



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년04월11일
(11) 등록번호 10-1253063
(24) 등록일자 2013년04월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/19 (2006.01) A61K 31/205 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-7022383
(22) 출원일자(국제) 2005년03월14일
심사청구일자 2010년03월11일
(85) 번역문제출일자 2006년10월26일
(65) 공개번호 10-2006-0134181
(43) 공개일자 2006년12월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/007951
(87) 국제공개번호 WO 2005/102301
국제공개일자 2005년11월03일
(30) 우선권주장
10/810,762 2004년03월26일 미국(US)

(73) 특허권자
아보트 러보러터리즈
미국 일리노이주 60064-6008 아보트 파크 아보트
파크 로드 100 디파트먼트 377 빌딩 에이피6
에이-1
(72) 발명자
백스터 제프리 에이취
미국 오하이오주 43230 가한나 캐로웨이 블러바드
711
무커지 프라딕
미국 오하이오주 43230 가한나 아카로 드라이브
1069
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 3 항

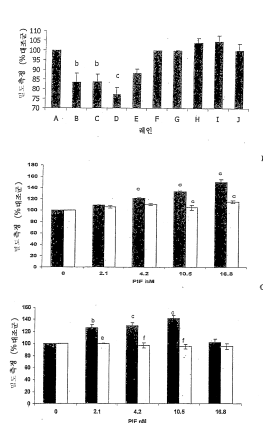
심사관 : 정세준

(54) 발명의 명칭 하이드록시메틸부티레이트 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 만성 염증성 질환, 암 및 비자발적인 체중 감소의 예방 및 치료방법에 관한 것이다. 본 발명의 실행 시 환자에게 HMB를 단독으로 또는 에이코사펜타엔산(20:5 ω-3), FOS, 카르니틴 및 이들의 혼합물과 함께 장내 투여한다. HMB는 대형 중성 아미노산(예: 로이신, 이소로이신, 발린, 티로신, 트레오닌 및 페닐알라닌)이 강화된 아미노-질소 공급원을 포함하고 유리 아미노산이 실질적으로 결핍된 식품에 부가될 수 있다.

대표도 - 도13



(72) 발명자

보스 앤 씨

미국 오하이오주 43220 콜럼버스 브릿지톤 드라이브 1526

티스데일 마이클 제이

영국 비4 7이티 버밍햄 아스톤 트라이앵글 아스톤
유니버시티

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

- a. 2 내지 10 gm/ℓ 의 칼슘 베타-하이드록시-베타메틸부티레이트;
- b. 1 gm/ℓ 이상의 ω -3 지방산;
- c. 1 내지 8 gm/ℓ 의 카르니틴;
- d. 1 내지 25 gm/ℓ 의 프럭토올리고당; 및

류신, 이소류신, 발린, 티로신, 트레오닌 및 페닐알라닌으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 대형 중성 아미노산(LNAA)이 강화된(enriched) 아미노 질소 공급원을 포함하는 조성물로서, 이때 아미노 질소 공급원은 10 내지 60 중량/중량%의 대형 중성 아미노산(LNAA)을 포함하며, 조성물이 0.4 gm 미만의 유리 아미노산을 갖는,

환자에서 악액질-관련 소모증, 암-관련 소모증, 노화-관련 소모증, 장기 입원과 관련된 소모증, HIV/AIDS-관련 소모증, 관절염-관련 소모증, 외상-관련 소모증, 간 질환-관련 소모증, 크론병-관련 소모증 또는 다른 염증성 장 질환-관련 소모증, 신부전-관련 소모증 및 만성 폐색성 폐 질환-관련 소모증을 치료하기 위한 조성물.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

- a. 2 내지 10 gm/ℓ 의 칼슘 베타-하이드록시-베타메틸부티레이트;
- b. 1 gm/ℓ 이상의 ω -3 지방산;
- c. 1 내지 8 gm/ℓ 의 카르니틴;
- d. 1 내지 25 gm/ℓ 의 프럭토올리고당; 및

류신, 이소류신, 발린, 티로신, 트레오닌 및 페닐알라닌으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 대형 중성 아미노산(LNAA)이 강화된(enriched) 아미노 질소 공급원을 포함하는 조성물로서, 이때 아미노 질소 공급원은 10 내지 60 중량/중량%의 대형 중성 아미노산(LNAA)을 포함하며, 조성물이 0.4 gm 미만의 유리 아미노산을 갖는, 영양 조성물.

청구항 24

삭제

청구항 25

제23항에 있어서, 악액질-관련 소모증, 암-관련 소모증, 노화-관련 소모증, 장기 입원과 관련된 소모증, HIV/AIDS-관련 소모증, 관절염-관련 소모증, 외상-관련 소모증, 간 질환-관련 소모증, 크론병-관련 소모증 또는 다른 염증성 장 질환-관련 소모증, 신부전-관련 소모증 및 만성 폐색성 폐 질환-관련 소모증을 치료하기 위한

영양 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 만성 염증성 질환, 암 및 비자발적인 체중 감소의 예방 및 치료방법에 관한 것이다. 본 발명의 실행 시 환자에게 HMB를 단독으로 또는 에이코사펜타엔산(20:5 ω-3), FOS, 카르니틴 및 이들의 혼합물과 함께 장내 투여한다. HMB는 대형 중성 아미노산(예: 로이신, 이소로이신, 발린, 티로신, 트레오닌 및 페닐알라닌)이 강화된(enriched) 아미노-질소 공급원을 포함하고 유리 아미노산이 실질적으로 결핍된 식품에 부가될 수 있다.

배경기술

[0002] 원치않는 체중 감소, 특히 제지방 질량 감소는 심각한 병에서 비교적 통상적으로 발생하며, 이환률 및 사망률에 상당한 영향을 준다. 이는 특히 암 환자에서 사실이며, 이때 이러한 질량 감소는 치료를 제한함에 따라, 전반적인 징후에 영향을 줄 수 있다.

[0003] 악액질은 식욕부진, 체중 감소, 조기 포만, 무력증, 제지방 질량 감소 및 다발성 기관 기능부전을 특징으로 하는 증후군이다. 이는 만성 질환(악성 및 비악성 모두)의 통상적 결과이며, 만성 폐색성 폐 질환(COPD), 만성 심부전(CHF), 신부전, AIDS, 치매, 만성 간 질환 및 암에서의 보다 나쁜 징후와 관련이 있다. 이는 종종 질환의 중증도의 다른 징후와는 무관하다(참조: Witte, K. K. A. 및 Clark, A. L.: Nutritional abnormalities contributing to cachexia in chronic illness., International Journal of Cardiology 85:23-31, 2002).

[0004] 폐 질환은 종종 악액질과 관련이 있고, COPD, 특히 기증으로 고생하는 상당한 수의 환자는 질환의 진행 중 수척해진다. 체중 감소는 징후에 대해 독립적인 위험 요소이며, 종종 증가된 산소 소비와 관련이 있다. 이는 비효율적인 근에너지 대사의 전개와 연관된다(참조: Kutsuzawa, T. et al.; Muscle energy metabolism and nutritional status in patients with chronic obstructive pulmonary disease, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 152(2):647-652, 1995). COPD는 또한 일반적인 증가되는 전신 염증성 반응과 관련이 있으며, 말초 혈액중 염증촉진성 사이토킨 및 급성 단계 단백질의 농도가 증가되는 것으로 나타난다(참조: Schois, A. M., et al.: Evidence for a relation between metabolic derangements and increased level of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Thorax 51:819-824, 1996; Takabatake, N., et al.; Circulating leptin in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Med 159:1215-1219, 1999; Dentener, M.A., et al.; Systemic anti-inflammatory mediators in COPD; increase in soluble interleukin I receptor II during treatment of exacerbations. Thorax 56:721-726, 2001). 이러한 변화는 종종 근 소모 증후군과 연관이 된다.

[0005] 배양된 근육 및 근추출물에 의한 연구는 ATP-의존성 유비퀴틴-프로테오솜 경로로 인하여 대부분의 증가된 단백질 가수분해가 일어나고, 이는 궁극적으로 근소모로 귀착됨을 제시한다. 특히, 유비퀴틴-접합된 단백질의 증가된 수준 및 폴리유비퀴틴에 대한 mRNA 수준, 특정 프로테오솜 서브유닛 및 유비퀴틴-접합 효소 E2_{14K}의 증가는 대부분의 근 위축에서 발견되는 특징이다(참조: Schois, A. M. W. J.: Pulmonary cachexia Intl. J Cardiology 85:101-110, 2002; Jagoe, R. T. and Goldberg, A. L.: What do we really know about the ubiquitin-proteosome pathway in muscle atrophy? Curr Opin Clin Nutr Metab Care 4:183-190, 2001).

[0006] 이의 질환이 전이성 질환으로 진행되는 암 환자의 대부분은 이들의 치료 프로그램 도중 악액질이 발병하며, 악액질은 이들의 사망에 기여한다. 암 환자에서 체중 감소의 빈도는 유방암, 급성 골수성 백혈병 및 육종 환자의 경우 40%로부터, 췌장 및 위암 환자의 경우 80%까지의 범위이다. 폐, 결장 또는 전립선암인 환자의 약 60%는 화학요법 개시 전에 체중 감소를 경험한다. 치료전 영양실조(체중 감소)와 역 결과 사이에 관계가 성립됨에도 불구하고, 악액질의 발병과, 종양 크기, 질환 단계 및 악성의 형태나 지속기간 사이에 일관된 관계가 설명되고 있지 않다.

[0007] 암 악액질은 종양의 단순한 국부 효과가 아니다. 단백질, 지방 및 탄수화물 대사에서의 변화가 통상 일어난다. 예를 들면, 탄수화물 대사이상은 증가된 전체 글루코즈 전환률, 증가된 간의 당신생, 글루코즈 불내성 및 증가

된 글루코즈 수준을 포함한다. 증가된 지방분해, 증가된 유리 지방산 및 글리세롤 전환, 고지혈증 및 감소된 지단백질 리파제 활성이 종종 주목된다. 암 악액질과 관련된 체중 감소는 체지방 저장의 감소에 의한 것 뿐만 아니라, 전체 체단백질 양의 감소에 의해 유발되며, 상당한 골격근이 소모된다. 증가된 단백질 전환 및 불량하게 조절되는 아미노산 산화가 또한 중요할 수 있다. 암에 대한 반응으로 생성되는 숙주-유도된 인자의 존재는 악액질의 원인 제제[예: 종양 괴사 인자- α (TNF) 또는 카케틴, 인터류킨-1(IL-1), IL-6, 감마-인터페론(IFN) 및 프로스타글란딘(PGs)(예: PGE₂)]로서 관련이 된다.

[0008] 체중 감소는 폐 및 위장관의 암을 앓는 환자에게 통상적이며, 비근육 단백질은 영향없이 잔류하는 반면에, 체지방 및 근육 단백질 모두의 대량 손실을 야기한다. 체지방의 손실이 에너지 보존면에서 중요하지만, 운동능력 상실을 야기하고, 마침내는 호흡기 근기능이 손상되어, 침강성 폐렴으로 인한 사망을 유도하는 것은 골격근 단백질의 손실이다. 악액질이 식욕부진을 빈번히 수반하지만, 영양 보충만으로 안정한 체중을 유지할 수 없고, 어떠한 체중 증가도 체지방 질량보다는 오히려 지방 조직 및 물의 증가에 기인한다. 식욕 촉진제(예: 메게스트롤 아세테이트 및 메드록시프로게스테론 아세테이트)의 경우도 상기와 동일하며, 이는 체지방 질량의 감소가 에너지 불충분과는 다른 요인에 기인함을 제시한다.

[0009] 골격근 질량은 단백질 합성을 및 분해율 간의 균형이다. 암 악액질을 앓는 환자는 골격근에서 단백질 합성의 감소 및 단백질 분해의 증가를 나타내며, 이는 단백질 분해의 주요 척도인, 유비퀴틴-프로테아좀 단백질 가수분해 경로의 발현이 증가되어 나타난다. 따라서, 악액질성 암 환자로부터의 골격근은 유비퀴틴 및 프로테아좀 서브유닛 모두에 대한 mRNA의 발현이 증가됨을 나타내는 반면에, 프로테아좀 단백질가수분해 활성은 유비퀴틴 발현과 병행하여 증가된다. 동화성 자극으로 악액질 환자의 체지방 질량을 증가시킬 수 없다는 것은 근 질량이 증가할 수 있기 전에, 단백질 분해가 감소되어야 한다는 것을 제시한다. 에이코사펜타엔산(EPA)은 악액질 마우스의 골격근에서 유비퀴틴-프로테아좀 단백질 가수분해 경로의 발현 증가를 하향조절하고, 체중을 앓는 악액질 환자에서 체중을 안정화시키는 것으로 나타났다. 환자가 단백질 32 g 및 EPA 2 g을 함유하는 에너지 농축 보충제를 소비한 경우에, 체중이 증가되고, 이는 오로지 체지방 질량의 증가에 기인한다(참조: Barber, M.D., Ross, J.A., Voss, A.C., Tisdale, M.J., Fearon, K.C.H. The effect of an oral nutritional supplement enriched with fish oil on weight-loss in patients with pancreatic cancer. Br. J. Cancer, 81:80-86, 1999).

[0010] 메이(May) 등에 의한 최근의 연구(참조: May, P.E., Barber, A., D'Olimpio, J.T., Hourihane, A. and Abumrad, N.N. Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of β -hydroxy- β -methylbutyrate, arginine and glutamine. Am.J.Surg., 183: 471-479, 2002)은 HMB, 아르기닌 및 글루타민의 혼합물이 진행된(단계 IV) 암을 앓는 체중 감소된 환자에서 체중을 증가시키는데 효과적인 것으로 밝히고 있다. 더욱이, 당해 체중 증가는 EPA에 의해 관찰된 바와 같이, 지방이 아닌 질량의 증가에 기인한다.

