서는 연구되거나 보고된 바가 없다.

[0009] 본 발명자들은 간질환의 예방 및 치료 효과가 우수한 약물을 개발하기 위하여 연구하던 중, AIMP1 펩타이드의 간질환에 대한 예방 및 치료 효과, 보다 구체적으로는 AIMP1 펩타이드의 간섬유화 및 간경화에 대한 효과적인 예방 및 치료효과를 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 AIMP1 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 목적은 AIMP1 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간기능 개선용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 AIMP1 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 AIMP1 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 AIMP1 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간기능 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 AIMP1 펩타이드는 ERK(extracellular signal-regulated kinase) 활성화를 통해 smad2 위치를 조절하고, 콜라겐 I과 같은 섬유화 인자들의 발현을 억제함으로써 간섬유증, 더 나아가 간경화 등의 예방 및 치료에 뛰어난 효과를 가지므로, 간질환 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물 및 건강기능식품 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 LX2 세포주(인간 간성상 세포주)에서 시간 경과에 따른 AIMP1 펩타이드에 의한 ERK의 활성화 및 smad2/3의 인산화의 억제 여부를 웨스턴 블롯(좌) 및 면역침강법(우)을 통하여 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 2는 LX2 세포주에서 시간 경과에 따른 AIMP1 펩타이드 및 U0126에 의한 ERK의 활성화 및 smad2/3의 인산화의 억제 여부를 웨스턴 블롯(좌) 및 면역침강법(우)을 통하여 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 3은 LX2 세포주의 핵과 세포질에서 AIMP1 펩타이드 및 TGF- β 에 의한 p-smad, smad2/3, smad4, α -튜블린 및 라민 A/C의 농도 변화를 웨스턴 블롯을 통하여 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 4는 LX2 세포주의 핵과 세포질에서 AIMP1 펩타이드 및 TGF- β 에 의한 p-smad2/3, smad4 및 이들의 결합 형태를 면역형광법을 통하여 확인한 결과 및 그 중 p-smad2/3의 비 변화를 도표화한 결과를 나타내는 도이다.

도 5는 LX2 세포주에서 AIMP1 펩타이드 및 TGF- β 에 의한 콜라겐 I의 활성을 웨스턴 블롯(상), RT-PCR(좌) 및 발광효소 활성 분석(우)을 통하여 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 6은 LX2 세포주에서 AIMP1 펩타이드, TGF- β 및 U0126에 의한 콜라겐 I의 활성을 웨스턴 블롯(상), RT-PCR(좌) 및 발광효소 활성 분석(우)을 통하여 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 7은 CC14로 유도된 간섬유증 마우스 모델에 AIMP1 펩타이드의 복강투여 후 간조직을 헤마토실린 및 에오신(H&E) 및 마송-트리크롬 염색(masson-trichrome staining)한 조직병리학적 분석 결과를 나타내는 도이다.

도 8은 CC14로 유도된 간섬유증 마우스 모델에 AIMP1 펩타이드를 농도별로 투여한 후, 혈액 샘플을 채취하여 수행한 생화학적 분석을 수행한 결과를 나타내는 도이다.

도 9는 CC14로 유도된 간섬유증 마우스 모델에 스크램블된 AIMP1 펩타이드 및 AIMP1 펩타이드를 투여한 후, 조직병리학적 검사 및 면역조직화학 검사를 수행한 결과를 나타내는 도이다.

도 10은 CC14로 유도된 간섬유증 마우스 모델에 스크램블된 AIMP1 펩타이드 및 AIMP1 펩타이드를 투여한 후 면역조직화학 검사 수행하고, 그 결과를 수치화하여 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명은 AIMP1 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0022] 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 포함한다.

[0023] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0024] 본 발명의 유효성분인 AIMP1 펩타이드는 서열번호 1로 표시되는 총 312개의 아미노산으로 이루어진 것으로, 전립선암, 면역, 형질전환 세포를 포함하는 다양한 형태의 세포로부터 분비되며, 분비된 AIMP1은 단핵구/마크로파지, 내피세포 및 섬유아세포와 같은 다양한 표적세포에 적용하는 것으로 알려져 있다.

[0025] 본 발명에 따른 AIMP1 펩타이드는 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 중 6-46의 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드일 수 있으며, 이의 기능적 동등물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 상기 기능적 동등물이란 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보

다 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성(즉, 동일성)을 갖는 펩타이드를 말한다. 예를 들면, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 펩타이드를 포함하는 것으로, AIMP1 펩타이드와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 펩타이드를 말한다. 여기서, "실질적으로 동질의 생리활성"이란 AIMP1 펩타이드가 콜라겐 I 을 억제하여 간섬유화 작용, 더 나아가 간경화 작용을 억제하는 것을 비롯하여 AIMP1 펩타이드의 본래의 활성을 보이는 것을 의미한다. 상기 기능적 동등물은 서열번호 1의 아미노산 서열 중 일부가 부가, 치환 또는 결실의 결과 생성될 것일 수 있다. 상기에서 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met). 또한 상기 기능적 동등물에는 본 발명의 AIMP1 펩타이드의 아미노산 서열상에서 아미노산의 일부가 결실된 변형체도 포함된다.

