

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0137239
(43) 공개일자 2020년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/7048 (2006.01) *A23L 33/125* (2016.01)*A61K 33/243* (2019.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/7048 (2013.01)*A23L 33/125* (2020.05)

(21) 출원번호 10-2019-0063251

(22) 출원일자 2019년05월29일

심사청구일자 2019년05월29일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

(72) 발명자

장성욱

서울특별시 서초구 서초대로40길 72, 101동 508호(서초동, 한빛삼성아파트)

송인성

경기도 남양주시 늘을1로 41, 우림필류 104동 804호(호평동)

정유정

부산광역시 해운대구 윗반송로51번길 104-39(반송동)

(74) 대리인

특허법인 이룸리온

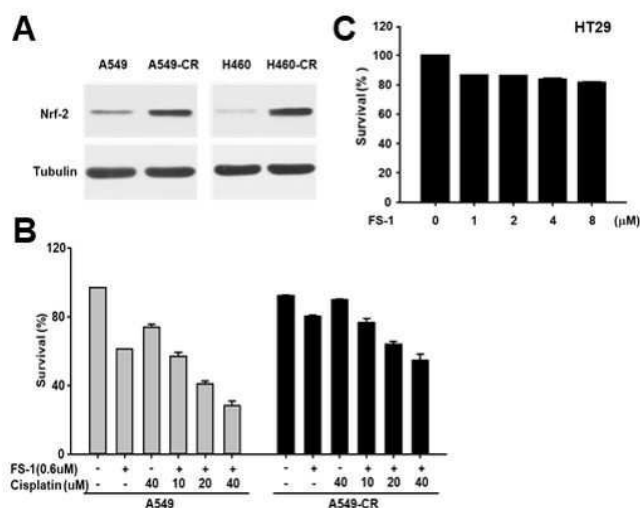
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 프루고사이드를 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 프루고사이드(Frugoside) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐암 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 33/243 (2019.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2016K1A1A8A01938718
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업 (바이오 의료기술개발사업)
연구과제명	미토콘드리아 및 안드로젠 수용체 타겟 전립선암 치료 후보물질 발굴
기 여 율	1/1
과제수행기관명	울산대학교
연구기간	2016.10.01 ~ 2019.09.30

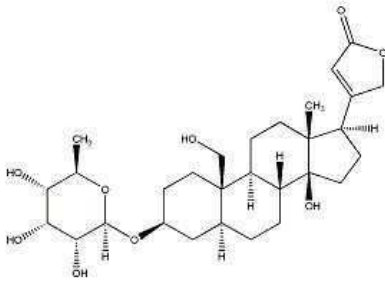
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 프루고사이드(Frugoside) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 폐암은 NRF2가 과발현되는 환자의 폐암인, 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 폐암은 편평상피세포암, 선암 및 대세포암으로 이루어진 군으로부터 선택된 비소세포성 폐암인, 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 폐암은 항암제 내성 폐암인, 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 프루고사이드(Frugoside) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 폐암 세포 내 활성 산소를 증가시키는, 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 약학 조성물은 시스플라틴(cisplatin)과 병용 처리하는, 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

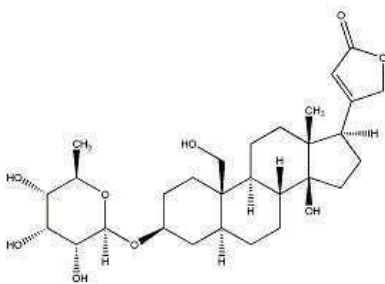
제6항에 있어서,

상기 프루고사이드(Frugoside) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 상기 시스플라틴(cisplatin)의 농도비는 1:5 내지 1:100인, 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

하기 화학식 1로 표시되는 프루고사이드(Frugoside) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 개선용 건강기능식품:

[화학식 1]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 프루고사이드를 유효성분으로 포함하는 폐암, 특히, NRF2가 과발현되는 환자의 폐암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 한국 중앙 암 등록본부의 자료에 의하면 한국인에게 가장 흔한 암은 위암, 갑상선암, 대장암, 폐암, 간암, 유방암 순이며, 사망률은 췌장암, 폐암, 간암 등의 순인 것으로 확인된다. 급속한 산업의 발전과 서구화된 생활방식, 고령화 사회 진입 및 질병구조의 변화로 인해 국내 암 발생 및 암으로 인한 사망률은 지속적으로 증가하고 있다.

[0004] 특히, 폐암은 전체 5년 생존율은 약 14%이고, 수술후 5년 생존율은 2B병기(약 39%)부터 약 50% 미만으로 생존율이 매우 낮은 암에 해당한다. 폐암의 약 85% 정도는 비소세포성 폐암(편평상피세포암, 선암 및 대세포암 등)이고, 약 15% 정도는 소세포성 폐암(소세포암 등)인데, 이러한 폐암은 예후가 매우 나쁘며 우수한 표적항암제가 절실히 요구되고 있는 실정이며, NRF2가 과발현되는 특징을 가지는 것으로 알려져 있다. 더욱이, 최근 연구에서는 폐암 중에서도 비소세포성 폐암에서 KEAP1(kelch-like ECH-associated protein 1) 유전자의 돌연변이와 LKB1(Liver kinase B1) 돌연변이가 흔히 함께 발생한다는 것이 보고되었다. KEAP1 돌연변이는 NRF2(Nuclear factor(erythroid-derived 2)-like 2)의 활성화를 유도하고, KEAP1 돌연변이 폐암에서 NRF2 활성화를 억제하였을 때 암세포의 성장이 효과적으로 억제됨이 보고되어, NRF2 억제제의 개발에 대한 요구가 큰 상황이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 일본등록특허공보 제4944380호(2012.03.09)