[0011] 다중 불포화 지방산 에이코사펜타엔산의 사용은 체액에서 지방분해제의 지방분해 활성 및 효소 구아니디노-벤조아타제의 활성 억제에 의한 악액질의 치료를 위하여 제안되고 있다(참조: Tisdale, M.J., and Beck, A., 1995년 10월 10일자로 허여된 미국 특허 제5,457,130호 및 Tisdale, et al., Cancer Research 50: 5022-5026(August 1990)). 그러나, 티스데일에 의해 교시된 생성물은 고체 용량 형태로, 하루에 12 내지 16알의 캡슐을 이미 병든 환자가 삼켜야 한다. 이 방법은 삼키는 어려움, 트립 및 나쁜 냄새를 포함한, 심각한 단점을 갖는다.

[0012] HMB는 다양한 적용내에서 유용한 것으로 밝혀졌다. 특히, 미국 특허 제6,031,000호(Nissen 등)는 약 0.5 내지 약 30 g의 HMB(이때 약 0.5 내지 약 30 g은 HMB의 칼슘염의 중량을 기준으로 한다), 약 0.5 내지 약 50 g의 유리 L-아르기닌 및 약 0.5 내지 약 50 g의 유리 L-글루타민을 포함하는 조성물을 기술하고 있다. 이 특허는 또한 동물의 질환-관련 소모증의 치료방법, 동물의 트리글리세라이드의 혈청 수준을 감소시키는 방법, 동물의 혈청 바이러스 부하를 감소시키는 방법 및 내장 영역 및 피하 영역을 갖는 동물에서 지방을 재분배하는 방법을 제공한다. 모든 방법은 HMB 및 하나 이상의 유리 아미노산을 포함하는 조성물을 동물에 투여하는 단계를 포함한다.

[0013] 미국 특허 제5,348,979호(Nissen 등)는 HMB를 사람 대상에서의 질소 축적에 사용하는 것을 기술하고 있다. 투여되는 HMB의 양은 뇨 질소의 감소로 측정되는 바와 같이 단백질을 보존하는데 효과적이다. 본 방법은 질환 상태로 인하여 음의 질소 균형을 갖는 환자 및, 또한 단백질 손실을 겪는 보통의 고령자에 사용될 수 있다. HMB는 경구 또는 정맥내 주입에 의해 투여할 수 있다. HMB의 유효량은 24시간 마다 체중 kg당, 이의 칼슘염을 기준으로 하여 HMB 0.01 내지 0.20 gm의 범위내이다.

[0014] 미국 특허 제5,028,440호(Nissen)는 체지방 조직 발달을 증가시키기 위한 육류 생성 가축을 사육하는 방법을

기술하고 있다. HMB 또는 이의 식용 염이 제지방 조직 중량의 실질적인 증가를 수득하기 위한 양으로 충분한 시간 동안 동물에 투여된다. 당해 방법은 소 및 새끼 양을 포함한, 반추 동물에 사용하기에 특히 적합한데, 이는 HMB가 현저히 반추위 파괴되지 않기 때문이다. 본 방법은 또한 닭 및 칠면조를 포함한, 다른 가축에 실시할 수 있다. HMB는 0.5 내지 100 mg의 범위내에서 공급된다.

[0015] 미국 특허 제4,992,470호(Nissen)는 알파-케토이소카프로에이트(KIC)보다 포유동물의 T-림프구의 면역 기능을 활성화시키는데 현저히 보다 효과적인 HMB의 사용을 기술하고 있다. T-림프구의 활성화를 위해, HMB 또는 이의 식용 수용성 염은 HMB가 포유동물의 혈액에 도입되는 경로에 의해 동물에 투여된다. 당해 투여되는 양은 이들의 T 림프구의 발달생의 효과적인 향상을 위해 충분하다. 본 방법은 특히, 소, 양 및 돼지를 포함한, 가축에 사용하기에 적합하다. HMB는 또한 면역 시스템 자극제로서 사람에게 사용할 수 있다. HMB(Ca-HMB 기준)는 24시간 당, 사람 대상 당, 500 내지 2,500 mg의 양으로 경구 또는 비경구 투여된다.

[0016] 독일 특허 제DE 29707308호(Kunz)는 웨이트 트레이닝하는 인구중 근육 생성을 촉진하기 위하여 HMB와 함께 측쇄형의 아미노산의 사용을 기술하고 있다. 쿤츠(Kunz)는 매일 200 gm의 단백질 소비를 하면서, 하루에 섭취되는 3 gm의 보충제는 영양 단백질의 가치를 향상시키고, 단백질 효율을 상당히 증가시키는 것으로 교시하고 있다. 쿤츠는 또한 보다 나은 효과는 HMB를 완전(순수)한 단백질 보다는 단백질 가수분해물 및/또는 유리 아미노산 혼합물과 배합하는 경우에 성취할 수 있다고 교시하고 있다.

[0017] 미국 특허 제5,976,50호(Engel 등)는 치료학적 양의 키토산, 카바 및, 콜린/이누시탈, 크롬 피콜리네이트, HMB, 카르니틴 및 피루베이트를 포함할 수 있는 지방 연소 영양학 제제를 함유하는 당기반 제과의 혼합물로 형성되는 체중 감소에 대한식이 식품 보충제를 기술하고 있다. 키토산 및 카바와 혼합된 뉴트리슈티칼(neutriceutical) 성분은 신체가 소비하는 어떠한 지방이든 연소시키는, 즉 섭취되고 키토산에 끌리지 않는 어떠한 지방도 보다 양호하게 대사하는 기능을 한다.

[0018] 체중 증가 인구에 대해 고안되어 시판중인 HMB를 함유하는 제품에는 Lean DynamX(제조원: EAS Inc., 미국 콜로라도주 골든 소재)가 포함된다. Lean DynamX는 강한 자극제의 사용없이 지방 감소를 지지하는 성분들의 혼합물을 제공한다. 성분들은 HMB, 크롬 피콜리네이트, 접합 리놀레산, 마테차 잎과 줄기 및 카르니틴 타르트레이트를 포함한다. 분말 조성물은 물과 혼합하며, 하루에 2 내지 3회 섭취하고, 이중 1회는 활동하기 30분 전에 섭취한다.

[0019] 부가의 시판중인 제품에는 Mega HMB Fuel^R(제조원: Twinlab Corporation, 미국 뉴욕주 하우포지 소재)가 포함된다. Mega HMB Fuel^R는 하나의 캡슐에 HMB 750 mg을 함유한다. 권장 하루 용량은 격렬한 저항 운동(resistance exercise)에 이어서 일어날 수 있는 근육 세포에 대한 손상을 지탱하기 위한 4개의 캡슐이다.

[0020] 미국 특허 제5,444,054호(Garleb 등) 및 관련 미국 특허 제5,780,451호가 또한 관심이 있다. 이들 문헌은 케양성 대장염의 치료시 유용한 조성물 및 방법을 기술하고 있다. 이러한 조성물은 높은 생물학적 값(col.21)의 그대로의 단백질 또는 가수분해된 단백질일 수 있는 단백질 공급원; 비소화성 올리고당(예: 프락토올리고당) 및 비교적 높은 ω -3 대 ω -6 지방산 비에 기여하는, 비교적 다량의 에이코사펜타엔산을 함유하는 지질 혼합물을 포함한다.

[0021] 장쇄 지방산 생체-경로 및 생리학적 작용이 본 명세서에 참조로 인용된, 미국 특허 제5,223,285호(DeMichele 등)에서 논의되고 있다.

[0022] 악액질의 예방 및/또는 치료는 욕구불만의 문제점을 남긴다. 동물 및 사람 연구는 모두 영양적 지지가 암을 가진 수용자에서 제지방 질량의 공급시 상당히 비효과적인 것으로 제시한다. 세포독성 항신생물제 치료방법에 대한 부가물로서의 전체 비경구 영양(TPN: total parenteral nutrition) 지지의 유용성을 탐색하는 랜덤화된 시도는 치료 결과에 있어서 거의 개선을 나타내지 않는다(참조예: Brehnan, M.F., and Burt, M.E., 1981, Cancer Treatment Reports 65 (Suppl. 5):67-68). 이는 TPN이 동물에서 종양 성장을 촉진할 수 있다는 확실한 입증에 따라, 암 치료시 TPN의 통상적인 사용이 옳지 않음을 제시하고 있다(참조: Kisner, D.L., 1981, Cancer Treatment Reports 65 (Suppl. 5): 1-2).

[0023] 발명의 요약

[0024] 본 발명은 만성 염증성 질환, 암 및 비자발적인 체중 감소의 예방 및 치료방법에 관한 것이다. 본 발명의 실행

시, 환자에게 HMB를 단독으로 또는 에이코사펜타엔산(20:5 ω -3), FOS, 카르니틴 및 이들의 혼합물과 함께 장내 투여한다.

- [0025] 다른 양태에 있어서, 본 발명은 환자의 질환-관련 소모증의 치료방법을 제공한다. 본 방법은 질환-관련 소모증을 치료하기에 충분한 양으로 HMB를 포함하는 상기 조성물을 환자에 투여하는 단계를 포함하며, 이때 환자에 조성물의 투여시, 질환-관련 소모증이 치료된다.
- [0026] 다른 양태에 있어서, 본 발명은 환자에서 종양 성장 속도를 감소시키는 방법을 제공한다. 본 방법은 종양 성장 속도를 감소시키기에 충분한 양으로 HMB를 포함하는 상기 조성물을 환자에 투여하는 단계를 포함하며, 이때 환자에 조성물의 투여시, 종양 성장 속도가 감소된다.
- [0027] 다른 양태에 있어서, 본 발명은 단백질 키나제 C, 핵 인자 카파-B, 유비퀴틴-접합 효소 및 26S 프로테아좀의 성분의 발현 및/또는 활성의 하향 조절에 의한 환자의 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다. 이들 방법은 HMB, 이의 염, 이의 대사물질 또는 유도체를 환자에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0028] 또 다른 양태에 있어서, HMB는 대형 중성 아미노산(예: 로이신, 이소로이신, 발린, 티로신, 트레오닌 및 페닐알라닌)이 강화된 아미노-질소의 공급원을 포함하고 실질적으로 유리 아미노산이 결핍된 식품에 추가될 수 있다.

발명의 상세한 설명

- [0042] 베타-하이드록시-베타-메틸부티르산 또는 베타-하이드록시-이소발레르산으로도 언급되는 용어 HMB는 이의 유리 산 형태인 $(\text{CH}_3)_2(\text{OH})\text{CCH}_2\text{COOH}$ 로서 나타낼 수 있다. HMB는 근육에서 알파-케토이소카프로에이트로의 아미노기 전달 반응에 이어서, HMB를 제공하기 위하여 간의 사이토졸중에 KIC를 산화시킴으로써 형성되는 로이신의 대사 물질이다.
- [0043] 용어 "대형 중성 아미노산"은 로이신, 이소로이신, 발린, 티로신, 트레오닌 및 페닐알라닌을 의미한다. 아미노산은 단백질의 구성 블록이다. 이들은 화합물의 말단에서 동일한 탄소에 결합되는 카복시 그룹(COOH) 및 아미노 그룹(NH_2)의 존재를 특징으로 한다.
- [0044] 용어 "실질적으로 유리 아미노산이 결핍됨"은 조성물의 1일 용량중 전체 유리 아미노산 함량이 0.4 gm 미만인 조성물을 의미한다. 예를 들면, 생성물을 하루에 1캔의 속도로 공급하도록 고안하는 경우에, 생성물 1캔은 총 0.4 gm 미만의 유리 아미노산을 함유한다. 본 아미노산은 하나 이상의 하기의 화합물로 이루어지는 천연으로 존재하는 L-이성체이다: L-알라닌, L-아르기닌, L-아스파라긴, L-아스파르트산, L-시스테인(또는 L-시스틴), L-글루탐산, L-글루타민, 글리신, L-히스티딘, L-이소로이신, L-로이신, L-리신, L-메티오닌, L-페닐알라닌, L-프롤린, L-세린, L-트레오닌, L-트립토판, L-티로신 및 L-발린이나, 이들의 식품 또는 약제학적으로 허용되는 염, 에스테르, 염 또는 유도체(예: 메틸 또는 에틸 에스테르).
- [0045] 용어 "악액질"은 일반적인 나쁜 건강 및 영양실조 상태를 의미한다. 이는 종종 악성 암과 관련이 있거나, 이에 의해 유도되고, 식욕 감소, 체중, 특히 체지방 질량의 감소 및 근소모를 특징으로 한다.
- [0046] 용어 "지방산"은 일반적으로 탄소수가 약 12 내지 24인 탄화수소 쇄를 갖는 카복실산의 그룹을 의미한다. 탄화수소 쇄의 하나 이상의 지점에서 불포화(이중 결합을 가짐)되는 경우에, 이러한 지방산은 제1 이중 결합의 위치에 의해 나타낸다. ω -3 지방산은 쇄의 메틸 말단으로부터 세 번째 탄소에 제1 이중 결합을 가지며, 이로써 제한되는 것은 아니지만, α -리놀레산, 스테아리돈산, 에이코사펜타엔산("EPA"), 도코사펜타엔산 및 도코사헥사엔산("DHA") 등을 포함한다. ω -6 지방산은 쇄의 메틸 말단으로부터 여섯 번째 탄소에 제1 이중 결합을 가지며, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 리놀레산, γ -리놀렌산 및 아라키돈산("AA") 등을 포함한다.
- [0047] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "식품"은 하나 이상의 지방, 아미노 질소 및 탄수화물을 함유하고, 권장된 1일 용량으로 환자를 위해 영양적 지지의 일부 또는 모두를 제공하는 전달 비히클을 의미한다. 빈번히, 식품은 비타민, 무기질, 미량의 무기질 등을 함유하여 식사 대용물, 의약품 음식, 보충제에 대해 균형있는 영양을 제공한다. 식품은 음료, 분말, 바아, 쥬스, 탄산 음료, 병에 든 물과 같이 통상의 형태로 존재할 수 있다.
- [0048] 용어 "기준 하루 섭취량 또는 RDI(Reference Daily Intake)"는 필수 비타민 및 무기질에 대해 권장된 식이 허용치를 기준으로 하는 일련의 식이 기준을 의미한다. 권장된 식이 허용치는 더 내셔널 아카데미 오브 사이언스(the National Academy of Sciences)에서 수립한 일련의 예상 영양소 허용치이고, 이는 주기적으로 업데이트하

여 최근의 과학적 지식을 반영하고 있다.