[0027] 상기 아미노산의 결실 또는 치환은 바람직하게는 본 발명의 AIMP1 펩타이드의 생리활성에 직접적으로 관련되지 않은 영역에 위치해있다. 또한 아미노산의 결실은 바람직하게는 AIMP1 펩타이드의 생리활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다. 아울러 상기 AIMP1 펩타이드의 아미노산 서열의 양 말단 또는 서열 내에 몇몇의 아미노산이 부가된 변형체도 포함된다. 또한 본 발명의 기능적 동등물의 범위에는 본 발명에 따른 AIMP1 펩타이드의 기본 골격 및 이의 생리 활성을 유지하면서 일부 화학 구조가 변형된 유도체도 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 AIMP1 펩타이드의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조변경이 이에 포함된다.

[0028] 본 명세서에서 서열 상동성 및 동질성은 AIMP1 펩타이드의 아미노산 서열과 후보 서열을 정렬하고 갭(gaps)을 도입한 후 각각의 아미노산 서열에 대한 후보 서열의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 필요한 경우, 최대 백분율 서열 동질성을 수득하기 위하여 서열 동질성의 부분으로서 보존적 치환은 고려하지 않는다. 또한, AIMP1 펩타이드의 아미노산 서열의 N-말단, C-말단 또는 내부 신장, 결손 또는 삽입은 서열 동질성 또는 상동성에 영향을 주는 서열로서 해석되지 않는다. 또한, 상기 서열 동질성은 두 개의 펩타이드의 아미노산 서열의 유사한 부분을 비교하기 위해 사용되는 일반적인 표준 방법에 의해 결정할 수 있다.

[0029] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 AIMP1 펩타이드의 함량은, 치료제의 사용방법, 복용자의 상태, 질환의 종류 및 중증 정도에 따라 적절히 조절할 수 있다.

[0030] 상기 AIMP1 펩타이드는 당업계에서 공지된 화학적 합성(Creighton, Proteins; Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman and Co., NY, 1983)에 의해 쉽게 제조될 수 있다.

[0031] 상기 AIMP1 펩타이드는 ERK(extracellular signal-regulated kinase) 활성화를 통해 smad2 위치를 조절하고, 콜라겐 I과 같은 섬유화 인자들의 발현을 억제할 수 있으며 이를 통해 간섬유화를 억제, 더 나아가 간경화를 억제하는 효과를 가지고 있다. 따라서, 상기 AIMP1 펩타이드는 간질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[0032] 상기 간질환은 간섬유증 또는 간경화증, 급만성 간염, 지방간 또는 간암을 포함하며 바람직하게는 간섬유증 또는 간경화증일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 간섬유증일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 본 발명의 조성물은 AIMP1 펩타이드와 함께 간질환에 대하여 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0034] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명의 조성물은 실제 임상투여시에 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있으며, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 이용하는 것이 바람직하다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히

드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유 등이 있다.

- [0036] 상기 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스 (Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 또한, 상기 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0037] 상기 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 상기 비경구투여는 피부 외용 또는 복강 내 주사, 직장 내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 사용하여 이루어질 수 있다.
- [0038] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0039] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 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 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 약학적 조성물은 간질환의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 용어 "예방"은 본 발명의 약학적 조성물의 투여로 간질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, 용어 "치료"는 본 발명의 약학적 조성물에 의해 간질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0043] 또한, 본 발명은 AIMP1 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0044] 또한, 본 발명은 AIMP1 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 간기능 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0045] 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.
- [0046] 본 발명의 AIMP1 펩타이드를 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 AIMP1 펩타이드를 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 AIMP1 펩타이드는 원료에 대하여 15 중량% 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.
- [0047] 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.
- [0048] 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 이나, 이에 제한되지 않는다.