발명의 내용

해결하려는 과제

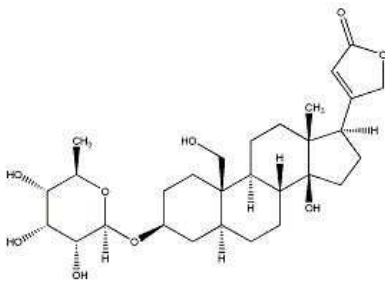
[0007] 본 발명은 프루고사이드(Frugoside) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물 등을 제공하고자 한다.

[0008] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 프루고사이드(Frugoside) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다:

[0011] [화학식 1]



[0012]

[0013] 상기 폐암은 NRF2가 과발현되는 환자의 폐암일 수 있다.

[0014] 상기 폐암은 편평상피세포암, 선암 및 대세포암으로 이루어진 군으로부터 선택된 비소세포성 폐암일 수 있다.

[0015] 상기 폐암은 항암제 내성 폐암일 수 있다.

[0016] 상기 프루고사이드(Frugoside) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 폐암 세포 내 활성 산소를 증가시킬 수 있다.

[0017] 상기 약학 조성물은 시스플라틴(cisplatin)과 병용 처리할 수 있다.

[0018] 상기 프루고사이드(Frugoside) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 상기 시스플라틴(cisplatin)의 농도비는 1:5 내지 1:100일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 구현예로, 상기 화학식 1로 표시되는 프루고사이드(Frugoside) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 프루고사이드(Frugoside) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐암, 특히, NRF2가 과발현되는 환자의 폐암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 프루고사이드(Frugoside)는 NRF2 활성화 억제를 통해 항산화 단백질의 발현을 감소시킴으로써, 폐암 세포 내 활성 산소를 증가시키거나, 폐암 세포 사멸 효과를 보인다.

[0022] 뿐만 아니라, 상기 프루고사이드(Frugoside)는 항암제(특히, 시스플라틴(cisplatin))에 의한 내성을 가진 폐암

에 대해서도 세포 사멸 효과를 보이는데, 항암제에 의한 내성을 극복할 수 있는 이점을 가진다. 뿐만 아니라, 시스플라틴(cisplatin)과 병용 처리시, 폐암 세포 사멸에 상승 효과를 보인다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1(A)는 프루고사이드(Frugoside; FS-1) 처리시, NRF2 타겟 유전자의 활성을 확인한 결과를 나타낸 것이고, 도 1(B)는 프루고사이드(Frugoside; FS-1) 처리시, 활성 산소를 측정한 결과를 나타낸 것이고, 도 1(C)는 프루고사이드(Frugoside; FS-1) 처리시, 농도 및 시간에 따른 NRF2 발현 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이며, 도 1(D)는 프루고사이드(Frugoside) 처리시, NRF2 타겟 유전자 발현 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2(A) 및 (B)는 단백질 신합성 저해제(cycloheximide) 및 단백질 분해 효소 26S 프로테아좀 저해제(MG132)의 처리에 의해, 프루고사이드(Frugoside; FS-1) 처리시, NRF2 분해 촉진 여부를 검증한 것이고, 도 2(C)는 과발현 NRF2를 통해, 프루고사이드(Frugoside; FS-1) 처리시, NRF2 분해 여부를 검증한 것이다.
- 도 3(A) 및 (B)는 NRF2 절단 모델을 이용하여, 프루고사이드(Frugoside; FS-1) 처리시, NRF2 안정성 감소 여부를 확인한 것이다.
- 도 4(A)는 폐암 세포주(A549, H460) 및 항암제 내성 폐암 세포주(A549-CR, H460-CR)에서 NRF2 발현 여부를 나타낸 것이고, 도 4(B)는 프루고사이드(Frugoside; FS-1) 단독 처리시, 혹은 프루고사이드(Frugoside; FS-1) 및 시스플라틴(cisplatin)의 병용 처리시, 폐암 세포주(A549) 및 항암제 내성 폐암 세포주(A549-CR)에서 폐암 세포 사멸 여부를 비교한 것이며, 도 4(C)는 프루고사이드(Frugoside; FS-1) 처리시, 대장암 세포주(HT29)에서 대장암 세포 사멸 여부를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

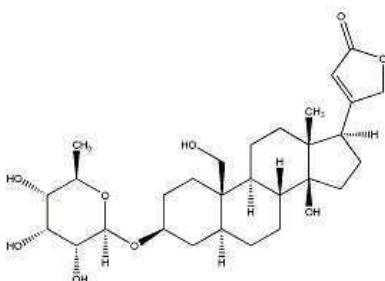
- [0025] 본 발명자들은 난치성 암(특히, NRF2가 과발현되는 폐암)의 치료 효과가 우수한 물질을 스크리닝하던 중, 프루고사이드(Frugoside)이 폐암 및 항암제 내성 폐암 모두에 대해 세포 사멸 효과를 보임을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

- [0027] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

- [0029] 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물

- [0030] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 프루고사이드(Frugoside) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다:

- [0031] [화학식 1]



- [0032]

- [0034] 본 발명에 따른 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물은 프루고사이드(Frugoside) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 한다.