[0049] 용어 "환자"는 사람, 개, 고양이 및 기타 비-반추 동물을 의미한다.

[0050] 본 출원에서 숫자 범위에 대한 기준은 형용사 "약"에 의해 변화되는 것으로서 고려되어야 한다. 또한, 숫자 범위는 그 범위의 서브셋에 관한 청구의 범위를 위한 지지를 제공하도록 고려되어야 한다. 예를 들면, 1 내지 10의 범위의 기술은 그 범위의 서브셋에 대해 명세서 및 청구의 범위에서 지지를 제공하도록 고려되어야 한다(즉, 2-9, 3-6, 4-5, 2.2-3.6, 2.1-9.9 등).

[0051] 본 발명을 특별한 조작 이론으로 제한하고자 하지 않지만, 출원인은 가능한 메카니즘을 아래에 기술한다.

[0052] 극단적으로 요구시(예: 기아 등), 골격근은 종종 아미노산 및 에너지의 저장소로서 몸에 의해 사용된다. 이는 근육에서 단백질 가수분해의 상향 조절 및 단백질 합성의 하향 조절에 의해 매개된다. 이의 순결과는, 근육으로부터 중요한 시스템의 유지에 사용하기 위한 전신 순환에 아미노산을 방출하는 것이다. 양호한 건강 및 적절한 영양소 접근성이 회복되는 경우에, 근육이 재생성된다. 약액질의 경우에, 이 시스템은 적절치 못하게 활성화되며, 심지어 영양상 적절한 경우에조차도, 근육 조직 단백질이 계속해서 분해된다.

[0053] 적절치 못하게 활성화되는 주요한 단백질 가수분해 시스템중 하나는 유비퀴틴 프로테오솜 시스템이다. 통상 기능하는 경우에, 이 시스템은 노화되거나, 다른 방식으로 손상되거나 더 이상 필요없는 단백질을 인지하고, 이들을 유비퀴틴과의 접합을 통해 제거하기 위해 표적으로 한다. 이러한 유비퀴틴화 단백질은 프로테오솜에 의해 인지되고, 분해되며, 에너지 소비 과정에서 유리 유비퀴틴과 펩티드 및 유리 아미노산을 방출한다. 종양을 유도하는 - 특정 약액질에 의해 생성되는 단백질 인자인 단백질 가수분해 유도 인자(PIF)를 포함한, 이 시스템을 활성화시키거나 상향 조절하는 많은 신호화 분자가 존재한다. PIF를 근세포에 결합함으로써 포스포리파아제 A(PLA)를 상향조절시킨다. 이는 또한 궁극적으로 단백질 키나제 C를 활성화시키는 신호화 인자를 생성하여, 유비퀴틴 접합 및 특정한 프로테오솜의 서브유닛에 대한 유전자의 활성화(핵 인자 카파 B, NF κ B)를 일으킨다. 이러한 모든 신호화의 순 결과는 유비퀴틴 프로테오솜 시스템 및, 근육 내의 부적절하게 지속되는 단백질 분해의 상향 조절이다. 도 1은 이러한 활성화 순서의 상세한 경로를 나타낸 것이다.

[0054] 단백질 키나제 C

[0055] 단백질 키나제 C는 수많은 세포내 신호화 캐스케이드에서 중요한 역할을 하는 칼슘- 및 지질-활성화되는 세린-트레오닌 키나제의 그룹이다. 12개 이상의 상이한 PKC 이소 타입이 있으며, 이는 이들의 주요 구조 및 생화학적 특성을 근거로 하여 세 그룹으로 나뉜다(참조: CA Carter, "Protein kinase C as a drug target; Implications for drug of diet prevention and treatment of cancer." Current Drug Targets 1:163-183(2000)). 이들은 통상적인 - 활성화를 위해 디아실글리세롤, 포스파티딜세린 및 칼슘을 필요로 하는 (cPKC α , β I, β II 및 γ), 디아실글리세롤 및 포스파티딜세린을 필요로 하지만, 칼슘 독립적인 신규형(nPKC δ , ϵ , η , θ 및 μ) 및 칼슘 및 디아실글리세롤-독립적인 부정형(aPKC λ , τ 및 ξ)이다.

[0056] PKC는 막-결합 프로 효소로서 합성된다. 단백질 가수분해 절단에 의한 프로-서열의 제거 및 후속되는 포스포릴화로 막으로부터 사이토졸로 경쟁 효소를 방출한다. 일련의 특이적인 활성화제와 후속적으로 상호작용함으로써 활성 효소를 생성시킨다. 따라서, 발현의 조절, 단백질 가수분해 과정 조절, 초기 포스포릴화 과정의 조절 및 마지막으로, 전 활성화에 필요한 다양한 활성화제의 사이토솔 수준 조절을 포함한, 가능한 수개의 조절 수준이 있다.

[0057] 단백질 키나제 C는 세포의 유사분열 및 증식화, 아포토시스, 혈소판 활성화, 악틴 세포골격의 재모델링, 이온 채널 및 분비의 조절을 유도하는 신호화 경로중 일부에 관여된다. 또한, PKC가 종양-촉진 포르볼리 에스테르에 대한 주요 수용체라는 다른 관찰은 이 효소의 작용 메카니즘을 연구하기 위한 주요 시약을 제공한다. PKC는 염증, 심혈관, 말초 미세혈관, CNS, 종양학, 면역 및 감염성 질환 상태에 관련되는 경로를 조절하고, 약제 발전을 위한 심각하고 중요한 표적으로서 고려된다(참조: P.G. Goekjian and M.R. Jirousek: "Protein Kinase C in the Treatment of Disease: Signal Transduction Pathways, Inhibitors, and Agents in Development" Current Medicinal Chemistry 6(9):877-903, (1999); CA O'Brian, NE Ward, KR Gravitt and KP Gupta: "The tumor promoter receptor protein kinase C: A novel target for chemoprevention and therapy of human colon cancer." Growth Factors and Tumor Promotion: Implications for Risk Assessment, pages 117-120 © 1995, Wiley-Liss, Inc.; F Battaini: "Protein kinase C isoforms as therapeutic targets in nervous system disease states." Pharmacological Research 44(5):353-361, (2001); RN Frank: "Potential new medical

therapies for diabetic retinopathy: protein kinase C inhibitors. Am J Ophthalmol 133:693-698 (2002); M Meier and GL King. "Protein kinase C activation and its pharmacological inhibition in vascular disease." Vascular Medicine 5:173-185 (2000)).

[0058] NF κ B

[0059] 핵인자 κ B(NF κ B)는 매우 다양한 포유동물 세포에서 발견되는 전사 인자 그룹이다. 성숙한 분자는 5개 유전자 생성물(Re1A(p65), p50, Re1B, c-Re1 및 p52) 중 1 또는 2개로부터 제조되는 호모- 및 헤테로 이량체이며 - 가장 통상적인 것은 Re1A 및 p50의 이량체이다. 비활성화 조건하에, NF κ B는 억제 단백질 I κ B α 와의 결합에 의해 사이토솔에서 국부화된다. 상부 스트림 신호화는 I κ B 키나제를 포함하며, 결합된 I κ B α 의 포스포릴화는 NF κ B로부터의 이의 방출을 야기하여, 후자가 핵으로 위치전환되도록 하고, 특정 유전자 전사를 활성화한다. 포스포릴화된 I κ B α 는 유비퀴틴-프로테오솜 경로에 의해 분해된다.

[0060] NF κ B는 염증과 관련된 주요 조절 분자로서 광범위하게 인지된다. 따라서, 이는 급성 및 만성 염증성 질환에서 모두 주요한 역할을 한다(참조: AB Lentsch and PA Ward; "Activation and regulation of NF κ B during acute inflammation." Clin Chem Lab Med 37(3):205-208 (1999)). 이는 또한 암 전이와 같은 다른 질환의 특정 측면에서 역할을 한다(참조: VB Andela, AH Gordon, G Zotalis, RN Rosier, JJ Goater, GD Lewis, EM Schwarz, JE Puzas and RJ O'Keefe: "NF κ B: A pivotal ptranscription factor in prostate cancer metastasis to bone." Clinical Orthopaedics and Related Research 415S:S75-S85(2003)). 이 전사 인자는 당뇨병 증후군의 발병(참조: E. Ho and TM Bray: "Antioxidants, NF κ B activation and diabetogenesis." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 222:205-213(1999)) 및 면역 전개와 조절(참조: J Moscat, MT Diaz-Meco and P Rennert: "NF κ B activation by protein kinase C isoforms and B-cell function." EMBO Reports 4:31-36 (2003))에 관여한다. 마지막으로, NF κ B는 아폽토시스 및 성장과 분화의 조절과 관련된다. 실제로, PIF[종양에 의해 방출되어 암-유도된 제지방 질량 감소에 관련된, 단백질 가수분해 유도 인자(Proteolysis inducing factor)]는 배아 발생의 조절자로 여겨지며, 궁극적으로 NF κ B를 통한 신호화 캐스케이드를 촉발한다(참조: F. Delfino and WH Walker. "Hormonal regulation of the NF κ B signling pathway." Molecular and Cellular Endocrinology 157:1-9 (1999); TM Watchorn, I Waddell, N Dowidar and JA Ross: "Proteolysis-inducing factor regulates hepatic gene expression via the transcription factor NF κ B and STST3." FASEB J 15:562-564 (2001)).

[0061] 또한, EPA는 PLA의 활성화, 특히 아라키돈산(AA)의 방출로부터 생성되는 신호화의 억제를 통해 약액질에 대한 이의 유용한 효과를 나타내는 것으로 잘 알려져 있다. 초기 신호화 과정을 제거함으로써 유비퀴틴-프로테오솜 경로의 후속적인 상향 조절 및 활성화를 방지한다. PLA의 활성화 또는 AA의 방출은 방지하지 않으면서, HMB는 단백질 키나제 C의 상향 조절을 방지하며, 신호화 경로에서 모든 후속되는 활성화를 방지하고, 또한 궁극적으로 유비퀴틴-프로테오솜 시스템의 활성화를 방지한다.

[0062] 오늘날, 놀랍게도 예상밖으로, 단독의 HMB가 종양 성장 속도를 감소시키고, 최적화 용량 이하 수준의 EPA와 함께 배합하여, 항약액질 효과를 개선함을 발견하였다. EPA와 HMB의 배합물은 유비퀴틴-프로테오솜 단백질 가수분해 경로의 주요 조절 성분의 증가된 발현의 하향 조절을 통해 단백질 분해를 감소시킴으로써 근육 양을 보존한다.

[0063] 용어 "HMB"는 이의 유리산 및 염 형태인 전술한 화학식의 화합물, 이의 대사물질 및 유도체를 의미한다. HMB의 적절한 형태가 본 발명에서 사용될 수 있지만, 바람직하게는 HMB는 유리산, 염, 에스테르 및 락톤으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 보다 바람직하게는 HMB는 염이다.

[0064] HMB의 약제학적으로 적합한 염이 본 발명에서 사용될 수 있지만, 바람직하게는 HMB 염은 수용성이거나, 환자의 위 또는 장에서 수용성이 된다. 보다 바람직하게는, HMB 염은 나트륨 염, 칼륨 염, 마그네슘 염, 크롬 염 및 칼슘 염으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 가장 바람직하게는, HMB 염은 칼슘 염이다. 그러나, 다른 비독성 염(예: 다른 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염)이 사용될 수 있다.

[0065] 유사하게, 약제학적으로 허용되는 에스테르가 본 발명에 사용될 수 있다. 바람직하게는, HMB 에스테르는 신속히 HMB의 유리산 형태로 전환된다. 바람직하게는, HMB 에스테르는 메틸 에스테르 또는 에틸 에스테르이다. HMB 메틸 에스테르 및 HMB 에틸 에스테르는 신속히 HMB의 유리산 형태로 전환된다.

[0066] 마찬가지로, 약제학적으로 허용되는 락톤이 본 발명에서 사용될 수 있다. 바람직하게는, HMB 락톤이 HMB의 유

리산 형태로 신속히 전환된다. 바람직하게는, HMB 락톤은 이소발라릴 락톤 또는 유사한 락톤이다. 이러한 락톤은 유리산 형태의 HMB로 신속히 전환된다.

[0067] HMB 및 이의 유도체의 제조 방법이 당해 분야에 잘 알려져 있다. 예를 들면, HMB는 디아세톤 알코올의 산화에 의해 합성할 수 있다. 한 적절한 방법이 문헌(참조: Coffman et al., J. Am. Chem. Soc. 80: 2882-2887 (1958))에 기술되어 있다. 본 상기 문헌에 기술된 바와 같이, HMB는 디아세톤 알코올의 알칼리성 하이포염소산나트륨 산화에 의해 합성된다. 생성물은 유리산 형태로 회수하고, 이는 원하는 염으로 전환시킬 수 있다. 예를 들면, 3-하이드록시-3-메틸부티르산(HMBA)은 냉 수성 하이포염소산염(표백제)을 사용하여 산화를 통해 디아세톤 알코올(4-하이드록시-4-메틸펜탄-2-온)로부터 합성할 수 있다. HCl을 사용하여 반응 혼합물을 산화시킨 후에, HMBA 생성물은 에틸 아세테이트를 사용한 추출, 및 추출 혼합물로부터 유기층의 분리와 유지에 의해 회수한다. 에틸 아세테이트는 증발에 의해 제거하고, 잔사는 에탄올에 용해시킨다. Ca(OH)_2 의 부가 및 냉각 후에, 결정성 CaHMB는 여과에 의해 회수할 수 있고, 결정은 에탄올로 세척한 다음, 건조시킨다. 또한, HMB의 칼슘 염은 TSI(Salt Lake City, Utah 소재)로부터 시판중이다.