- [0049] 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, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 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.
- [0051] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예, 실험예 및 제제예를 제시한다. 그러나 하기 실시예, 실험예 및 제제예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0053] **실시예 1. AIMP1 펩타이드의 제조**
- [0054] 전체 312개의 아미노산으로 구성된 AIMP1 단백질 서열 중 6-46 아미노산을 합성하여 본 연구에 이용하였으며, 상기 AIMP1 정보는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/Q12904.2>에서 확인할 수 있다.
- [0056] **실험예 1. 웨스턴 블롯 및 면역침강법을 통한 AIMP1 펩타이드의 LX2 세포주(인간 간 정상 세포주)에서 p-smad2 이동 억제 효과 확인**
- [0057] AIMP1 펩타이드가 LX2 세포에서 ERK 인산화를 통한 p-smad2 핵으로의 이동을 억제하는지 여부를 확인하기 위하여 웨스턴 블롯 및 면역침강법을 수행하였다. 이때 필요한 무한증식 인간 간성상세포인 LX2 세포주는 S.L.Friedman 교수(Liver Disease Research Center of San Francisco General Hospital, San Francisco, CA, USA)로부터 공급받았고, 2% 소태아혈청(PBS) 및 1% 스트렙토마이신/페니실린으로 보충된 하이-글루코스 둘베코 수정이글매지(DMEM; Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 배양하여 사용하였다.
- [0058] LX2 세포에 AIMP1을 처리한 후, p-EPK, EPK, 튜블린에 대한 항체를 이용하여 통상의 방법으로 시간 경과에 따른 웨스턴 블롯을 수행하였다. 다음으로 면역침강법 수행을 위해 상기와 같이 배양한 LX2 세포(5×10^4 세포)를 4시간 동안 혈청 기아배양하였고, AIMP1 펩타이드($5 \mu\text{g/ml}$)를 처리하였다. 그 후 세포를 RIPA 버퍼로 용해하고(lysed) 30분 동안 냉동실에서 배양하였다. 세포 용해물은 10분 동안 4°C 에서 $25,000 \times g$ 으로 원심분리하여 제조하였다. 단백질을 추출물($300 \mu\text{g}$)을 항-smad2/3 항체($1.5 \mu\text{g}$; Cell Signaling Technology)와 함께 4°C 에서 4시간 동안 배양한 후 아가로스과 함께 4°C 에서 4시간 동안 배양하였다. 비드는 β -머캅토포에탄올이 포함되지 않은 RIPA 버퍼로 3번 세척하였다. 샘플을 가열한 후, 9% SDS-PAGE로 로드하였다. smad2/3의 인산화는 pSer 항체(Abcam)로 확인하였다. 그 결과는 도 1에 나타내었다. 이때 대조군으로서 튜블린(tubulin)을 사용하였다.
- [0059] 다음으로 면역침강법 수행을 위해 상기와 같이 배양한 LX2 세포(5×10^4 세포)를 4시간 동안 혈청 기아배양하였고, AIMP1 펩타이드($5 \mu\text{g/ml}$)를 처리하였다. 그 후 세포를 RIPA 버퍼로 용해하고(lysed) 30분 동안 냉동실에서 배양하였다. 세포 용해물은 10분 동안 4°C 에서 $25,000 \times g$ 으로 원심분리하여 제조하였다. 단백질 추출물($300 \mu\text{g}$)을 항-smad2/3 항체($1.5 \mu\text{g}$; Cell Signaling Technology)와 함께 4°C 에서 4시간 동안 배양한 후 X2아가로스과 함께 4°C 에서 4시간 동안 배양하였다. 비드는 β -머캅토포에탄올이 포함되지 않은 RIPA 버퍼로 3번 세척하였다. 샘플을 가열한 후, 9% SDS-PAGE로 로드하였다. smad2/3의 인산화는 p-Ser 항체(Abcam)로 확인하였다. 이상의 실험 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0060] 도 1에 나타난 바와 같이, AIMP1 펩타이드의 처리 시간이 증가함에 따라, LX2 세포에서 ERK가 활성화되고 smad2/3의 세린 잔기의 인산화가 증가함을 확인하였다.
- [0061] 다음으로, LX2 세포주에 AIMP1 펩타이드와 함께 ERK 억제제인 U0126($10 \mu\text{M}$)을 처리한 후 상기와 같은 방법으로 웨스턴 블롯 및 면역침강법을 수행하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0062] 도 2에 나타난 바와 같이, AIMP1 펩타이드의 처리에 의해 증가한 p-ERK 및 smad2/3의 인산화가 ERK 억제제인 U0126의 처리로 인해 감소함을 확인하였다.

- [0064] **실험예 2. 웨스턴 블롯 및 면역형광법을 통한 AIMP1 펩타이드의 LX2 세포주에서 smad2/3 핵으로의 이동 억제 효과 확인**
- [0065] AIMP1 펩타이드가 LX2 세포에서 ERK 인산화를 유도하는지 여부를 확인하기 위하여 p-smad, smad2/3, smad4, α -튜블린(tubulin) 및 라민 A/C에 대하여 웨스턴 블롯(western blot); 및 p-smad2/3, smad4에 대해 면역 형광법을 수행하였다.
- [0066] 보다 구체적으로, LX2 세포주에 AIMP 1 펩타이드 또는 TGF- β 를 처리한 후, 20분 동안 15,000 rpm으로 원심분리하였다. 이를 핵/세포질 분획 키트(BioVision)를 이용하여 핵과 세포질로 각각 분획한 후에 p-smad2, p-smad3, smad2/3, smad4, α -튜블린, 라민 L/C에 대한 1차 항체를 이용하여 통상의 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하였다. 이때, α -튜블린은 세포질의 마커로서, 라민 A/C는 핵의 마커로서 각각 사용되었다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0067] 도 3에 나타난 바와 같이, TGF- β 로 섬유화 유도된 LX2 세포주에서 p-smad2 및 p-smad3가 핵에서 높은 농도로 발견되었으며, 이에 AIMP1 펩타이드를 함께 처리할 경우 활성화된 p-smad2 및 p-smad3의 핵에서의 농도가 감소하고 세포질에서의 농도가 증가함을 확인하였다. 이는 TGF- β 로 섬유화가 유도된 경우 p-smad2 및 p-smad3가 인산화되어 핵으로 이동하게 되는데, AIMP1 펩타이드 처리에 의해 이러한 활성화된 smad2/3의 핵으로의 이동이 억제됨을 나타낸다.
- [0068] 다음으로, 면역형광법 수행을 위해 LX2 세포 (2×10^4 세포)를 24-웰 플레이트의 둥근 유리 커브슬립(VWR LabShop, Batavia, IL, USA)에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 12시간 동안 0.5% FBS 기아배양(starvation) 처리하고, 상기 세포에 30분 동안 5 μ g/ml의 AIMP1 펩타이드를 처리하였으며, 이 후 1시간 동안 2 ng/ml의 TGF- β 를 처리하였다. 상기 세포를 10분 동안 4% 포름알데하이드로 고정하고 5분 동안 PBST 버퍼로 세척하였다. 상기 고정된 세포를 항체의 비특이적 결합을 막기 위해 5% BSA를 포함하는 PBST 용액에서 추가적으로 30분 동안 배양하였고, 상온에서 1시간 동안 Alexa 488 및 594-결합된 염소 항-마우스 또는 항-토끼 이차 항체(Molecular Probes)와 함께 배양하였다. 핵 DNA는 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindol)로 대비염색하였고, Leica 공초점 현미경 TCS SP5(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)로 형광 발현을 관찰하였다. 형광 사진 및 핵에서의 P-Smad2/3에 대한 비율 계산 결과를 도표화한 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0069] 도 4에 나타난 바와 같이 TGF- β 로 섬유화를 유도한 후, AIMP1 펩타이드를 처리하였을 때 핵에서 인산화된 smad2/3의 발현 정도가 감소됨을 확인하였다. 이는 AIMP1 펩타이드가 활성화된 smad2/3의 핵으로의 이동을 억제하여 간섬유화 작용, 더 나아가 간경화 작용을 억제함을 나타낸다.
- [0071] **실험예 3. 웨스턴 블롯, RT-PCR 및 발광효소 활성 분석(Luciferase activity assay)을 통한 AIMP1 펩타이드의 LX2 세포주에서 콜라겐 I의 합성 억제 효과 확인**
- [0072] AIMP1 펩타이드가 콜라겐 I의 합성을 억제하는지 여부를 확인하기 위하여 웨스턴 블롯, RT-PCR 및 발광효소 활성 분석을 수행하였다.
- [0073] 보다 구체적으로, LX2 세포주에 TGF- β 를 처리하여 간 섬유화를 유도한 후, AIMP1 펩타이드를 농도별로 처리하였다. 상기 세포주로부터 전체 단백질을 분리한 후, 콜라겐 I 및 튜블린에 대한 1차 항체를 이용하여 통상의 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하였다.
- [0074] 다음으로, RT-PCR 수행을 위해 상기와 같이 TGF- β 및 AIMP1 펩타이드를 농도별로 처리한 LX2 세포주로부터 RNA 분리 키트(iNtRON Biotechnology, Inc., Seoul, Korea)를 사용하여 전체 RNA를 추출하였다. 전체 RNA(0.5 μ g)의 역전사를 통해 cDNA를 제조하였으며, 상기 cDNA를 주형으로 AccuPower GreenStar qPCR PreMix(SYBR-Green PreMix; Bioneer Corp., Daejeon, Korea) 및 StepOne 실시간 PCR 시스템(Applied Biosystem)을 이용하여 제조자의 방법에 따라 실시간 PCR을 수행하였다. 이때 이용된 프라이머는 다음과 같다; 콜라겐 I mRNA(NM_000088.3)(정방향, 5'-CCCCTGGAAAGATGGAGATG-3' 및 역방향, 5'-TCCAAACCACTGAACCTCTG-3'); GAPDH(정방향, 5'-CGAGATCCCTCCAAATCAA-3' 및 역방향, 5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3').
- [0075] 추가적으로, 발광효소 활성 분석을 위해 TGF- β 및 AIMP1 펩타이드를 농도별로 처리한 LX2 세포(5×10^4 세포)를 12-웰 플레이트에 시드하고(seeded) 2% 소태아 혈청(FBS) 및 1% 스트렙토마이신/페니실린을 보충한 DMEM으로 배양하였다. 상기 LX2 세포를 12시간 동안 SMAD 결합 요소(SBE)를 포함한 SBE4-Luc 벡터 및 Lipofectamine