- [0036] 상기 프루고사이드(Frugoside)(Cannogenol-3-O-beta-D-allomethylloside)의 IUPAC 명칭은 3-

[(3S,5R,8R,9S,10R,13R,14S,17R)-14-hydroxy-10-(hydroxymethyl)-13-methyl-3-[(3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-1,2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,15,16,17-tetradecahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-2H-furan-5-one이고, 분자식은 $C_{29}H_{44}O_9$ 이며, CAS 번호는 546-02-1(ChemIDplus) 또는 56324-39-1(EPA DSSTox)이다.

[0037] 상기 프루고사이드(Frugoside)는 풍선초(*Cardiospermum halicacadam*) 추출물로부터 분리된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 프루고사이드(Frugoside)는 풍선초 추출물의 분획물로부터 분리된 것일 수 있는데, 먼저, 상기 풍선초 추출물은 풍선초 건조물을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물로 추출한 것일 수 있고, 메탄올로 추출한 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 그밖에, 상기 프루고사이드(Frugoside)는 화학적 합성에 의해 제조될 수도 있다.

[0039] 한편, 본 명세서 내 "약학적으로 허용 가능한 염"은 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염일 수 있다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설페이트, 바이설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[0040] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 상기 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 동량의 상기 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0041] 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 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0042] 또한, 본 발명의 상기 화합물은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함한다.

[0043] 본 발명에 따른 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 상기 화합물을 수산화성 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세토니트릴 등에 녹이고 과량의 유기산을 가하거나 무기산의 산 수용액을 가한 후 침전시키거나 결정화시켜서 제조할 수 있다. 이어서 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시켜서 부가염을 얻거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수 있다.

[0045] 상기 프루고사이드(Frugoside) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 NRF2 활성화를 억제하거나, NRF2를 분해할 수 있다. 이로써, 상기 프루고사이드(Frugoside) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 폐암 세포 내 활성 산소를 증가시킬 수 있다. 구체적으로, 상기 NRF2의 분해는 NRF2의 β -TRCP 결합 도메인에 해당하는 Neh 도메인에서 주요하게 이루어질 수 있다.

[0046] 다시 말해, 상기 프루고사이드(Frugoside)는 NRF2 활성화 억제(NRF2 분해)를 통해 항산화 단백질의 발현을 감소시킴으로써, 폐암 세포 내 활성 산소를 증가시키는바, 폐암 세포 사멸 효과를 보인다.

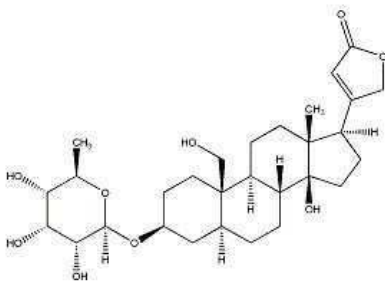
- [0048] 한편, 상기 프루고사이드(Frugoside)의 농도는 $0.001\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 $10\text{mg}/\text{ml}$ 인 것이 바람직하고, $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 $5\text{mg}/\text{ml}$ 인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 프루고사이드(Frugoside)는 상기 조성물에 적은 농도로 포함되더라도, 충분한 폐암 예방 또는 치료 효과를 보일 수 있는 이점을 가진다. 이때, 프루고사이드(Frugoside)의 농도가 상기 범위 미만인 경우, 폐암에 대한 세포 사멸 효과를 제대로 발휘하기 어려운 문제점이 있고, 프루고사이드(Frugoside)의 농도가 상기 범위를 초과하는 경우, 세포독성을 포함한 독성의 우려사항이 있을 수 있다.
- [0050] 상기 폐암은 비소세포성 폐암 및 소세포성 폐암을 포함하는 것으로, 구체적으로, 상기 폐암은 편평상피세포암, 선암, 대세포암 및 소세포암으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0051] 더욱이, 상기 폐암은 NRF2가 과발현되는 환자의 폐암일 수 있는데, 상기 프루고사이드(Frugoside)는 NRF2 활성화 억제를 통해 항산화 단백질의 발현을 감소시킴으로써, 폐암 세포 내 활성 산소를 증가시키면서, 폐암 세포 사멸 효과를 보인다. 다만, 대장암과 같이 NRF2가 과발현되지 않은 암에 대해서는 세포 사멸 효과가 미미한 수준에 불과하다.
- [0052] 본 명세서 내 "환자"라 함은 예방, 개선 또는 치료를 필요로 하는 개체를 광범위하게 의미하는 것으로, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0053] 특히, 상기 폐암 중에서도 NRF2의 활성화를 유도하는 KEAP1(kelch-like ECH-associated protein 1) 유전자의 돌연변이가 발생하는 폐암인 것이 바람직하고, KEAP1 유전자의 돌연변이가 흔히 발생하는 편평상피세포암, 선암 및 대세포암으로 이루어진 군으로부터 선택된 비소세포성 폐암인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0055] 또한, 상기 폐암은 항암제 내성이 생기지 않은 상태뿐만 아니라, 항암제 내성이 생긴 상태를 포함할 수 있다. 이때, 상기 항암제 내성은 시스플라틴(cisplatin) 내성일 수 있다.
- [0056] 구체적으로, 상기 시스플라틴(cisplatin)은 폐암에 사용되는 알킬화제로서, DNA가 복제, 전사, 결합되는 과정에 관여하여 이러한 과정을 차단함으로써, 항암 효과를 나타낸다. 보다 구체적으로, 상기 시스플라틴(cisplatin)은 백금원자에 2개의 염소와 암모니아가 배위한 화합물로서, 백금착염이 대장균의 분열을 저지하는 것으로부터 알려졌다. 작용기구는 DNA에 반응하여 DNA 사슬 사이 혹은 사슬 내에서 가교를 형성하여 DNA 합성을 저해하여 세포장해를 유발시키는 것으로 되어 있다. 많은 암에 유효성을 나타내는 뛰어난 항암제이지만, 신장에 독성을 나타내는 등의 부작용도 있다.
- [0058] 상기 약학 조성물은 시스플라틴(cisplatin)과 병용 처리할 수 있는데, 이 경우, 폐암 예방, 치료 또는 개선에 상승 효과를 기대할 수 있다.
- [0059] 상기 병용 처리시, 상기 프루고사이드(Frugoside) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 상기 시스플라틴(cisplatin)의 농도비는 1:5 내지 1:100일 수 있고, 1:30 내지 1:100인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0061] 본 발명에 따른 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구제 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화되어 사용할 수 있고, 제형화를 위하여 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.
- [0062] 상기 담체 또는, 부형제 또는 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한 다양한 화합물 혹은 혼합물을 들 수 있다.