[0068] 암 환자에서 영양 지지는 (i) 적절히 영양이 공급된 환자에서 영양 저하를 방지하거나, 한정적 치료방법 전에 고갈된 환자를 재회복시키도록 영양 지지로 구성되는 지지적인 것; (ii) 영양 지지가 치료학적 계획에서 통합적인 역할을 하는 부가적인 것 및 (iii) 공격적 영양 지지가 환자의 존재를 필요로 하는 한정적인 것으로 분류될 수 있다. 영양 지지의 제공 경로는 경구용 식이, 관급식 및 말단 또는 전체 비경구 영양을 포함한다. 본 발명의 영양 방법 및 조성물의 바람직한 양태는 경구 경로이다.

[0069] 경구 급식에 대한 대안은 비위, 비십이지장, 식도 절개술, 위루술 또는 공장루술에 의한 관급식이다.

[0070] HMB가 환자의 제지방 질량에 대해 갖는 유용한 효과는 수많은 방법으로 성취할 수 있다. 경우에 따라, HMB는 단독으로, 담체없이 투여할 수 있다. HMB는 단순히 물에 용해시켜, 환자가 소비할 수 있다. 또한, HMB는 식품에 뿌리거나, 커피 등에 용해시킬 수 있다. 환자에 대한 전체 하루 용량은 광범위하지만, 통상 환자는 2 gm/일 이상의 HMB, 또는 20 내지 40 mg/kg/일을 소비하는 것이 유용하다.

[0071] 추가의 양태에 있어서, HMB는 환제, 캡슐제, 속용해 정제, 함당정제 등에 혼입시킬 수 있다. 활성 용량은 광범위할 수 있지만, 통상 최소 2 gm/일의 목적을 성취하기 위해서는 2 내지 8회 용량/일을 소비하는 환자에 있어서 250 mg 내지 1 gm/용량의 범위이다. 이러한 투여 형태의 제조 방법이 당해 분야에 잘 알려져 있다. 독자의 관심은 이러한 투여 형태를 제조하는 방법에 대한 지침을 위한 레밍톤즈 파마슈티칼 사이언스(Remington's Pharmaceutical Sciences)의 가장 최근판에 있다.

[0072] HMB는 단일 형태로서 투여될 수 있지만, 이는 통상 식품에 혼입되어, 식사나 간식 도중 환자가 소비한다. 경우에 따라, 환자는 이들이 통상 식품에 뿌리거나, 커피 등에 용해하여 소비하는 식품의 조리법을 간단히 변형시킬 수 있다.

[0073] 추가의 양태로, HMB는 HMB의 감칠맛을 개선하고, 다른 형태의 선택을 증가시키도록 특히 고안된 음료, 바아, 쿠키 등에 혼입함으로써, 환자/소비자 허용성을 개선한다.

[0074] 통상, HMB는 식사 대용 음료(예: Ensure^R, Boost^R, Glucerna^R, Pediasure^R, Pedialyte^R 등)에 혼입한다. HMB는 또한 식사 대용 바아(예: PowerBars^R, Glucerna^R 바아, Choice DM^R 바아, Ensure^R 바아 및 Boost^R 바아 등)에 혼입할 수 있다. 또한, HMB는 주스, 탄산음료, 병에든 물 등에 혼입할 수 있다. 또한, HMB는 암, HIV/AIDS, COPD 관절염 등과 같은 특정 질환 상태에서부터 지탱하도록 고안된 의학적 영양 물질(예: ProSure^R, Promote^R, Jevity^R 및 Advera^R)에 혼입할 수 있다. 이러한 식품의 제조 방법이 당해 분야의 숙련자에게 잘 공지되어 있다. 하기의 논의는 이러한 식품 및 이들의 제조 방법을 기술하고자 하는 것이다.

[0075] 대부분의 식사 대용 제품(즉, 바아 또는 액체)은 지방, 탄수화물 또는 단백질로부터 칼로리를 제공한다. 이들 제품은 또한 통상 비타민 및 무기질을 함유하는데, 이는 이들이 유일한 영양 공급원으로서 사용하는데 적합하도록 하고자 하기 때문이다. 이들 식사 대용 제품이 유일한 영양 공급원으로서 사용될 수 있지만, 이들은 통상적으로는 그렇지 않다. 개개인은 이들 제품을 하루에 1 또는 2개의 식사를 대체하도록 또는 몸에 좋은 간식을 제공하도록 소비한다. 본 발명의 영양 제품은 이들 양태를 포함하는 것으로 간주해야 한다.

[0076] 이들 영양 성분의 양은 목적하는 환자 그룹(즉, 암, HIV/AIDS, 관절염, 관능 검사적 고려, 배양의 선호도, 용도 등)에 따라 광범위하게 변할 수 있다. 그러나, 일반적인 비제한적 가이드라인으로서, 본 발명의 식사 대용 제

품은 하기의 상대적인 양의 단백질, 지방 및 탄수화물(전체 칼로리의 상대적 %를 기준으로 함)을 함유한다: 전체 칼로리 성분의 5 내지 80%로 제공되는 단백질 성분, 전체 칼로리 성분의 10 내지 70%로 제공되는 탄수화물 및 전체 칼로리 성분의 5 내지 50%로 제공되는 지질 성분.

[0077] 식사 대용품은 영양식을 제조하는 당해 분야의 숙련가에게 공지된 바와 같이 적절한 탄수화물, 지질 및 단백질을 함유한다. 적절한 탄수화물에는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 왁스 또는 비왁스 형태인 옥수수, 타피오카, 쌀 또는 감자로부터 공급되는 가수분해, 완전, 천연으로 및/또는 화학적으로 개질된 전분; 및 글루코즈, 프럭토즈, 락토즈, 수크로즈, 말토즈, 고 프럭토스 옥수수 시럽, 옥수수 시럽 고체, 프럭토올리고당 및 이들의 혼합물로부터 공급되는 당이 포함된다.

[0078] 적절한 지질에는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 코코넛유, 대두유, 옥수수유, 올리브유, 홍화씨유, 고 올레산 홍화씨유, MCT 유(중간쇄 트리글리세라이드), 해바라기유, 고 올레산 해바라기유, 야자유, 야자 올레인, 카놀라유, 목화씨유, 어유, 야자핵유, 청어박유, 대두유, 레시틴, 아라키돈산 및 도코사헥산에오산의 지질 공급원과 이들의 혼합물이 포함된다. 아라키돈산 및 도코사헥산에오산의 지질 공급원에는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 마린유, 난황유 및 진균류 또는 조류 오일이 포함된다.

[0079] 이들 지방의 수많은 시판용 공급원은 당해 분야의 숙련가가 용이하게 이용하고 알 수 있다. 예를 들면, 콩 및 카놀라유는 시판(제조원: Archer Daniels Midland; Decatur, Illinois 소재)중이다. 옥수수, 코코넛, 야자 및 야자핵유는 시판(제조원: Premier Edible Oils Corporation; Portland, Oregon 소재)중이다. 분별화된 코코넛유는 시판(제조원: Henkel Corporation; LaGrange, Illinois 소재)중이다. 고 올레산 홍화씨유 및 고 올레산 해바라기유는 시판(제조원: SVO Specialty Products; Eastlake, Ohio 소재)중이다. 마린유는 모키다 인터내셔널(Mochida International; Tokyo, Japan 소재)에서 시판중이다. 올리브유는 안글리아 오일즈(Anglia Oils; North Humberside, United Kingdom 소재)에서 시판중이다. 해바라기 및 목화씨유는 카질(Cargil; Minneapolis, Minnesota 소재)에서 시판중이다. 홍화씨유는 캘리포니아 오일즈 코퍼레이션(California Oils Corporation; Richmond, California 소재)에서 시판중이다.

[0080] 이들 식품 등급 오일 이외에, 구조화된 지질이, 경우에 따라, 식품에 혼입될 수 있다. 구조화된 지질은 당해 분야에 공지되어 있다. 구조화된 지질에 대한 구체적인 기술은 문헌(참조: INFORM, Vol., 8, No. 10, page 1004; 제목: Structured lipids allow fat tailoring(October 1997))에서 확인할 수 있다. 또한, 미국 특허 제4,871,768호를 참조한다. 구조화된 지질은 동일한 글리세롤 핵상에 주로 중간쇄 및 장쇄 지방산을 함유하는 트리아실글리세롤이다. 구조화된 지질 및 이들의 경장 제형에서의 용도가 또한 미국 특허 제6,194,379호 및 제6,160,007호에 기술되어 있다.

[0081] 임의로, ω -3 지방산은 대략 30%의 오일 혼합물을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 ω -3 지방산은 에이코사펜타엔산 및 도코사헥사엔산으로 대개 이루어진다. 영양 조성물의 제조시 사용되는 식이 오일은 일반적으로 트리글리세라이드 형태인 ω -3 지방산을 함유하며, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 카놀라, 중간쇄 트리글리세라이드, 어류, 대두, 대두 레시틴, 옥수수, 홍화씨, 해바라기, 고 올레산 해바라기, 고 올레산 홍화씨, 올리브, 서양지치, 블랙 커런트, 달맞이꽃 및 아마인유를 포함한다. 임의로, 본 발명에 따르는 지질 혼합물중 ω -6 지방산 대 ω -3 지방산의 중량비는 약 0.1 대 3.0이다. ω -3 지방산의 하루 투여는 450 mg 이상이어야 하며, 체중, 성별, 연령 및 개인의 의학적 상태에 따라 변할 수 있다. 언급한 바와 같이, 보다 높은 수준이 성인의 소비에 대해 바람직하며, 예를 들면, 하루에 약 0.5 내지 50 gm, 보다 바람직하게는 하루에 약 2.5 내지 5 gm이다.

[0082] ω -3 지방산과 HMB를 합하는 뜻밖의 잇점은 식사 대용물의 맛에 있어서의 개선이다. ω -3 지방산의 통상의 공급원은 어류 및 조류 오일이다. 각각의 공급원은 식사 대용 제품에 불쾌한 향을 남긴다. 본 발명자는 HMB를 가하여 비자발적인 체중 감소의 예방과 관련된 동일하거나 보다 양호한 임상 결과는, 심지어 제품에 최적에 못 미치거나 보다 낮은 수준의 ω -3 지방산을 사용하는 경우에도 수득될 수 있음을 발견하였다. 결과적으로, 본 발명자는 ω -3 지방산과 HMB 수준 사이에 역관계가 존재함을 발견하였다. 예를 들면, ω -3 지방산의 유효량이 2캔의 식사 대용품으로 전달되는 3 gm이라면, 동일한 임상 결과는 2캔으로 전달되는 ω -3 지방산 2 gm 및 HMB 1 gm을 함유하도록 제형화된 제품 또는, 2캔으로 전달되는 ω -3 지방산 1 gm 및 HMB 2 gm을 함유하도록 제형화된 제품에서 확인된다. ω -3 지방산 1 gm만을 함유하도록 제형화된 제품은 동일한 임상 효과를 성취하면서, ω -3 지방산 2 또는 3 gm을 사용하여 제형화한 제품보다 훨씬 더 맛이 좋다. 또한, ω -3 지방산은 염증의 매개체인 AA의 공지된 억제제이므로, ω -3 지방산 및 HMB를 함유하는 제품은 단독의 성분을 함유하는 것보다 더 넓은 잇점을 가질 수 있다.