2000(Invitrogen)을 사용한 *Renilla* 발광효소와 함께 배양하였다. 상기 세포를 4시간 동안 0.5% FBS로 혈청 기아배양한 후에 AIMP1 펩타이드로 10분 동안 처리하고 이 후 TGF- β 를 추가한 후, 다시 20시간을 방치하였다. 발광효소 활성은 Dual-Luciferase Reporter Assay 시스템(Promega)으로 결정하고 GloMax(Promega)를 사용하여 정량화하였으며, 발광효소는 *Renilla* 발광효소 활성으로 정규화하였다. 이상의 실험 결과를 도 5에 나타내었다.

[0076] 도 5에 나타낸 바와 같이, LX2 세포주에서 AIMP1 펩타이드의 처리 농도가 증가함에 따라 TGF- β 의 처리에 의해 증가된 콜라겐 I의 발현이 감소함을 확인하였다.

[0077] 또한, LX2 세포주에 U0126을 더 처리한 후, 상기와 같은 방법으로 웨스턴 블랏, RT-PCR 및 발광효소 활성 분석법을 수행하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0078] 도 6에 나타낸 바와 같이, AIMP1 펩타이드에 의해 감소된 콜라겐 I의 발현이 ERK 억제제인 U0126의 처리에 의해 감소됨을 확인하였다.

[0079] 이상의 실험 결과를 통하여, AIMP1 펩타이드가 간성상세포에서 세포 증식과 섬유화 마커로 알려진 콜라겐 I의 발현을 억제함을 통해 간섬유화 작용, 더 나아가 간경화 작용을 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0081] 실험예 4. 조직병리학 검사(histopathology)를 통한 마우스 모델에서 AIMP1 펩타이드의 간섬유증 완화 효과 확인

[0082] AIMP1 펩타이드가 CCl₄ 유도된 마우스 모델에서 간섬유증에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 조직병리학 검사를 수행하였다. 해당 동물 실험을 위해 필요한 수컷 BALB/c 마우스(무게 20~22g)는 Orient Bio. Animal Inc. (Seoul, Republic of Korea)로부터 공급받았다. 동물 관리 및 모든 실험적인 과정은 인하대 의과대학 Inha Institutional Animal Care and Use Committee (Inha IACUC)의 승인과 가이드라인에 따라 수행하였다. 동물은 표준 먹이 및 물을 자유롭게 공급하였고, 21℃에서 12시간 동안 암/광 사이클로 배양했다. 극심한 간 손상은 한 달 동안 일주일에 2번씩 일회량(150 μ l) 40% CCl₄를 함유하는 콘오일을 복강내 주사하여 유도하였다. 대조군 마우스는 동일한 부피의 콘오일만 처리하였고, 실험군 마우스는 스크램블된 AIMP1 펩타이드 및 AIMP1 펩타이드를 CCl₄ 투여하는 2주 동안 일주일에 2번씩 복강 내 주사 처리하였다(스크램블된 AIMP1 펩타이드를 처리한 마우스 그룹은 음성 대조군이다). 모든 마우스는 처리 4주 후에 에테르로 마취하고, 희생시킨 후에 간을 분리해내어 무게를 잰 뒤 조직병리학 검사를 위해 10% 중성 버퍼 포르말린으로 즉시 고정하였다.