- [0063] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 충량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조할 수 있다.
- [0064] 경구 투여를 위한 고형제제는 상기 프루고사이드(Frugoside)에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 제조할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다.
- [0065] 경구를 위한 액상 제제로는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용하는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다.
- [0066] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등을 사용할 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤젤라틴 등을 사용할 수 있다.
- [0067] 본 발명에 따른 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서는 1일 0.0001 내지 2,000 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 2,000 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어서 투여할 수도 있다. 다만, 상기 투여량에 의해서 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0068] 본 발명에 따른 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유 동물에 다양한 경로로 투여할 수 있다. 투여의 모든 방식은 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular) 주사에 의해서 투여할 수 있다.

[0070] 폐암 예방 또는 개선용 건강기능식품

[0071] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 프루고사이드(Frugoside) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 폐암 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다:

[0072] [화학식 1]



- [0073]
- [0075] 본 발명에 따른 폐암 예방 또는 개선용 건강기능식품은 프루고사이드(Frugoside) 또는 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 것으로, 상기 프루고사이드(Frugoside) 및 상기 폐암에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0077] 또한, 상기 건강기능식품 역시, 시스플라틴(cisplatin)과 병용 처리할 수 있는데, 이 경우, 폐암 예방, 치료 또는 개선에 상승 효과를 기대할 수 있다.
- [0078] 상기 병용 처리시, 상기 프루고사이드(Frugoside) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 상기 시스플라틴(cisplatin)의 농도비는 1:5 내지 1:100일 수 있고, 1:30 내지 1:100인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

- [0080] 본 발명에 따른 폐암 예방 또는 개선용 건강기능식품에 있어서, 상기 프루고사이드(Frugoside)를 건강기능식품의 첨가물로 사용하는 경우 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 예방, 건강 또는 치료 등의 각 사용 목적에 따라 적절하게 결정할 수 있다.
- [0081] 건강기능식품의 제형은 산제, 과립제, 환, 정제, 캡슐제의 형태뿐만 아니라 일반 식품 또는 음료의 형태 어느 것이나 가능하다.
- [0082] 상기 식품의 종류에는 특별히 제한은 없고, 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함할 수 있다.
- [0083] 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 상기 프루고사이드(Frugoside)는 원료 100 중량부에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가할 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 또한 본 발명은 천연물을 이용하는 점에서 안전성 면에서 문제가 없으므로 상기 범위 이상의 양으로도 사용할 수 있다.
- [0084] 본 발명에 따른 건강기능식품 중 음료는 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스화 같은 디사카라이드 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명에 따른 음료 100 mL당 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g일 수 있다.
- [0085] 상기 외에 본 발명에 따른 폐암 예방 또는 개선용 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제를 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 폐암 예방 또는 개선용 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 제한되지 않으나 본 발명의 건강기능식품 100 중량부 대비 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0087] 따라서, 본 발명은 프루고사이드(Frugoside) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐암, 특히, NRF2가 과발현되는 폐암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 프루고사이드(Frugoside)는 NRF2 활성화 억제제를 통해 항산화 단백질의 발현을 감소시킴으로써, 폐암 세포 내 활성 산소를 증가시키는데, 폐암 세포 사멸 효과를 보인다.
- [0088] 뿐만 아니라, 상기 프루고사이드(Frugoside)는 항암제(특히, 시스플라틴(cisplatin))에 의한 내성을 가진 폐암에 대해서도 세포 사멸 효과를 보이는데, 항암제에 의한 내성을 극복할 수 있는 이점을 가진다. 뿐만 아니라, 시스플라틴(cisplatin)과 병용 처리시, 폐암 세포 사멸에 상승 효과를 보인다.
- [0090] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0092] **[실시예]**
- [0093] **프루고사이드의 분리**
- [0094] 풍선초(*Cardiospermum halicacadam*)를 경동 전통 한방 시장에서 구입하였다. *C. halicacadam*(5 kg)의 건조된 전체 식물을 실온에서 3 시간 동안 80 % MeOH(25 L)로 추출하였다. 추출물을 여과하고 회전식 진공 건조기를 사용하여 농축시켜 MeOH 추출물을 수득 하였다. MeOH 추출물(1.0 kg)을 2,500 ml의 H₂O 및 동일한 부피의 에틸 아세테이트(EA)로 현탁시켰다. CHCl₃ 및 MeOH(10:1 내지 2:1)의 구배로 용리된 실리카겔 칼럼 크로마토그래피에