- [0083] 적절한 단백질 공급원에는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 우유, 유청 및 유청 분획, 콩, 쌀, 육류(예: 소), 동물 및 식물(예: 완두, 감자), 계란(계란 알부미), 젤라틴 및 어류가 포함된다. 적절한 완전한 단백질 공급원에는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 콩계, 우유계, 카제인 단백질, 유청 단백질, 쌀 단백질, 소 콜라게, 완두 단백질, 감자 단백질 및 이들의 혼합물이 포함된다.
- [0084] 임의로, 완전한 단백질 공급원은 발린, 이소로이신, 로이신, 트레오닌, 티로신 및 페닐알라닌을 포함한 대형 중성 아미노산(LNAA)이 강화(enriched)되어 있다. 통상, 카제인, 유청 및 대두 단백질 공급원의 약 40%가 대형 중성 아미노산이다. 예를 들면, 카제이네이트는 약 38 중량/중량% LNAA를 함유하며, 유청 단백질 농축물은 약 39 중량/중량% LNAA를 함유하고, 대두 단백질 분리물은 약 34 중량/중량% LNAA를 함유한다. 통상, 식사 대용품은 하루에 약 1 내지 25 gm, 바람직하게는 하루에 약 1 내지 20 gm, 보다 바람직하게는 하루에 약 4 내지 20 gm의 LNAA를 전달하는 단백질 공급원을 사용하여 제형화한다. 한 예로서, 4.8 gm의 LNAA를 포함하는 단백질을 함유하고, 하루에 3회 소비되는 식사 대용품은 하루에 14.4 gm의 LNAA가 전달된다.
- [0085] 식사 대용품은 바람직하게는 제형이 투여되는 사람의 하루 필수 영양 물질을 공급하거나 보충하도록 고안된 양으로 비타민 및 무기질을 또한 함유한다. 당해 분야의 숙련가는 영양 제형이 종종 제품의 보존 기간에 걸쳐 이들이 목적하는 수준에 부합됨을 보장하기 위하여 초과 범위의 특정한 비타민 및 무기질을 포함함을 인지할 것이다. 이들 동일한 개개인은 또한 특정한 미소 성분이 환자가 겪는 임의의 근본적인 질병 또는 질환에 따라 사람에게 잠재적인 잇점을 가져다 줄 수 있음을 알 것이다. 예를 들면, 암 환자는 항산화제(예: 베타-카로틴, 비타민 E, 비타민 C 및 셀레늄)로부터 잇점을 얻는다. 식품은 바람직하게는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 하기의 비타민 및 무기질을 포함한다: 칼슘, 인, 나트륨, 염소, 마그네슘, 망간, 철, 구리, 아연, 셀레늄, 요오드, 크롬, 몰리브덴, 조건부 필수 영양소 m-이노시톨, 카르니틴 및 타우린과, 비타민 A, C, D, E, K 및 B 복합체 및 이들의 혼합물.
- [0086] 조건부 필수 영양소 카르니틴은 메티오닌 및 리신으로부터 형성되는 천연으로 존재하는 아미노산이다. 이의 주요 대사 작용은 미토콘드리아 막을 통한 장쇄 지방산의 운반과 관련이 있으므로, 대사 에너지를 위한 이들 연료 물질의 산화를 촉진한다. 카르니틴 보충은 간 및 신장병, 주요 만성 질병 또는 영양실조에 의해 합병되는 상당한 손상과 같은 병태에서 중요한 대사적 도구이다. 임의로, 식사 대용품은 4 gm/일 이하의 카르니틴을 공급하기에 충분한 수준으로 카르니틴을 보충할 수 있다.
- [0087] 식사 대용품은 또한 섬유 및 안정화제를 함유할 수 있다. 섬유 및/또는 안정화제의 적절한 공급원에는, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 크산탄 고무, 구아 고무, 아라비아 고무, 가티 고무, 카라야 고무, 트라가칸트 고무, 한천, 푸르셀라란, 젤란 고무, 로우커스트 콩 고무, 펙틴, 저급 및 고급 메톡시 펙틴, 귀리 및 보리 글루칸, 카라기난, 사일룸, 젤라틴, 미세결정성 셀룰로즈, CMC(나트륨 카복시메틸셀룰로즈), 메틸셀룰로즈 하이드록시프로필 메틸 셀룰로즈, 하이드록시프로필 셀룰로즈, DATEM(모노- 및 디글리세라이드의 디아세틸 타르타르산 에스테르), 텍스트란, 카라기난, FOS(프락토 올리고당) 및 이들의 혼합물이 포함된다. 가용성 식이 섬유의 수많은 시판용 공급원이 가능하다. 예를 들면, 아라비아 고무, 가수분해된 카복시메틸셀룰로즈, 구아 고무, 펙틴 및 저급과 고급 메톡시 펙틴은 티아이씨 겜즈, 인코포레이티드(TIC Gums, Inc.; Belcamp, Maryland 소재)에서 시판중이다. 귀리 및 보리 글루칸은 마운틴 레이크 스페셜티 잉그레디언트, 인코포레이티드(Mountain Lake Specialty Ingredients, Inc.; Omaha, Nebraska 소재)에서 시판중이다. 사일룸은 미어 코퍼레이션(Meer Corporation; North Bergen, New Jersey 소재)에서 시판중인 반면에서, 카라기난은 에프엠씨 코퍼레이션(FMC Corporation; Philadelphia, Pennsylvania 소재)에서 시판중이다.
- [0088] 혼입되는 섬유는 또한 불용성 식이 섬유일 수 있고, 이의 예로는 귀리 껍질 섬유, 완두 껍질 섬유, 콩 껍질 섬유, 콩 코틸레돈 섬유, 사탕무우 섬유, 셀룰로즈 및 옥수수 기율이 포함된다. 불용성 식이 섬유에 대한 수많은 공급원이 또한 가능하다. 예를 들면, 옥수수 기율은 퀵 오츠(Quaker Oats; Chicago, Illinois 소재)에서; 귀리 껍질 섬유는 캐네디안 하비스트(Canadian Harvest; Cambridge, Minnesota 소재)에서; 완두 껍질 섬유는 우드스톤 푸즈(Woodstone Foods; Winnipeg, Canada 소재)에서; 콩 껍질 섬유 및 귀리 껍질 섬유는 더 피브라드 그룹(the Fibrad Group; LaVale, Maryland 소재)에서; 콩 코틸레돈 섬유는 프로테인 테크놀로지스 인터내셔널(Protein Technologies International; St. Louis, Missouri 소재)에서; 사탕무우 섬유는 델타 파이버 푸즈(Delta Fiber Foods; Minneapolis, Minnesota 소재)에서 및 셀룰로즈는 제임스 리버 코퍼레이션(James River Corp.; Saddle Brook, New Jersey 소재)에서 시판중이다.
- [0089] 섬유의 예 및 이들의 식품으로의 혼입에 대한 보다 상세한 논의는 미국 특허 제5,085,883호(Garleb 등)에서 확인할 수 있다.

- [0090] 제형에 사용되는 섬유는 양은 변경될 수 있다. 사용되는 섬유의 특별한 형태는 중요치 않다. 사람의 소비에 적합하고, 식품 기질에서 안정한 임의의 섬유가 사용될 수 있다.
- [0091] 섬유 이외에, 식사 대용품은 또한 프럭토 올리고당(FOS) 또는 글루코 올리고당(GOS)과 같은 올리고당을 함유할 수 있다. 올리고당은 대장에서 사는 혐기성 미생물에 의해 신속히, 대규모로 단쇄 지방산으로 발효된다. 이들 올리고당은 대부분의 비피도박테리움 종에 대한 바람직한 에너지원이지만, 잠재적으로 병원체[예: 클로스트리듐 페르핀젠스(*Clostridium perfringens*), 씨이. 디필실(*C. difficile*) 또는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)]에 의해 이용되지 않는다.
- [0092] 통상, FOS는 식사 대용품 1인분(serving)당 0 내지 5 gm, 바람직하게는 1 내지 5 gm, 보다 바람직하게는 2 내지 4 gm이 포함된다.
- [0093] 식사 대용품은 또한 향을 함유하여 이의 기호성을 증진시킬 수 있다. 인공감미료는 향을 보충하고, 짠 맛을 감추기 위해 가할 수 있다. 유용한 인공감미료에는 사카린, 너트라스위트, 수크랄로즈, 아세실판-K(ace-K) 등이 포함된다.
- [0094] 식사 대용품은 당해 분야의 숙련자에게 잘 공지된 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 다양한 공정 기술이 존재한다. 통상, 이들 기술은 물 및 하나 이상의 다음 성분을 함유할 수 있는 하나 이상의 용액으로부터 슬러리의 형성을 포함한다: 탄수화물, 단백질, 지질, 안정화제, 비타민 및 무기질. HMB는 통상 다른 무기질에 앞서 탄수화물 슬러리에 가한다. 슬러리는 유화시켜, 균질화하고, 냉각시킨다. 다양한 다른 용액을 공정 전에, 공정 후에 또는 두 경우에 모두 슬러리에 가할 수 있다. 가공된 제형은 이어서 멸균시키고, 분말로 건조시키기 위하여 회석하며, 즉시 공급용으로 사용하거나, 농축 액체 형태로 포장한다. 생성된 제형이 즉시 공급 가능한 액체 또는 농축 액체임을 의미하는 경우에, 적절한 양의 물을 멸균화 전에 가한다.
- [0095] 고체 조성물(예: 바아, 쿠키 등)은 또한 당해 분야의 숙련자에게 공지된 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들면, 이들은 당해 분야에 공지된 냉압출 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 이러한 조성물을 제조하기 위하여, 통상 모든 분말화된 성분은 함께 건조 혼합한다. 이러한 성분은 통상 단백질, 비타민 예비 혼합물, 특정 탄수화물 등을 포함한다. 그 다음에, 지용성 성분은 함께 배합하고, 상기의 분말화된 예비 혼합물과 혼합한다. 마지막으로, 임의의 액체 성분을 조성물로 혼합하여, 플라스틱 형 조성물 또는 도우를 형성한다.
- [0096] 상기 공정은 냉성형 또는 압출과 같이 공지된 방법에 의해, 일어나는 추가의 물리적 또는 화학적 변화없이, 이후에 성형될 수 있는 플라스틱 매스를 제공하려 한다. 이 공정에서, 플라스틱 매스는 원하는 형태를 부여하는 다이로 비교적 저압에서 밀어넣는다. 생성된 압출물은 이어서 적절한 위치에서 절단하여 원하는 중량의 생성물을 수득한다. 경우에 따라, 고체 생성물은 피복시켜 기호성을 증진시키고, 유통을 위해 포장한다. 통상, 패키지는 최종 소비자의 사용(즉, 암 환자가 소비하기 위하여, 제지방 근육 감소의 방지를 돕기 위하여 등)을 위한 지침서를 제공한다.
- [0097] 본 발명의 고체 조성물은 또한 씨리얼, 쿠키 및 크래커를 생성하기 위하여 베이킹 적용 또는 가열 압출을 통해 제조할 수 있다. 당해 분야에서 알 수 있는 사람은 원하는 최종 생성물을 생성하기에 유용한 많은 제조 공정중 하나를 선택할 수 있다.
- [0098] 상기 제시된 바와 같이, HMB는 또한 주스, 비탄산음료, 탄산음료, 전해질 용액, 향이 있는 물(이후에는, 총괄적으로 "음료") 등에 혼합할 수 있다. HMB는 통상 음료 1인분당 0.5 내지 2 gm이 포함된다. 이러한 음료의 제조 방법이 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 독자는 본 명세서에 참조로 인용된 미국 특허 제6,176,980호 및 제5,792,502호에 관심이 간다. 예를 들면, HMB를 포함한 모든 성분은 적절한 용적의 물에 용해시킨다. 이어서, 향, 색상, 비타민 등을 임의로 가한다. 그 다음에, 혼합물을 저온살균하고, 포장하여, 선적할 때까지 저장한다.
- [0099] 소모증 또는 염증이 관련되는 임의의 질환(예: 심혈관계 질환, 말초 미세혈관계 질환, 중추 신경계 질환, 종양학, 면역 및 감염성 질환 상태)은 본 방법에 따라 치료할 수 있다. 바람직하게는, 질환은 암, 악액질, 노화-관련 소모증(wasting), 장기 입원과 관련된 소모증, HIV/AIDS, 관절염, 외상, 간 질환, 크론병 또는 다른 염증성 장 질환(IBD), 신부전 및 COPD(만성 폐색성 폐 질환)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 보다 바람직하게는, 질환은 악액질이다.
- [0100] 본 발명은 다른 양태로, 환자, 예를 들면, 포유동물, 바람직하게는 사람의 질환-관련 소모증의 치료 방법을 제공한다. 본 방법은 질환 관련 소모증을 치료하기에 충분한 양으로 HMB를 포함하는, 상기 조성물을 환자에 투여

하는 단계를 포함하며, 이때 환자에 조성물의 투여시, 질환-관련 소모증이 치료된다.

- [0101] 제시된 환자의 질환-관련 소모증을 치료하기에 충분한 HMB의 양은 당해 분야에 잘 공지된 방법에 따라 결정할 수 있다. 환자의 질환-관련 소모증을 치료하는 경우에, 바람직하게는 HMB를 포함하는 조성물을 환자의 지방 중량의 감소를 수반하지 않고 환자의 체지방 조직 중량이 증가되는 양, 방법 및 기간으로 질환-관련 소모증으로 고생하는 환자에 투여한다. 사람의 암 악액질 관련 소모증의 치료시 한 예로, 조성물을 최소 2주 동안 하루에 약 2회 경구 투여하는 경우에, 용량은 하루에 2 gm 이상의 HMB를 제공하기에 충분하다.
- [0102] 다른 양태로, 본 발명은 환자, 예를 들면, 포유동물, 바람직하게는 사람에서 종양 성장 속도를 감소시키는 방법을 제공한다. 본 방법은 종양 성장 속도를 감소시키기에 충분한 양으로 HMB를 포함하는 상기 조성물을 환자에 투여하는 단계를 포함하며, 이때 환자에 조성물의 투여시, 종양 성장 속도가 감소된다.
- [0103] 제시된 환자의 종양 성장을 감소시키기에 충분한 HMB의 양은 당해 분야에 잘 공지된 방법에 따라 결정할 수 있다. 환자의 종양 성장을 치료하는 경우에, 바람직하게는 HMB를 포함하는 조성물을 환자의 종양 성장 속도가 감소되는 양, 방법 및 기간으로 종양 성장으로 고생하는 환자에 투여한다. 성인의 종양 성장의 치료시 한 예로, 조성물을 최소 2주 동안 하루에 약 2회 경구 투여하는 경우에, 용량은 하루에 약 2 gm 이상의 HMB를 제공하기에 충분하다.
- [0104] 다른 양태로, 본 발명은 단백질 키나제 C의 발현 및/또는 활성의 하향 조절법을 제공한다. 실시예 I 내지 IV는 EPA 및 HMB가 모두 단백질 키나제 C(PKC)의 PIF-유도된 활성화 및 $I\kappa B\alpha$ 의 후속적인 분해와 핵 인자- $\kappa B(NF-\kappa B)$ 의 핵 축적을 감소시키는 것으로 나타났다.
- [0105] 다른 양태로, 본 발명은 핵 인자 카파-B의 발현 및/또는 활성의 하향 조절법을 제공한다. 실시예 I 내지 IV는 EPA 및 HMB가 모두 단백질 키나제 C(PKC)의 PIF-유도된 활성화 및 $I\kappa B\alpha$ 의 후속적인 분해와 핵 인자- $\kappa B(NF-\kappa B)$ 의 핵 축적을 감소시키는 것으로 나타났다.
- [0106] 본 발명은 다른 양태로, 유비퀴틴-접합 효소의 발현 및/또는 활성의 하향 조절법을 제공한다. 실시예 I 내지 IV는 E2_{14K} 유비퀴틴-접합 효소의 발현 감소를 수반한다고 제시하고 있다. EPA 및 HMB의 배합물이 적어도 단독의 치료만큼 효과적이거나 보다 효과적이다. 이들 결과는 EPA 및 HMB가 유비퀴틴-프로테아좀 단백질 가수분해 경로의 주요 조절 성분의 증가된 발현의 하향 조절을 통해 단백질 분해를 감소시켜 근육량을 보존한다고 제시하고 있다.
- [0107] 다른 양태로, 본 발명은 26S 프로테아좀 성분의 발현 및/또는 활성의 하향 조절법을 제공한다. 실시예 I 내지 IV는 '키모트립신형 효소 활성화'으로 측정되는 프로테아좀 활성이 HMB에 의해 감소된다고 제시하고 있다. 20S α 또는 β 서브유닛의 단백질 발현은 19S 프로테아좀 조절 서브유닛의 ATPase 서브유닛 MSS1 및 p42에서와 같이 적어도 50% 감소된다.