[0083] 보다 구체적으로, 조직병리학 검사를 위해 10% 포르말데하이드 완충용액으로 고정된 간 샘플에 파라핀 슬라이스 기술을 사용하였다. 상기 간 조직을 헤마토실린 및 에오신(H&E)로 염색했다. 보다 구체적으로, 조직은 3분 동안 헤마토시린으로 염색하고 씻어낸 후, 추가적으로 3분 동안 0.5% 에오신으로 염색했다. 또한 간섬유화 정도를 확인하기 위하여, 상기 간 조직 샘플을 표준 프로토콜에 따라 Masson's trichrome법으로 염색하였다. 염색 후, 물로 추가적으로 세척한 다음에 슬라이드를 연속적으로 70, 95 및 100% 에탄올로 탈수시키고 자일렌으로 세척하였다. 간 손상의 정도는 광학현미경(Olympus)으로 관찰하였으며, 그 결과는 도 7에 나타내었다.

[0084] 도 7에서 나타낸 바와 같이, 염색 부위의 크기를 통하여 AIMP1 펩타이드 처리에 의해 간손상 및 간 섬유화 정도가 감소됨을 확인하였고, 이는 AIMP1 펩타이드가 그 투여 용량에 비례하여 CCl₄ 유도된 간 손상, 즉 간섬유화를 완화시킴을 나타낸다.

[0086] 실험예 5. 생화학적 검사(biochemical parameter)를 통한 마우스 모델에서 AIMP1 펩타이드의 간섬유증 완화 효과 확인

[0087] AIMP1 펩타이드가 CCl₄ 유도된 마우스 모델에서 간섬유증에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 생화학적 검사를 수행하였다. 상기 실험예 4와 동일한 조건으로 처리한 마우스로부터 십이천자(cardiac puncture)를 통해 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액 샘플로부터, 혈청을 분리한 후, 상기 혈청 내에 존재하는 아스파르테이트 트랜스아미네이스(AST; aspartate transaminase), 알라닌 트랜스아미네이스(ALT; alanine transaminase)을 포함하는 간손상 마커와 총 빌리루빈(Serum Total-Bilirubin), D-빌리루빈(D-Bilirubin), 알부민, 혈액요소질소(BUN)를 포함하는 간섬유증 마커의 정도를 Green Cross Reference Lab (Seoul, Republic of Korea)에 의뢰하여 측정하였으며, 그 결과는 표 1 및 도 8에 나타내었다

표 1

		CCl ₄		
	대조군		sAIMP1	AIMP1
AST	155.50±23.46	232.17±21.60 ^a	192.20±17.68	169.33±26.91 ^c
ALT	57.83±5.81	135.00±12.07 ^b	123.60±19.17	102.00±9.16 ^c
알부민	2.34±0.33	1.66±0.03 ^a	2.06±0.26	2.60±0.26 ^d
BUN	38.00±4.82	56.53±10.95 ^a	56.90±4.47	28.82±1.5 ^c

(대조군 대 CCl₄, P<0.05; P<0.01; CCl₄ 대 AIMP1, P<0.05; P<0.01)

표 1 및 도 8에 나타난 바와 같이, 음성대조군에서 증가한 혈청 총 빌리루빈, D-빌리루빈, AST, ALT 및 BUN의 농도가 AIMP1 펩타이드를 처리한 경우 유의하게 감소함을 확인하였다. 이를 통해, AIMP1 펩타이드는 생체 내 간 독성이 없으며, 간섬유화 치료 효과를 나타냄을 확인하였다.

실험예 6. 면역조직화학 검사(immunohistochemistry)를 통한 마우스 모델에서 AIMP1 펩타이드의 간섬유증 완화 효과 확인

AIMP1 펩타이드가 CCl₄ 유도된 마우스 모델에서 간섬유증에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 면역조직화학 검사를 수행하였다. 상기 실험예 4와 동일한 조건으로 처리한 마우스로부터 간 조직을 샘플을 수득하였으며, 이를 정상적인 염소 혈청 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에 1시간 동안 둔 후, TGF-β, 콜라겐 I 및 α-SMA(Sigma-Aldrich)로 특이적인 1차 항체와 함께 배양하였다. 결합되지 않은 1차 항체를 제거한 뒤에, 상기 간 조직을 1시간 동안 실온에서 1.5% 말 혈청/PBS에 포함된 2차 항체와 함께 배양하였다. 상기 간 조직은 ABC 키트(Vector Laboratories)를 사용하여 아비딘-비오틴 과산화효소 복합체 용액으로 시각화하였다. 이를 15분 동안 다이아미노벤지딘 테트라하이드로클로라이드 기질로 염색하고 이 후 핵은 별도로 헤마토실린으로 대비염색하였다. 그 결과를 측정한 사진은 도 9에 나타내었고 이를 수치화하여 도표로 작성한 것을 도 10에 나타내었다.