의해 EA 가용성 분획(110g)을 21 분획(CHM1-21)으로 분리하였다. CHM6(1.2g)을 옥타데실실리카 컬럼(MeOH:H₂O = 10:1)으로 분리하여 9 개의 분획물(CHM 6-1 ~ CHM 6-9)을 수득하였다. CHM 6-3의 하위 분획물을 CHCl₃ 및 MeOH (5:1)의 등용매 조건으로 용리된 실리카 겔 컬럼에 의해 정제하여 프루고사이드(Frugoside)(87mg)를 수득하였다. 프루고사이드(Frugoside)의 구조는 분광학 데이터와 문헌[Elgamal et al., 1999]에서 보고된 데이터의 비교를 결정하였다.

실시예 1: 프루고사이드 처리에 의한 NRF2 단백질 발현 감소 확인 및 이에 의한 활성 산소양 증가 확인

(1) ARE-루시페라아제(luciferase) 리포터 분석

NRF2 전사인자와 결합하는 ARE(antioxidant responsive element) 부분을 포함하는 루시페라아제 리포터를 이용하여 프루고사이드에 의한 NRF2의 감소 효과를 확인하기 위하여, 폐암(A549) 세포주에 pGL4.14-ARE-luc 프라스미드를 도입한 후 히그로마이신(hygromycin) 150ug/ml를 첨가하였다. 이를 통해 ARE-루시페라아제가 염색체에 삽입된 A549-ARE-Luc 세포주를 확립하였다. A549-ARE-Luc 세포주에 프루고사이드를 도 1(A)와 같이 농도별로 15 시간 동안 처리한 후, Promega사의 루시페라아제 어레이 시스템을 사용하여 루시페라아제 어레이를 실시하였다.

(2) 활성 산소양 측정을 위한 FACS분석

폐암(A549) 세포주에서 프루고사이드 처리에 의한 NRF2저해 효과를 확인하기 위하여, 활성 산소양을 측정하였고, 항산화 화합물인 N-아세틸 시스테인(Nac) 처리에 의한 프루고사이드 효과 감소를 측정하였다. 활성 산소양은 도 1(B)와 같이 농도별로 6시간 처리한 후, 과산화수소에 반응하는 CM-DCF-DA(10 μM) 시약을 세포에 30분 처리한 다음, FACS분석법을 이용하여 측정하였다. Nac(30mM)은 프루고사이드 처리 1시간 전에 전처리하였다.

(3) 웨스턴블랏 분석

프루고사이드 처리에 의한 NRF2 단백질 감소를 확인하기 위하여, 웨스턴블랏을 실시하였다. 시료를 모아 완충용액 A(lysis buffer A)[HEPES(pH7.5)(20mM), NaCl(150mM), EDTA(1mM), EGTA(2mM), 1% 트립톤(Triton) X-100, 10% 글리세롤(glycerol), 프로테아제 콕테일(protease cocktail) I, II(Sigma, USA)]를 첨가한 후 4℃에서 20 분간 방치하였다. 세포 용해물(cell lysate)을 새 튜브(tube)에 옮긴 후, 4℃ 15000 rpm 10분간 원심분리하여 단백질을 얻었다. 세포 용해물을 5X 시료 완충용액(sample buffer)을 첨가하여 95℃에서 10분간 끓여 겔 적재 시료(gel loading sample)로 만들어 SDS PAGE 겔(gel)에 전기영동하였다. 전기영동으로 분자량에 따라 분리된 단백질 밴드(band)들은 니트로셀룰로오즈 막(nitrocellulose membrane)으로 transfer kit(biorad, USA)을 사용하여 이동(transfer)시킨 후, 5% 탈지유(skim milk)로 1시간 동안 블라킹(blocking)시켰다. 이후, 항체를 처리하여 각각의 단백질을 검출하였다. 프루고사이드는 도1(C)와 같이 농도별로 24시간 동안 및 시간별로 0.4 μM로 처리하였다.

(4) mRNA 발현 분석

폐암(A549) 세포주에서 프루고사이드 처리에 의한 NRF2 mRNA 수위 변화를 확인하기 위하여, 실시간 역전사 중합연쇄반응(real-time RT-PCR) 분석을 실시하였다. 도1(D)와 같이 프루고사이드를 시간별로 각각 0.4μM로 처리한 후, 세포로부터 RNA를 추출하고, cDNA를 합성하여 실시간 역전사-중합연쇄반응법을 통해 분석하였다.

그 결과, 도 1(A)는 프루고사이드(Frugoside; FS-1) 처리시, NRF2 타겟 유전자의 활성을 확인한 결과를 나타낸 것으로, 이의 결과로부터 항산화 단백질(Srx, Prxs 등)의 발현을 감소시키는 원인은 NRF2 분해인 것으로 확인된다.

도 1(B)는 프루고사이드(Frugoside; FS-1) 처리시, 활성 산소를 측정한 결과를 나타낸 것으로, 이의 결과로부터 항산화 단백질(Srx, Prxs 등)의 발현을 감소시킴을 확인할 수 있었다.