실시예

- [0108] 실시예 1
- [0109] 암 악액질이 있는 동물에서 체중 감소의 예방 및 단백질 분해의 감소
- [0110] 이 연구는 MAC16 종양 및 관련된 메카니즘에 의해 유도되는 체중 감소에 대한 EPA 또는 이와는 배합물과 비교한, HMB의 효과를 평가하는 것이다. MAC16 종양에 의해 유도되는 체중 감소는 주로 PIF에 의해 유도된다.
- [0111] 순수 계통 수컷 NMRI 마우스(평균 체중 25 g)는 자신의 동종번식 콜로니로부터 수득하고, 문헌(참조: Bibby, M.C. et al. Characterization of a transplantable adenocarcinoma of the mouse colon producing cachexia in recipient animals. J. Natl. Cancer Inst., 78: 539-546, 1987)에 기술된 바와 같이 체중 감소된 공여자 동물로부터 선택하여, 투관침에 의해 옆구리로 MAC16 종양의 단편을 이식한다. 이식된 동물에 래트 및 마우스 번식 식단(참조: Special Diet Service, Witham, United Kingdom) 및 물을 임의로 공급하고, 체중 감소는 종양 이식한 지 10 내지 12일 후에 명확해진다. 대조용 동물에는 올리브유 또는 PBS를 투여하는 반면에, 체중 감소의 발생 직전의 동물은 유동식으로 경구 투여된 도면의 예에 기술한 바와 같이 하루에 EPA(올리브유중), HMS(PBS중) 또는 배합물을 무작위로 투여한다. EPA(유리산으로서 98%)는 바이오몰 리서치 래보라토리즈 인코포레이티드(Biomol Research Laboratories Inc.; PA, USA 소재)에서 구입한다. HMB(칼슘 염으로서)는 애보트 래보라토리즈(Abbott Laboratories; Columbus, Ohio, USA 소재)에서 입수한다. 모든 그룹은 최소 6 마리의 마우

스를 포함한다. 종양 용적, 체중 및 먹이와 물 섭취는 매일 모니터링한다. 동물은 체중 감소가 25%에 이르는 경우에 경추 전위에 의해 종결되고, 모든 연구는 실험실용 동물의 보호 및 사용에 대한 UKCCR 가이드라인에 따라 수행한다. 가자미근은 손상되지 않은 힘줄과 함께, 신속히 절개하고, 단백질 분해의 측정 전에 등장성 빙냉 염수 내에 유지한다.

[0112] 새로이 절개된 가자미근은 장력하에 근 단축을 방지하기 위해 대략 휴지시의 길이로 힘줄을 통해 알루미늄 와이어 지지체에 고정하고, 5 mM 글루코즈 및 0.5 mM 사이클로헥시미드를 함유하는 산소화(95% 산소: 5% 이산화탄소) 크랩스-헨젤라이트 바이카보네이트 완충액(pH 7.4) 3 ml에서 45분 동안 예비배양한다. 단백질 분해는 문헌(참조: Waalkes, T.P. et al. A fluorimetric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. J. Lab. Clin. Med., 50:733-736, 1957)에 기술된 바와 같이 2시간 동안 티로신의 방출에 의해 측정한다.

[0113] 작용성 프로테아좀 활성은 문헌(참조: Orino, E. et al. ATP-dependent reversible association of proteasomes with multiple protein components to form 26S complexes that degrade ubiquitinated proteins in human HL-60 cells. FEBS Lett., 284:206-210, 1991)의 방법에 따라 '키모트립신형' 효소 활성, 프로테아좀의 β -서브유닛의 현저한 단백질 가수분해 활성을 측정하여 결정한다. 근육을 빙냉 PBS로 세정하고, 저민다음, 20 mM Tris. HCl, pH 7.5, 2mM ATP, 5 mM $MgCl_2$ 및 1 mM DTT에서 초음파 처리한다. 그 다음에, 초음파 처리된 것은 4 °C에서 18,000g에서 10분 동안 원심분리하고, 상등액은 플루오로겐 기질 석시닐-LLVY-AMC로부터 아미노메틸 쿠마린(AMC)의 방출에 의해 '키모트립신-형' 효소 활성을 측정하는데 사용한다. 활성은 특정 프로테아좀 억제제 락타시스틴(10 μ M)의 부재 및 존재하에 측정한다. 단지 락타시스틴 억제성 활성이 프로테아좀 특이적인 것으로 여겨진다.

[0114] 웨스턴 블롯팅을 위해, 상기 검정에서 수득된, 가자미근 사이토졸 단백질(2 내지 5 μ g)의 샘플을 10% SDS-PAGE에 용해시키고, PBS중 5% 마블로 차단한 0.45 μ m 니트로셀룰로즈 막(HybondTM, Amersham Life Science Products, Bucks, United Kingdom)으로 옮긴다. MSS1 및 p42에 대한 1차 항체는 1:5000의 희석으로 사용되며, 20S 프로테아좀 α -서브유닛의 경우에는 1:1500으로, β -서브유닛의 경우에는 1:1000으로 사용하는 반면에, E2_{14k}에 대한 항체는 1:500의 희석으로 사용된다. 2차 항체는 1:2000의 희석으로 사용된다. 20S 프로테아좀 서브유닛 α 1, 2, 3, 5, 6 및 7(클론 MCP 231), 20S 프로테아좀 서브유닛 β 3(HC10), 19S 조절자 ATPase 서브유닛 Rpt 1(S7, Mss1; 클론 MSS1-104) 및 19S 조절자 ATPase 서브유닛 Rpt4(S106, p42; 클론 p42-23)에 대한 마우스 모노클로날 항체는 아피니티 리서치 프로덕츠(Affiniti Research Products; Exeter, United Kingdom 소재)에서 구입한다. 유비퀴틴-접합 효소 E2에 대한 토끼 폴리클로날 항혈청(항-UBC2 항체)은 닥터 사이몬 윙, 맥길 유니버시티(Dr. Simon Wing; McGill University; Montreal, Quebec, Canada 소재)로부터 수득한다. 퍼옥시다제-접합된 염소 항-토끼 및 토끼 항-마우스 2차 항체는 다코 리미티드(Dako Ltd.; Cambridge, United Kingdom 소재)로부터 입수한다. 배양은 실온에서 2시간 동안 수행하고, 화학 발광(ECL; Amersham)에 의해 전개시킨다.

[0115] MAC16 종양을 갖는 마우스에서 체중 감소에 대한 HMB의 용량-반응 관계가 도 2에 제시되어 있다. 0.125 g/kg 보다 큰 HMB의 용량은 체중 손실에 있어 상당한 감소를 유발한다(도 2A). 대조용 그룹과의 차는 a, $p < 0.05$; b, $p < 0.01$ 또는 c, $p < 0.005$ 로서 나타낸다. 체중 감소의 감쇠는 음식 및 물 섭취의 변화를 수반하지 않는다. 0.25 g/kg의 용량 수준은 모든 후속 실험을 위해 선택된다. MAC16 악액질성 종양 함유 마우스에서의 체중 감소에 대한 HMB, EPA 및 HMB와 EPA의 배합물의 효과가 도 3에 제시되어 있다. 대조용 그룹과의 차는 a, $p < 0.05$; b, $p < 0.01$ 및 c, $p < 0.005$ 로서 나타낸다. EPA의 준최적화 용량은 HMB와의 상호작용을 연구하기 위하여 선택한다. 모든 치료는 가자미근 중량에 있어서 상당한 증가(도 4A) 및 티로신 방출에 있어서 상당한 감소(도 4B)를 일으켜, 전체 단백질 분해의 감소를 나타낸다. PBS 대조용 그룹과의 차는 a, $p < 0.05$; b, $p < 0.01$ 또는 c, $p < 0.005$ 로서 나타낸다. 선택된 용량에서, HMB는 EPA 만큼 효과적이다.

[0116] 프로테아좀 발현은 MAC16 종양을 갖는 마우스의 비복근에서 증가되는 것으로 나타났고, 이러한 증가된 유전자 발현은 EPA에 의해 감쇠됨을 나타내고 있다. 도 5의 결과는 '키모트립신-형' 효소 활성에 의해 측정되는 바와 같이, 작용성 프로테아좀 활성이 선택된 용량에서 EPA와 동일한 정도로 HMB에 의해 감쇠되고, HMB 및 EPA의 배합물이 활성을 추가로 억제하지는 않음을 나타낸다. 대조용과의 차는 c, $p < 0.005$ 로서 나타낸다. 프로테아좀 서브유닛의 단백질 발현은 초음파 처리된 근육 조직으로부터의 상등액의 웨스턴 블롯팅에 의해 분석한다. 프로테아좀의 구조 단위, 20S 프로테아좀 α -서브유닛의 발현은 HMB 및 EPA에 의해 모두 감쇠되고, 배합물에 대해 밴드 2의 추가 감소의 척도가 존재한다(도 6A). 대조용과의 차는 c, $p < 0.001$ 로서 나타내지만, HMB와의 차는 e,

$p < 0.01$ 로서 제시되고 있다. 프로테아좀의 촉매적 서브유닛, 20S 프로테아좀 β -서브유닛의 발현도 또한 HMB 및 EPA에 의해 감쇠되지만, 배합물은 제제 단독보다 더 효과적이다(도 6B). 대조용과의 차는 c , $p < 0.001$ 로서 나타낸다.

[0117] 19S 프로테아좀 조절 복합체의 ATPase 서브유닛, MSS1의 발현이 도 7A에 제시되어 있다. HMB 및 EPA는 모두 MSS1 발현을 감쇠시키지만, 배합물이 추가적인 감소는 일으키지 않는 것으로 나타났다. 유사한 결과는, 20S 프로테아좀과 19S 조절자의 ATP 의존성 결합을 촉진하여 26S 프로테아좀을 형성시키는 19S 조절자의 또다른 ATPase 서브유닛인 p42를 사용하여 수득된다(도 7B). 대조용과의 차는 c , $p < 0.001$ 로서 나타낸다. 또한, HMB 및 EPA는 모두 동일하게 효과적인 것으로 나타난 반면에, 배합물은 p42 발현을 추가로 감소시키는 것으로 나타났다. 유비퀴틴-접합 효소, E2_{14k}의 발현이 또한 HMB 및 EPA 모두에 의해 감소되는 반면에, 혼합물은 발현에 있어서 추가 감소를 야기한다(도 8). 대조용과의 차는 b , $p < 0.01$ 및 c , $p < 0.001$ 로서 나타내지만, HMB 단독과의 차는 d , $p < 0.05$ 및 f , $p < 0.001$ 로서 나타낸다. 이들 결과는 HMB가 근육량의 감소, 단백질 분해 및 유비퀴틴-프로테아좀 단백질 가수분해 경로를 하향 조절하는데 있어서 EPA 만큼 효과적임이 확인된 것이고, 이 메카니즘은 MAC16 종양을 갖는 악액질성 마우스에서 근육량의 보존에 책임을 다할 수 있는 것으로 나타났다.

[0118] 이 연구는 HMB가 MAC16 종양을 갖는 마우스에서 악액질 또는 비자발적인 체중 감소의 발생을 감쇠하는데 효과적이고, 유비퀴틴-프로테아좀 경로의 증가된 발현을 하향 조절하여 골격근에서 단백질 분해의 감소를 일으키는 것을 밝혔다. 따라서, HMB는 19S 조절자의 두 서브유닛 MSS1 및 p42 뿐만 아니라, 20S 프로테아좀 α 및 β 서브유닛의 단백질 발현, E2_{14k}의 발현 및 프로테아좀 단백질 가수분해 활성을 감소시키는 데 있어 EPA 만큼 효과적이다.

[0119] 실시예 II

[0120] 동물에서 종양 성장의 감쇠

[0121] 상기 실시예 I에 기술한 동물 연구는 또한 MAC16 악액질성 종양을 갖는 마우스에서 종양 성장 속도에 대한 HMB의 효과를 평가한다. 실험은 실시예 I에 기술한 바와 같이 수행한다.

[0122] MAC16 종양을 갖는 마우스에서 종양 성장 속도에 대한 HMB 단독의 용량-반응 관계가 도 2B에 제시되어 있다. 대조용 그룹과의 차는 a , $p < 0.05$; b , $p < 0.01$ 및 c , $p < 0.005$ 로서 나타낸다. 0.125 g/kg 보다 큰 HMB의 용량은 종양 성장 속도의 상당한 감소를 유발한다. 종양 성장의 감쇠는 음식 및 물 섭취의 변화에 수반된 것이 아니다.