도 9 및 도 10에 나타난 바와 같이, AIMP1 펩타이드가 마우스 간 조직에서 교원섬유질 마커인 TGF-β, 콜라겐 I 및 α-SMA의 발현 수준을 감소시킴을 확인하였다. 이를 통해, AIMP1 펩타이드가 간섬유화 진행, 더 나아가 간경화를 억제하는 효과를 가짐을 확인하였다.

이상의 실험 결과는 평균값±SD으로 표현했고, ANOVA 및 unpaired Student's t-test로 분석하였다. AP-값 ≤ 0.05는 통계적으로 의미있는 결과를 나타내고, 통계적 계산은 Window로 작동하는 시스템(버전 10.0; SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)의 SPSS 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.

제제예 1. 약학적 제제의 제조

1. 산제의 제조

AIMP1 펩타이드 20 mg

유당 100 mg

탈크 10 mg

상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

2. 정제의 제조

AIMP1 펩타이드 10 mg

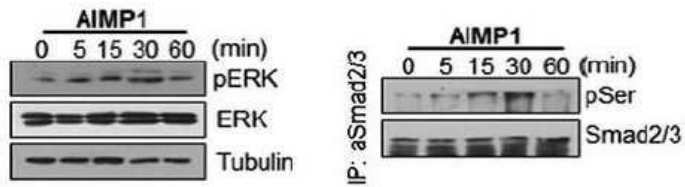
- [0107] 옥수수전분 100 mg
- [0108] 유당 100 mg
- [0109] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0110] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.
- [0112] 3. 캡슐제의 제조
- [0113] AIMP1 펩타이드 10 mg
- [0114] 결정성 셀룰로오스 3 mg
- [0115] 락토오스 14.8 mg
- [0116] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg
- [0117] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.
- [0119] 4. 주사제의 제조
- [0120] AIMP1 펩타이드 10 mg
- [0121] 만니톨 180 mg
- [0122] 주사용 멸균 증류수 2974 mg
- [0123] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 26 mg
- [0124] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.
- [0126] 5. 액제의 제조
- [0127] AIMP1 펩타이드 20 mg
- [0128] 이성화당 10 g
- [0129] 만니톨 5 g
- [0130] 정제수 적량
- [0131] 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.
- [0133] 제제예 2. 식품 제제의 제조
- [0134] 1. 건강기능식품의 제조
- [0135] AIMP1 펩타이드 100 mg
- [0136] 비타민 혼합물 적량
- [0137] 비타민 A 아세테이트 70 g
- [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 g
[0143]	비타민 C 10 mg
[0144]	비오틴 10 g
[0145]	니코틴산아미드 1.7 mg
[0146]	엽산 50 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
[0158]	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.
[0160]	<u>2. 건강기능음료의 제조</u>
[0161]	AIMP1 펩타이드 100 mg
[0162]	비타민 C 15 g
[0163]	비타민 E(분말) 100 g
[0164]	젖산철 19.75 g
[0165]	산화아연 3.5 g
[0166]	니코틴산아미드 3.5 g
[0167]	비타민 A 0.2 g
[0168]	비타민 B1 0.25 g
[0169]	비타민 B2 0.3 g
[0170]	물 정량
[0172]	통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1 시간 동안 85 에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 L 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다. 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요 계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하

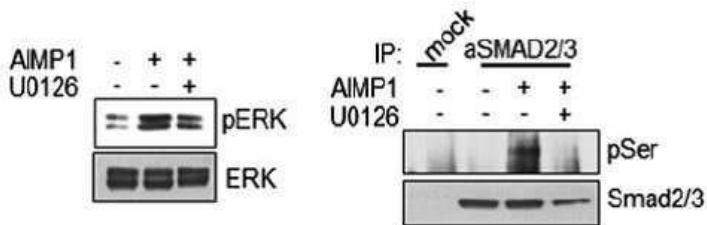
다.