[0111] 도 1(C)는 프루고사이드(Frugoside; FS-1) 처리시, 농도 및 시간에 따른 NRF2 발현 여부를 확인한 결과를 나타낸 것으로, 이의 결과로부터 NRF2 발현 감소는 농도 및 시간 의존적으로 이루어짐을 확인할 수 있었다.

[0112] 도 1(D)는 프루고사이드(Frugoside) 처리시, NRF2 타겟 유전자 발현 여부를 확인한 결과를 나타낸 것으로, 이의 결과로부터 NRF2 발현 감소는 mRNA 수준이 아닌 단백질 수준에서 이루어짐을 확인할 수 있었다.

[0113] 다시 말해, 도 1(A) 내지 (D)에 따르면, 프루고사이드(Frugoside; FS-1)는 NRF2 분해를 통해 항산화 단백질(Srx, Prxs 등)의 발현을 감소시킴으로써, 폐암 세포 내 활성 산소를 증가시킴에 따라 폐암 세포 사멸에 효과적일 수 있다.

[0115] 실시예 2: 프루고사이드 처리에 의한 항산화 단백질 조절인자 NRF2 단백질량 감소 기전 규명

[0116] (1) 웨스턴 블랏 분석을 이용한 프루고사이드의 기능 확인

[0117] 단백질 신합성 저해제(cycloheximide: CHX) 및 단백질 분해 프로테아좀 (Proteasome) 저해제 (MG-132) 전처리를 통해 프루고사이드가 NRF2 단백질 분해를 촉진함을 규명하였다. CHX는 10 μ M 로 1시간 전처리하였고, MG-132 역시 10 μ M로 1시간 전처리한 후, 프루고사이드를 도 2(A) 및(B)와 같이 처리하였다. 웨스턴 블랏 분석은 실시예 1과 동일한 방법으로 수행되었다.

[0119] (2) NRF2 과발현 벡터 도입을 통한 과발현

[0120] 프루고사이드 처리에 의한 NRF2 단백질량의 감소가 전사조절 등에 의한 효과가 아닌 NRF2 단백질의 분해 촉진에 의한 감소임을 증명하기 위하여, 과발현 벡터를 제작하여 세포에 도입하여 프루고사이드 효과를 확인하였다. NRF2과발현 벡터는 pCGN-HA plasmid에 XbaI 과 KpnI 제한효소 부위를 절단하여 cDNA를 주형으로 증폭된 NRF2 유전자를 삽입하여 pCGN-HA-NRF2 벡터를 제작하였다. 또한, 제작된 플라스미드는 Thermo사의 Lipofectamine3000 reagent를 이용하였고, 세포에 트랜스펙션(transfection)하여 과발현하였다. 이후 48시간 동안 배양하였으며 도 2(C)와 같이 프루고사이드를 0.4 μ M로 시간별로 처리한 후 내인성(endogenous) 및 외인성(exogenous) 발현된 NRF2 단백질량을 웨스턴 블랏 분석을 통해 분석하였고, 그 분석은 실시예 1과 동일한 방법으로 수행되었다.

[0122] (3) 프루고사이드의 작용기전 규명을 위한 NRF2 단백질 단편 발현 벡터 제작

[0123] NRF2 발현 벡터를 주형으로 PCR법으로 증폭하여 Glutathione-s-transferase (GST) fusion 벡터(pEBG-GST)에 제한효소 BamHI과 NotI로 절단한 후 삽입하여 도 3(A)와 같이 pEBG-GST-NRF2-FL (full length), D1, D2, D3, 그리고 D4등을 제작하였다. 또한, 이를 각각 과발현한 후 프루고사이드(0.4 μ M)를 도 3(B)와 같이 시간별로 처리한 후 웨스턴 블랏 분석을 통해 발현량을 분석하였고, 그 분석은 실시예 1과 동일한 방법으로 수행되었다.

[0125] 그 결과, 도 2(A) 및 (B)는 단백질 신합성 저해제(cycloheximide) 및 단백질 분해 효소 26S 프로테아좀 저해제 (MG132)의 처리에 의해, 프루고사이드(Frugoside; FS-1) 처리시, NRF2 분해를 촉진함을 검증한 것이고, 도 2(C)는 과발현 NRF2를 통해, 프루고사이드(Frugoside; FS-1) 처리시, NRF2 분해를 검증한 것이다. 도 2(A) 내지 (C)에 따르면, 프루고사이드(Frugoside; FS-1)는 NRF2 분해를 통해 항산화 단백질(Srx, Prxs 등)의 발현을 감소시킴으로써, 폐암 세포 내 활성 산소를 증가시킴에 따라 폐암 세포 사멸에 효과적일 수 있다.

[0126] 또한, 도 3(A) 및 (B)는 NRF2 절단 모델을 이용하여, 프루고사이드(Frugoside; FS-1) 처리시, NRF2 안정성 감소 여부를 확인한 것이다. 도 3(A) 및 (B)에 나타난 바와 같이, 프루고사이드(Frugoside; FS-1) 처리에 의해 주요하게 분해되는 NRF2는 β -TRCP 결합 도메인에 해당하는 Neh 도메인인 것으로 확인되는데, 프루고사이드(Frugoside)가 NRF2 활성화 억제에 관여하는 구체적인 메커니즘을 규명하였다.