[0123] 실시예 III

[0124] 마우스 근관에서 단백질 분해의 감쇠

[0125] 이 연구는 유비퀴틴-프로테아좀 단백질 가수분해 경로의 증가된 발현의 감쇠 메카니즘을 결정하기 위하여 마우스 근관에서 PIF-유도된 단백질 분해 및 신호화 경로에 대한 HMB의 효과를 시험한다.

[0126] C₂-C₁₂ 근관은 통상 37 °C의 공기중 10% CO₂의 대기하에 10% FCS, 글루타민 및 1% 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 DMEM 내에 통과된다. 근관은 배지를 2일 마다 교환시켜 주면서, 2% HS를 함유하는 DMEM에서 합류 배양액이 분화되도록 함으로써 형성된다.

[0127] PIF는 20 내지 25%의 체중이 감소된 마우스로부터 절제된 고체 MAC16 종양으로부터 정제한다(참조: Todorov, P. et al. Characterization of a cancer cachectic factor. Nature, 379:739-742, 1996). 종양은 5 ml/g 종양의 농도로 0.5 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드, 0.5 mM EGTA 및 1 mM 디티오프레이톨을 함유하는 10 mM Tris-HCl, pH 8.0에서 균질화시킨다. 고체 황산암모늄을 40% w/v까지 첨가하고 황산암모늄을 제거한 후, 상등액을 문헌(참조: Todorov, P. et al. Induction of muscle protein degradation and weight loss by a tumor product. Cancer Res., 56:1256-1261, 1996)에 기술된 바와 같이 고체 기질에 결합된 항-PIF 모노클로날 항체를 사용하여 친화성 크로마토그래피시킨다. 면역원성 분획을 농축시키고, 다음 연구를 위해 사용한다.

[0128] 6개 웰의 멀티디쉬 중 근관은 2% HS를 함유하는 DMEM 2 ml에서 24시간 동안 L-[2,6-³H]페닐알라닌(0.67 mCi/mmol)으로 표지한다. 그 다음에, 이들은 PBS로 3회 세척한 다음, 상등액에 더 이상 방사능이 나타나지 않

을 때까지 페놀 레드없이 DMEM중 37 °C에서 2시간 배양시킨다. 이들 근관은 이어서 페놀 레드없는 새로운 DMEM에서, EPA 또는 HMB의 존재 또는 부재하에, PIF의 존재하에 24시간 동안 다시 배양시켜 계수의 억제를 방지하고, 2 mM 내 페닐알라닌의 존재하에 방사능의 재혼입을 방지한다. 배지로 방출되는 방사능의 양은 PIF에 노출되지 않은 대조용 배지의 %로서 나타내어 전체 단백질 분해를 측정한다.

[0129] 아라키돈산 방출을 위해, 2% HS를 포함한 DMEM 2 ml를 함유하는 6개 웰의 멀티디쉬 중 근관은 24시간 동안 10 μ M 아라키돈산(1 μ Ci의 [^{3} H]아라키도네이트/ml를 함유함)으로 표지한다(참조: Smith, H. et al. Effect of a cancer cachectic factor on protein synthesis/degradation in murine C₂-C₁₂ myoblasts; Modulation by eicosapentaenoic acid. Cancer Res., 59:5507-5513, 1999). 그 다음에, 세포는 PBS로 대규모로 세척하여 미량의 혼입되지 않은 [^{3} H]아라키도네이트를 제거하고, EPA 또는 HMB는 PIF 2시간 전에 가한다. 다시 24시간 후에, 배지 1 ml를 제거하여 방출되는 방사능을 측정한다.

[0130] 프로테아좀의 β 서브유닛의 작용 활성은 문헌(참조: Orino, E. et al. ATP-dependent reversible association of proteasomes with multiple protein components to form 26S complexes that degrade ubiquitinated proteins in human HL-60 cells. FEBS Lett., 284:206-210, 1991)의 방법에 따라 형광적으로 수득되는 '키모 트립신형' 효소 활성으로서 측정한다. 근관은 PIF 2시간 전에 부가한 EPA 또는 HMB의 존재 또는 부재하에 24시간 동안 PIF에 노출시키고, 효소 활성은 특정 프로테아좀 억제제 락타시스틴(10 μ M)(참조: Fenteany, G. et al. Lactacystin, proteasome function and cell fate. J. Biol. Chem., 273:8545-8548, 1998)의 존재 및 부재하에 석시닐-LLVY-AMC(0.1 mM)로부터 아미노메틸 쿠마린(AMC)의 방출에 의해 상등액 분획 중에서 측정한다(참조: Whitehouse, A.S. et al. Increased expression of the ubiquitin-proteasome pathway in murine myotubes by proteolysis-inducing factor(PIF) is associated with activation of the transcription factor NF- κ B. Br. J. Cancer, 89:1116-1122, 2003). 단지 락타시스틴 억제성 활성이 프로테아좀 특이적인 것으로 여겨진다. 활성은 샘플의 단백질 농도에 대해 조절하고, 표준으로서 소혈청 알부민을 사용하는 브래드포드 검정(Sigma Chemical Co., Dorset, United Kingdom)을 사용하여 측정한다.

[0131] 웨스턴 블롯 분석을 위해, 상기 검정에서 수득된, 사이토졸 단백질(2 내지 5 μ g)을 10% SDS-PAGE에 용해시키고, 4°C에서 밤새 PBS중 5% 마블로 차단한 0.45 μ m 니트로셀룰로즈 막으로 옮긴다. 1차 항체는 1:100(항-악틴 및 PKC α); 1:500(항-ERK1 및 2); 1:1000(항-20S 프로테아좀 β -서브유닛 및 I- κ B α); 1:1500(항-20S 프로테아좀 α -서브유닛) 또는 1:5000(항-p42)으로 희석하여 사용하는 반면에, 2차 항체는 1:2000의 희석으로 사용된다. 배양은 실온에서 2시간 동안 수행하고, 성장은 ECL로 한다. 부하는 악틴 농도에 의해 정량화한다.

[0132] DNA 결합 단백질은, 저장성 용해를 이용한 다음, 핵의 고염 추출을 이용하는 문헌(참조: Andrews, N.C. et al. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. Nucleic Acids Res., 19:2499, 1991)의 방법에 의해 근관으로부터 추출한다. EMSA(전기영동 운동성 이동 검정법) 결합 검정법은 제조업자의 지시에 따라 수행한다.

[0133] MAC16 종양을 갖는 마우스에서 유비퀴틴-프로테아좀 단백질 가수분해 경로의 단백질 분해 및 활성화가 PIF에 의해 매개되는 것으로 여겨지므로, 단백질 분해에 대한 HMB의 효과에 관한 역학적 연구는 PIF로 처리한 마우스의 근관에서 수행한다. PIF 유도된 전체 단백질은, 4 nM에서 최대 효과를 갖는, 문헌(참조: Gomes-Marcondes, et al. Development of an *in-vitro* model system to investigate the mechanism of muscle protein catabolism induced by proteolysis-inducing factor. Br. J. Cancer, 86:1628-163, 2002)에 이미 보고된 바와 같이, 통상의 벨-형태 용량-반응 곡선에 따라 분해된다. EPA의 효과는 50 μ M에서 효과적인 것으로 이미 제시되었고(참조: Smith, H.J. et al. Effect of a cancer cachectic factor on protein synthesis/degradation in murine C₂-C₁₂ myoblasts: Modulation by eicosapentaenoic acid. Cancer Res., 59:5507-5513, 1999; Whitehouse, A.S. et al. Induction of protein catabolism in myotubes by 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid through increased expression of the ubiquitin-proteasome pathway. Br.J. Cancer, 89:737-745, 2003; 및 Whitehouse, A.S. et al. Increased expression of the ubiquitin-proteasome pathway in murine myotubes by proteolysis-inducing factor(PIF) is associated with activation of the transcription factor NF κ B. Br. J. Cancer, 89:1116-1122, 2003), 도 9A의 데이터는 50 μ M의 농도에서, HMB 및 EPA가 모두 PIF 유도된 단백질 분해를 감소시키는데 동일하게 효과적임을 제시하고 있다. 또한, PIF의 높은 농도가 아닌, 낮은 농도에서 25 μ M HMB에서 일부 감쇠가 있다. PIF의 부재하에 대조용과의 차는 a, p<0.005로서 나타내는 반면에, PIF의 존재하에 대조용과의 차(HMV 또는 EPA가 부가된 그룹에 대해)는 b, p<0.01 및 c, p<0.005로서 나타낸다.

- [0134] PIF-유도된 단백질 분해는 이미 문헌(참조: Lorite, M.J., Smith, H.J., Arnold, J.A., Morris, A., Thompson, M.G. and Tisdale, M.J. Activation of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal muscle in vivo and murine myoblasts in vitro by a proteolysis-inducing factor(PIF). Br. J. Cancer, 85:297-302, 2001 및 Gomes-Marcondes, M.C.C., Smith, H.J., Cooper, J.C. and Tisdale, M.J. Development of an in-vitro model system to investigate the mechanism of muscle protein catabolism induced by proteolysis-inducing factor. Br. J. Cancer, 86: 1628-1633, 2002)에 의한 유비퀴틴-프로테아좀 단백질 가수분해 경로의 조절 성분의 증가된 발현에 기인하는 것으로 나타나 있다.
- [0135] 이 경로의 작용 활성화는 프로테아좀의 β -서브유닛의 주된 단백질 가수분해 활성인, '키모트립신-형' 효소 활성화에 의해 측정한다. PIF는 '키모트립신-형' 효소 활성화의 증가를 유도하며, 이는 4.2 nM에서 최대이다. PIF의 효과는 50 μ M EPA 및 25와 50 μ M HMB 모두에서 완전히 감소된다(도 9B, 대조용과의 차는 a, $p < 0.001$ 로 나타내지만, EPA 또는 HMB의 존재하에 차는 b, $p < 0.001$ 로서 제시된다). 유사한 효과는 20S α 서브유닛, β 서브유닛 및 20S 프로테아좀과 19S 조절자의 ATP-의존성 결합을 촉진하여 26S 프로테아좀을 형성시키는 19S 조절자의 ATPase 서브유닛인 p42의 발현에 대해 관찰된다(도 10). 모든 경우에, 발현은 4.2 및 10 nM에서 PIF에 의해 증가되고, 이는 25 μ M이 아닌, 50 μ M에서 EPA 및 HMB에 의해 감소된다. 이들 결과는 유비퀴틴-프로테아좀 경로의 PIF 유도에 대한 효과를 통해 HMB가 단백질 분해를 감소시킴을 확인해 주는 것이다.
- [0136] 실시예 IV
- [0137] 염증 및 단백질 가수분해에서 신호화의 매개체 활성화에 대한 효과
- [0138] 상기 실시예 III에 기술된 시험관내 연구는 또한 염증 경로에서 주요 매개체인 분자에 대한 HMB의 효과를 평가한다. 이 실험은 실시예 III에 기술된 바와 같이 수행한다.
- [0139] PKC를 활성화시키는 것은 MAPK 신호화 경로의 세포외 신호-조절 키나제(ERK) 캐스케이드를 활성화시키는 것으로 밝혀졌다(참조: Toker, A. Signalling through protein kinase C. Front. Biosci., 3:1134-1147, 1998; Wolf, I and Seger, R. The mitogen-activated protein kinase signalling cascade: from bench to bedside. IMAJ., 4:641-647). 활성화된 ERK, 예를 들면, ERK1(또는 p44 MARK) 및 ERK2(또는 p42 MAPK)는 포스포릴화되고, 결과적으로 염증에 아라키돈산 방출을 포함하는 경로에서 속도-제한 효소인, 사이토솔 포스포리파제 A2를 활성화시킬 수 있다. 또한, PIF는 p42/44 MAPK의 포스포릴화를 유도하는 반면에 전체 MAPK는 변하지 않고, PIF-유도된 프로테아좀 발현에 관여하는 것으로 밝혀졌다(참조: Smith, H.J. et al. Signal transduction pathways involved in proteolysis-inducing factor induced proteasome expression in murine myotubes. Br. J. Cancer, 80:1783-1788, 2003). 이 과정에 대한 EPA 및 HMB의 효과가 도 12에 제시되어 있다. PIF는 4.2 nM에서 최대인 p42/44의 증가된 포스포릴화를 유도하고, 이 효과는 25 μ M의 HMB는 아닌, 50 μ M의 EPA 및 HMB 모두에 의해 완전히 감소된다. ERK 1/2 포스포릴화를 감소시키는 HMB의 능력은 HMB에 의한 PIF-유도된 프로테아좀 발현의 억제에서 중요할 수 있다.
- [0140] PKC의 돌연변이를 사용하는 실험 및 당해 효소의 억제제는 이것이 PIF에 의한 세포내 신호화의 중심 매개체를 형성시킴을 밝히고 있다. PKC는 증가된 유전자 전사 및 NF- κ B의 핵 축적을 유도하는 I- κ B α 의 포스포릴화(및 분해)에 관여하는 것으로 보인다. PIF는 세포질로부터 혈장 막으로 PKC α 의 전좌(도 11)를 촉진하여, 단백질 분해와 함께 4.2 nM PIF에서 최대 효과를 가지면서 활성화된다(도 9). 이 과정은 50 μ M에서 EPA 및 HMB 모두에 의해 효과적으로 감소되는 반면에, HMB는 25 μ M에서는 덜 효과적이다(도 11). 이는 PKC의 PIF-유도된 자극이 PKC의 억제를 통해 HMB에 의해 감소됨을 제시하고 있다.
- [0141] 이미 언급한 바와 같이, PIF는 I- κ B α 의 분해를 유도하고, NF- κ B의 핵 축적을 촉진하며, 이 과정은 50 μ M EPA에 의해 감소됨이 보여졌다(참조: Whitehouse, A.S. et al. Increased expression of the ubiquitin-proteasome pathway in murine myotubes by proteolysis-inducing factor(PIF) is associated with activation of the transcription factor NF- κ B. Br. J. Cancer, 89:1116-1122, 2003). 도 13A의 결과는 50 μ M의 HMB가 마우스의 근관에서 PIF의 존재하에 I- κ B α 분해를 효과적으로 감소시키고, NF- κ B의 핵 축적을 방지함을 보이고 있다(도 13C). 0 nM PIF와의 차는 b, $p < 0.01$ 및 c, $p < 0.001$ 로서 나타낸다. HMB가 25 μ M의 농도로 사용되는 경우에, DNA에 대한 NF- κ B의 결합의 단지 부분적 억제가 관찰된다(도 13B). 0 nM PIF와의 차는 b= $p < 0.01$ 및 c= $p < 0.001$ 이다. 동일한 농도로 단독의 PIF에 대해 처리한 50 μ M HMB 및 PIF 사이의 차는 e= $p < 0.01$ 및 f= $p < 0.001$ 이다. 이들 결과는, 유전자 발현의 활성화가 동시에 일어나면서 NF- κ B가 핵으로 이동하

는 것을 방지하는데 있어서 EPA의 효과와 HMB의 전반적인 효과가 견줄만함을 제시하고 있다.