도면

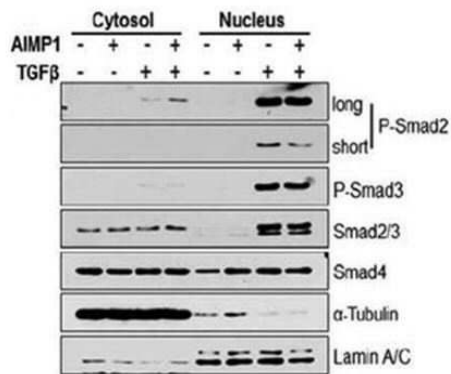
도면1



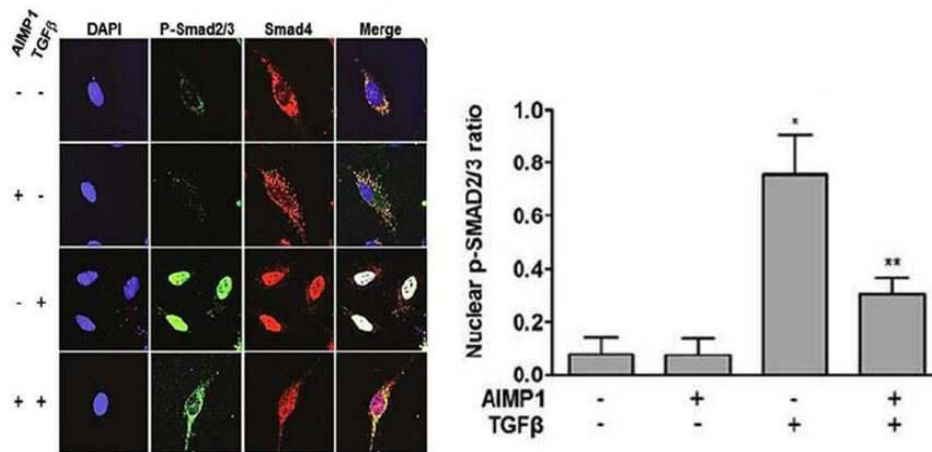
도면2



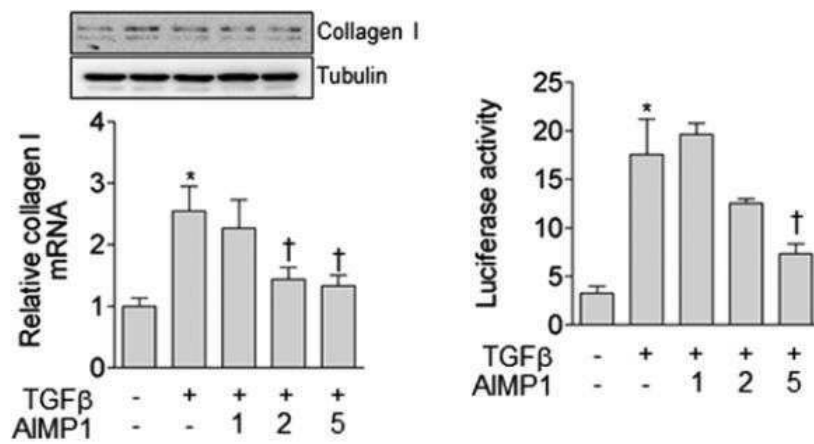
도면3



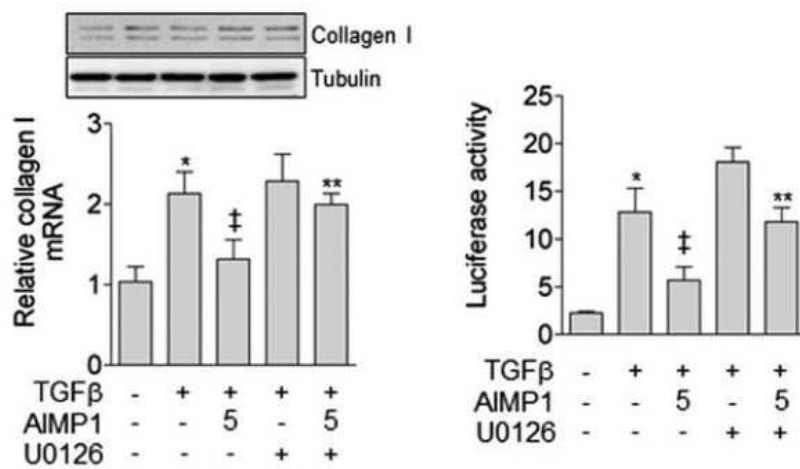
도면4



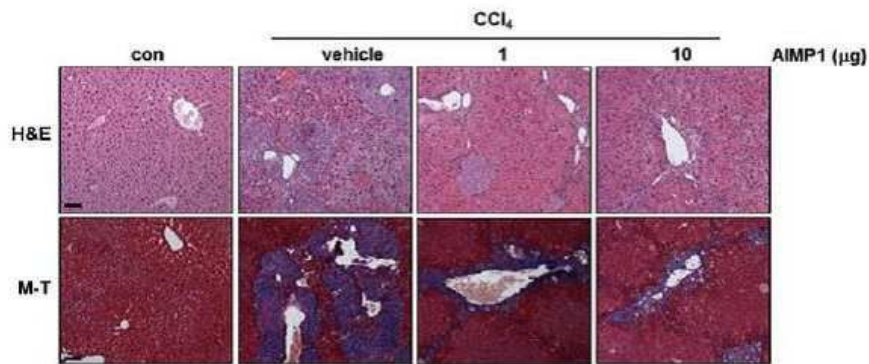
도면5



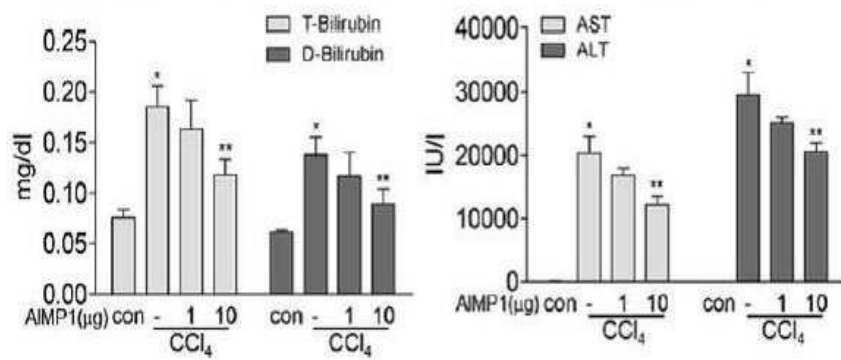
도면6



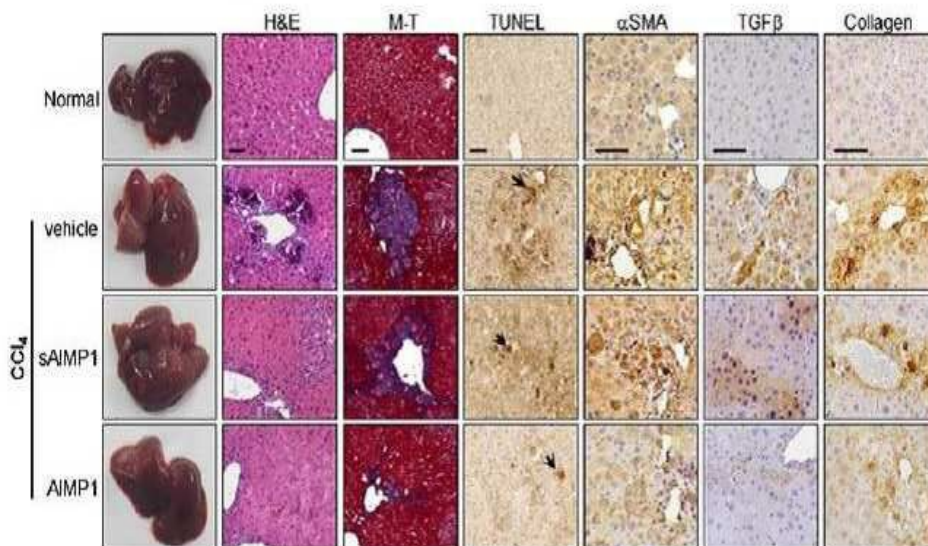
도면7



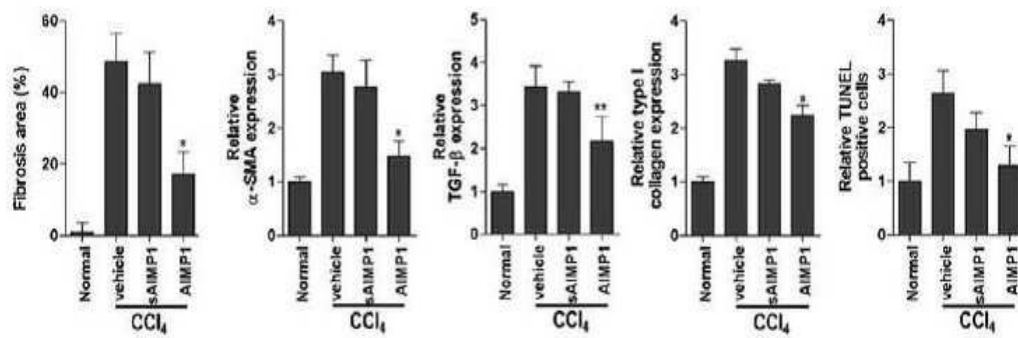
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
- <120> Peptide and composition containing the same for treating or preventing of liver disease
- <130> 195p
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 312
- <212> PRT
- <213> AIMP1
- <400> 1

Met Ala Asn Asn Asp Ala Val Leu Lys Arg Leu Glu Gln Lys Gly Ala
 1 5 10 15
 Glu Ala Asp Gln Ile Ile Glu Tyr Leu Lys Gln Gln Val Ser Leu Leu
 20 25 30
 Lys Glu Lys Ala Ile Leu Gln Ala Thr Leu Arg Glu Glu Lys Lys Leu
 35 40 45
 Arg Val Glu Asn Ala Lys Leu Lys Lys Glu Ile Glu Glu Leu Lys Gln
 50 55 60
 Glu Leu Ile Gln Ala Glu Ile Gln Asn Gly Val Lys Gln Ile Pro Phe
 65 70 75 80
 Pro Ser Gly Thr Pro Leu His Ala Asn Ser Met Val Ser Glu Asn Val
 85 90 95

Ile Gln Ser Thr Ala Val Thr Thr Val Ser Ser Gly Thr Lys Glu Gln

100 105 110