[0128] 실시예 3: 항암제 내성 폐암에서 항산화 단백질 조절인자 NRF2 단백질량 확인 및 프루고사이드 병용 처리에 의한 항암제 내성 폐암의 세포사멸 유도 확인

[0129] (1) 웨스턴 블랏 분석

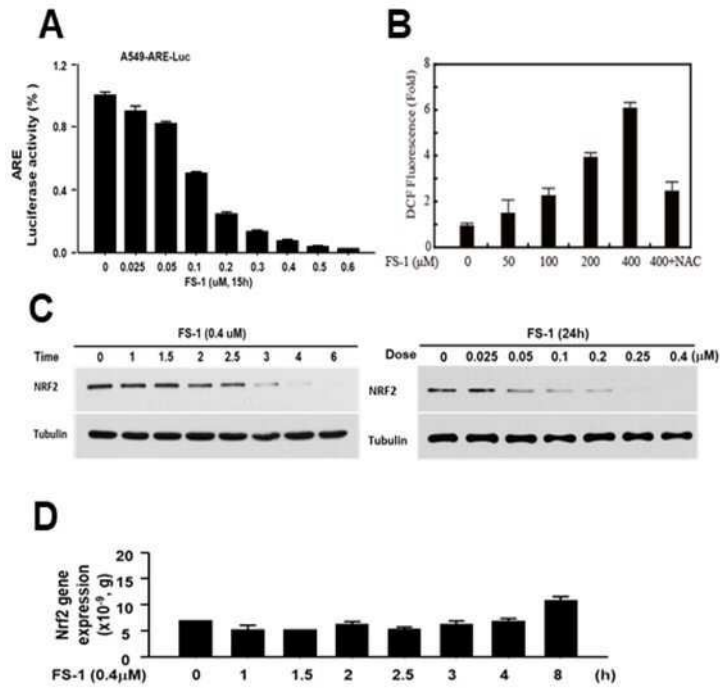
- [0130] 도 4(A)와 같이, 시스플라틴(Cisplatin) 감수성 폐암(A549 및 H460) 세포주와 이들 세포주로부터 각기 파생된 시스플라틴(Cisplatin) 내성 폐암(A549-CR 및 H460-CR) 세포주에서 NRF2 발현을 웨스턴 블랏 분석을 통해 발현량을 분석하였고, 그 분석은 실시예 1과 동일한 방법으로 수행되었다.
- [0132] (2) Annexin V-FITC/PI 염색후 FACS분석에 의한 세포사멸 분석
- [0133] 도 4(B)와 같이, 시스플라틴(Cisplatin) 감수성 및 내성 폐암(A549 및 H460) 세포주에 프루고사이드와 시스플라틴(Cisplatin)을 병용처리하여 폐암 및 NRF2과발현 내성암에서의 프루고사이드의 세포사멸 증진 효과를 검증하였다. 각 시료는 Annexin V-FITC 와 PI(propidium iodide)를 이용하여 세포괴사(necrotic cell death)와 자가 세포사멸(apoptotic cell death)이 유도되는 세포를 염색한 후 FACScanto를 이용하여 분석하였다. 또한, 도 4(C)와 같이, NRF2발현 비의존적인 암(대장암; HT-29) 세포주에서 프루고사이드의 세포사멸 유도 효과를 확인하였다. 위와 같은 AnnexinV-FITC/PI 염색한 후 FACScanto 장비를 이용하여 세포사멸 여부를 측정하였다.
- [0135] 그 결과, 도 4(A)는 폐암(A549, H460) 세포주 및 항암제 내성 폐암(A549-CR, H460-CR) 세포주에서 NRF2 발현 여부를 나타낸 것으로, 폐암 세포주 및 항암제 내성 폐암 세포주 모두에서 NRF2가 과발현되는데, 항생제 내성 폐암 세포주에서 NRF2가 과발현되는 정도가 큰 것으로 확인된다. 즉, NRF2 과발현에 따라 항생제 내성이 유발되고, 이에 따라 프루고사이드(Frugoside; FS-1)는 NRF2가 과발현되는 정도가 큰 항암제 내성 폐암에 대해서도 효과적인 세포 사멸 효과를 나타낼 수 있다.
- [0136] 도 4(B)는 프루고사이드(Frugoside) 단독 처리시, 혹은 프루고사이드(Frugoside; FS-1) 및 시스플라틴(cisplatin)의 병용 처리시, 폐암(A549) 세포주 및 항암제 내성 폐암(A549-CR) 세포주에서 폐암 세포 사멸 여부를 비교한 것으로, 프루고사이드(Frugoside; FS-1)는 시스플라틴(cisplatin)과 병용 처리시, 폐암 세포 사멸에 상승 효과를 보이는바, 항암제 보조제로서 역할을 할 수 있다.
- [0137] 도 4(C)는 프루고사이드(Frugoside; FS-1) 처리시, 대장암(HT29) 세포주에서 대장암 세포 사멸 여부를 나타낸 것으로, 프루고사이드(Frugoside; FS-1)는 NRF2가 과발현되는 정도가 적은 대장암에 대해서는 세포 사멸 효과가 미미한 것으로 확인된다.
- [0139] 하기에 본 발명의 화합물을 함유하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.
- [0141] 제제예 1: 산제의 제조
- [0142] 프루고사이드(Frugoside) 20 mg
- [0143] 유당수화물 100 mg
- [0144] 탈크 10 mg
- [0145] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.
- [0147] 제제예 2: 정제의 제조
- [0148] 프루고사이드(Frugoside) 10 mg
- [0149] 옥수수전분 100 mg
- [0150] 유당수화물 100mg
- [0151] 스테아르산마그네슘 2mg
- [0152] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

- [0154] 제제예 3: 캡셀제의 제조
- [0155] 프루고사이드(Frugoside) 10 mg
- [0156] 미결정셀룰로오스 3 mg
- [0157] 유당수화물 14.8 mg
- [0158] 스테아르산마그네슘 0.2 mg
- [0159] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡셀제의 제조방법에 따라서 젤라틴캡슐에 충전하여 캡셀제를 제조하였다.
- [0161] 제제예 4: 주사제의 제조
- [0162] 프루고사이드(Frugoside) 10 mg
- [0163] 만니톨 180mg
- [0164] 주사용 멸균 증류수 2974 mg
- [0165] 인산일수소나트륨 26 mg
- [0166] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1앰플당(2mL) 상기의 성분 함량으로 제조하였다.
- [0168] 제제예 5: 액제의 제조
- [0169] 프루고사이드(Frugoside) 10 mg
- [0170] 이성화당 10 g
- [0171] 만니톨 5 g
- [0172] 정제수 적량
- [0173] 레몬향 적량
- [0174] 상기의 성분을 통상의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 정제수를 가하여 전체 100mL로 조절한 후 멸균시켜 갈색병에 충전하여 액제를 제조한다.
- [0176] 제제예 6: 건강기능식품의 제조
- [0177] 프루고사이드(Frugoside) 10 mg
- [0178] 비타민 혼합물 적량
- [0179] 비타민 A 아세테이트 70 μ g
- [0180] 비타민 E 1.0 mg
- [0181] 비타민 B₁ 0.13 mg
- [0182] 비타민 B₂ 0.15 mg
- [0183] 비타민 B₆ 0.5 mg
- [0184] 비타민 B₁₂ 0.2 μ g
- [0185] 비타민 C 10 mg
- [0186] 비오틴 10 μ g
- [0187] 니코틴산아미드 1.7 mg

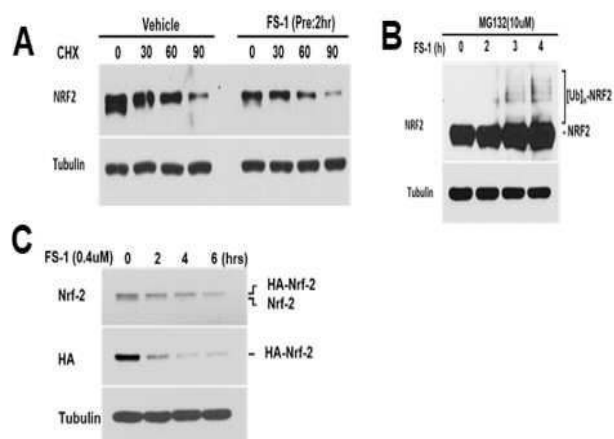
- [0188] 엽산 50 μg
- [0189] 판토텐산 칼슘 0.5 mg
- [0190] 무기질 혼합물 적량
- [0191] 황산제1철 1.75 mg
- [0192] 산화아연 0.82 mg
- [0193] 탄산마그네슘 25.3 mg
- [0194] 제1인산칼륨 15 mg
- [0195] 제2인산칼슘 55 mg
- [0196] 구연산칼륨 90 mg
- [0197] 탄산칼슘 100 mg
- [0198] 염화마그네슘 24.8 mg
- [0199] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강기능식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강기능식품 제조에 사용할 수 있다.
- [0201] 제제예 7: 건강음료의 제조
- [0202] 프루고사이드(Frugoside) 10 mg
- [0203] 비타민 C 15 g
- [0204] 비타민 E(분말) 100 g
- [0205] 젖산철 19.75 g
- [0206] 산화아연 3.5 g
- [0207] 니코틴산아미드 3.5 g
- [0208] 비타민 A 0.2 g
- [0209] 비타민 B₁ 0.25 g
- [0210] 비타민 B₂ 0.3g
- [0211] 정제수 정량
- [0212] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85 °C에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.
- [0214] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.
- [0216] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

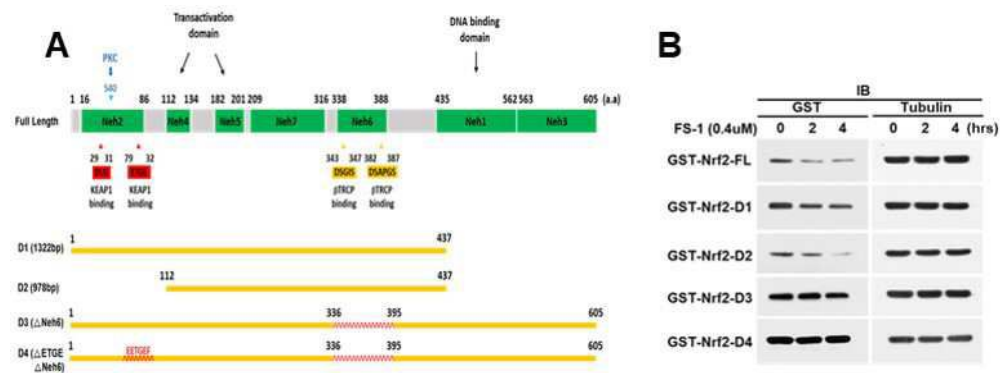
도면1



도면2



도면3



도면4