Ile Lys Gly Gly Thr Gly Asp Glu Lys Lys Ala Lys Glu Lys Ile Glu

115 120 125

Lys Lys Gly Glu Lys Lys Glu Lys Lys Gln Gln Ser Ile Ala Gly Ser

130 135 140

Ala Asp Ser Lys Pro Ile Asp Val Ser Arg Leu Asp Leu Arg Ile Gly

145 150 155 160

Cys Ile Ile Thr Ala Arg Lys His Pro Asp Ala Asp Ser Leu Tyr Val

165 170 175

Glu Glu Val Asp Val Gly Glu Ile Ala Pro Arg Thr Val Val Ser Gly

180 185 190

Leu Val Asn His Val Pro Leu Glu Gln Met Gln Asn Arg Met Val Ile

195 200 205

Leu Leu Cys Asn Leu Lys Pro Ala Lys Met Arg Gly Val Leu Ser Gln

210 215 220

Ala Met Val Met Cys Ala Ser Ser Pro Glu Lys Ile Glu Ile Leu Ala

225 230 235 240

Pro Pro Asn Gly Ser Val Pro Gly Asp Arg Ile Thr Phe Asp Ala Phe

245 250 255

Pro Gly Glu Pro Asp Lys Glu Leu Asn Pro Lys Lys Lys Ile Trp Glu

260 265 270

Gln Ile Gln Pro Asp Leu His Thr Asn Asp Glu Cys Val Ala Thr Tyr

275 280 285

Lys Gly Val Pro Phe Glu Val Lys Gly Lys Gly Val Cys Arg Ala Gln

290 295 300

Thr Met Ser Asn Ser Gly Ile Lys

305 310

<210> 2

<211> 41

<212> PRT

<213> AIMP1

<400> 2

Val Leu Lys Arg Leu Glu Gln Lys Gly Ala Glu Ala Asp Gln Ile Ile

1 5 10 15

Glu Tyr Leu Lys Gln Gln Val Ser Leu Leu Lys Glu Lys Ala Ile Leu

20 25 30

Gln Ala Thr Leu Arg Glu Glu Lys Lys

35 40