[0142] 따라서, HMB는 암 악액질에서 사이토킨 유도된 염증 및 근소모증의 치료시 효과적인 제제인 것으로 밝혀졌다. HMB는 PKC 활성의 억제 및 생성된 세포질 I κ B/NF- κ B 복합체의 안정화에 의해 이의 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다. 이들 분자가 염증 경로에서 주요 매개체이므로, HMB는 소염성 화합물인 것으로 나타났다.

[0143] 실시예 V

[0144] 비자발적인 체중 감소를 방지하기 위한 영양 생성물의 조성물

[0145] 본 실시예의 영양 생성물을 제조하기 위한 특정 물질 리스트가 표 1에 제시되어 있다. 물론, 본 발명의 범위로 부터 벗어남이 없이, 특정 성분 및 양에 있어서의 다양한 변화가 이루어질 수 있다.

표 1a

[0146] 물질 리스트

성분	양(kg)
물	316
초미량/미량 무기질 예비 혼합물	0.06
황산아연	0.033
황산망간	0.0082
몰리브산나트륨	0.00023
염화크롬	0.00029
나트륨 셀레나이트	0.000098
염화칼륨	0.072
나트륨 시트레이트	2.89
요오드화칼륨	0.00009
칼륨 시트레이트	1.5
옥수수 시럽	7.68
말토덱스트린	53.6
이염기성 인산마그네슘	0.26
삼염기성 인산칼슘	0.99
염화마그네슘	1.2
수크로즈	11.9
프럭토 올리고당	5.9
중간쇄 트리글리세라이드	2.6
카놀라유	1.5
대두유	0.87
57% 비타민 A 팔미테이트	0.007
비타민 DEK 예비 혼합물	0.04
비타민 D	0.0000088
D-알파-토코페롤 아세테이트	0.036
필로퀴논	0.00006
카라기난	0.03
대두 레시틴	0.6
나트륨 카제이네이트	15.5
칼슘 카제이네이트	4.2
칼슘 HMB 일수화물	2.6
유단백질 분리물	14
정제 탈취 정어리유	6.9
아스코르브산	0.12
45% 수산화칼륨	0.13
타우린	0.12

표 1b

[0147]	수용성 비타민 예비 혼합물	0.11
	니아신아미드	0.017
	칼슘 판토테네이트	0.01
	티아민 클로라이드 하이드로클로라이드	0.003
	피리독신 하이드로클로라이드	0.003
	리보플라빈	0.002
	엽산	0.0004
	비오틴	0.00034
	시아노코발민	0.000038
	아스코르빌 팔미테이트	0.03
	콜린 클로라이드	0.25
	L-카르니틴	0.0681
	N&A 마쉬멜로우 바닐라	1.6
	N&A DULCE DE LECHE	0.27

[0148] 본 발명의 액체 영양 생성물은, 함께 배합하고, 정제된 탈취 정어리유와 합하고, 가열 처리한 다음, 표준화하여, 포장 및 멸균한 세 개의 슬러리를 제조하여 제조한다. 표 7의 물질 리스트를 사용하여, 액체 영양 생성물 454 kg(1,000 lb)을 제조하는 방법이 하기에 상세히 기재된다.

[0149] 탄수화물/무기질 슬러리는 먼저 물 약 62.6 kg을 교반하에 약 71 내지 77 °C의 범위인 온도로 가열하여 제조한다. HMB를 물에 가하고, 생성된 용액을 5분 이상 교반하여 용해시킨다. 필요한 양의 칼륨 시트레이트 및 초미량/미량 무기질 예비 혼합물을 물에 가하고, 생성된 용액을 10분 이상 교반하여 용해시킨다. 그 다음에, 나열된 순서로, 강한 교반하에 하기의 무기질을 가한다: 염화마그네슘, 염화칼륨, 나트륨 시트레이트, 요오드화칼륨, 인산마그네슘 및 인산삼칼슘. 슬러리는 완전히 용해되거나 분산될 때까지 중간 교반하에 혼합한다. 이어서, 옥수수 시럽, 수크로즈 및 말토덱스트린을 교반하면서 슬러리에 가한다. 필요량의 FOS를 가하고, 혼합한다. 완성된 탄수화물/무기질 슬러리는 다른 슬러리와 혼합될 때까지 8시간 이하 동안 약 60 내지 66 °C 범위의 온도에서 강한 교반하에 유지한다.

[0150] 오일 슬러리는 중간쇄 트리글리세라이드(분별화된 코코넛유), 카놀라유 및 대두유를 교반하면서 약 32 내지 43 °C 범위의 온도로 합하고 가열하여 제조한다. 비타민 DEK 예비 혼합물을 가하고, 완전히 분산될 때까지 혼합한다. 필요한 양의 하기 성분들을 가한다: 대두 레시틴, 비타민 A, 아스코르빌 팔미테이트 및 비타민 E. 카라긴을 가하고, 완전히 분산될 때까지 혼합한다. 완성된 오일 슬러리는 다른 슬러리와 혼합될 때까지 8시간 이하 동안 약 32 내지 43 °C 범위의 온도에서 중간 교반하에 유지한다.

[0151] 단백질 슬러리는 먼저 물 약 196.78 kg을 교반하에 약 60 내지 63 °C의 범위인 온도로 가열하여 제조한다. 칼슘 카제이네이트 및 나트륨 카제이네이트와 유단백질 분리물은 혼합 장치를 사용하여 슬러리와 혼합한다. 완성된 단백질 슬러리는 다른 슬러리와 혼합될 때까지 2시간 이하 동안 약 54 내지 60 °C 범위의 온도에서 교반하에 유지한다.

[0152] 오일 및 단백질 슬러리를 교반하에 함께 혼합하고, 생성된 혼합 슬러리는 약 54 내지 66 °C 범위의 온도에서 유지한다. 5분 이상 동안 기다린 후에, 탄수화물/무기질 슬러리를 전술한 단계로부터의 혼합된 슬러리에 교반하면서 가하고, 생성된 혼합 슬러리는 약 54 내지 66 °C 범위의 온도에서 유지한다. 그 다음에, 정제된 탈취 정어리유를 교반하에 슬러리에 가한다(가장 바람직한 제조 방법에서, 정어리유는 일정한 속도로 도관을 통해 혼합물을 통과시키면서 생성물 내에 서서히 계량공급한다). 바람직하게는, 5분 이상 후에, 혼합된 슬러리의 pH를 측정한다. 혼합된 슬러리의 pH가 6.55 미만이면, 묽은 수산화칼륨을 사용하여 pH 6.5 내지 6.8로 조절한다.

[0153] 1분 이상, 2시간 이하 동안 기다린 후에, 혼합된 슬러리를 탈기시키고, 초고온(UHT: Ultra-High-Temperature) 처리한 다음, 다음에 기술한 바와 같이 균질화시킨다: 이 공정에 혼합된 슬러리를 공급하기 위해 포지티브 펌프를 사용하고; 혼합된 슬러리를 약 66 내지 71 °C 범위의 온도로 가열한 다음; 혼합된 슬러리를 25.4 내지 38.1 cm Hg로 탈기시키고; 혼합 슬러리를 61 내지 75기압에서 유화시킨 후; 혼합된 슬러리는 대략 10초를 유지하면서, 플레이트/코일 열교환기를 통해 통과시켜 약 120 내지 122 °C 범위의 온도로 가열하고; 혼합된 슬

러리는 대략 5초를 유지하면서, 약 144 내지 147 °C 범위의 온도로 UHT 가열하며; 혼합된 슬러리의 온도를 순간 냉각기를 통해 통과시켜 약 120 내지 122 °C 범위의 온도로 감소시키고; 이를 플레이트/코일 열교환기를 통해 통과시켜 혼합된 슬러리의 온도를 약 71 내지 82 °C의 범위로 감소시키고; 혼합된 슬러리를 약 265 내지 266 대기에서 균질화시킨 다음; 혼합된 슬러리를 16초 이상 동안 약 74 내지 85 °C 범위의 온도에서 보류 관(hold tube)을 통해 통과시키고; 혼합된 슬러리는 이를 대형 열교환기를 통해 통과시켜 약 1 내지 70 °C 범위의 온도로 냉각시킨다.

[0154] 혼합된 슬러리를 약 1 내지 7 °C 범위의 온도로, 바람직하게는 교반하에 저장한다.

[0155] 바람직하게는, 이때, 품질 관리를 위한 적절한 분석 시험을 수행한다. 시험 결과를 근거로 하여, 적절한 양의 희석수(10 내지 38 °C)를 교반하에 혼합된 슬러리에 가한다.

[0156] 비타민 용액 및 향 용액은 별도로 제조한 다음, 혼합된 슬러리에 가한다.

[0157] 비타민 용액은 약 3.94 kg의 물을 교반하에 약 43 내지 66 °C 범위의 온도로 가열한 다음, 하기 성분들을 가하여 제조한다: 아스코르브산, 45% 수산화칼륨, 타우린, 수용성 비타민 예비 혼합물, 콜린 클로라이드 및 L-카르니틴. 이어서, 비타민 용액을 교반하에 혼합된 슬러리에 가한다.

[0158] 향 용액은 마쉬멜로우 및 dulce de leche(단맛)를 교반하에 물 약 7.94 kg에 가하여 제조한다. 본 발명에 따르는 영양 생성물은 인공 마쉬멜로우 향(판매: Firmenich Inc.; Princeton, New Jersey, U.S.A. 소재)과 천연 및 인공 dulce de leche 향(판매: Firmenich Inc.)을 사용하여 제조한다. 그 다음에, 향 용액은 교반하에 혼합된 슬러리에 가한다.

[0159] 경우에 따라, 묽은 수산화칼륨을 혼합된 슬러리에 가하여 멸균 후에, 생성물의 pH를 6.4 내지 7.0의 범위가 되도록 한다. 그 다음에, 완성된 생성물을 적절한 용기에 넣고, 멸균시킨다. 물론, 경우에 따라, 무균 가공을 사용할 수 있다.

[0160] 실시예 VI

[0161] 혈당 반응을 조절하기 위한 영양 생성물의 조성물

[0162] 표 2는 액체 영양 생성물 1,000 kg을 제조하기 위한 물질의 목록을 나타내며, 이는 사람에게 영양소를 제공하지만, 생성되는 인슐린 반응을 제한한다. 이의 제조에 대한 상세한 설명은 다음과 같다.

표 2

[0163] 액체 영양 생성물을 위한 물질 목록

성분	1,000 kg 당 양
물	적당량
말토덱스트린	56 kg
산성 카제인	41.093 kg
프락토스	28 kg
고 올레산 홍화씨유	27.2 kg
말티톨 시럽	16 kg
말티톨	12.632 kg
피베르슐 ^R 2(E)	8.421 kg
카제이네이트	6.043 kg
프락토 올리고당	4.607 kg
대두 다당류	4.3 kg
카놀라유	3.2 kg
인산삼칼슘	2.8 kg
염화마그네슘	2.4 kg
레시틴	1.6 kg
나트륨 시트레이트	1.18 kg
칼륨 시트레이트	1.146 kg
수산화나트륨	1.134 kg
인산마그네슘	1.028 kg

칼슘 HMB 일수화물	5.7 kg
m-이노시톨	914.5 gm
비타민 C	584 gm
염화칼륨	530 gm
콜린 클로라이드	472.1 gm
45% 수산화칼륨	402.5 gm
UTM/TM 예비 혼합물	369.3 gm
인산칼륨	333 gm
카르니틴	230.5 gm
젤란 고무	125 gm
타우린	100.1 gm
비타민 E	99 gm
루테인 에스테르(5%)	92 gm
WSV 예비 혼합물	75.4 gm
비타민 DEK 예비 혼합물	65.34 gm
30% 베타 카로틴	8.9 gm
비타민 A	8.04 gm
피리독신 하이드로클로라이드	3.7 gm
염화크롬	1.22 gm
엽산	0.64 gm
요오드화칼륨	0.20 gm
시아코발라민	0.013 gm

[0164] WSV 예비 혼합물(예비 혼합물 g 당): 니아신아미드 375 mg/g, 칼슘 판토테네이트 242 mg/g, 엽산 9.4 gm/g, 티아민 클로라이드 하이드로클로라이드 62 mg/g, 리보플라빈 48.4 gm/g, 피리독신 하이드로클로라이드 59.6 mg/g, 시아코발라민 165 mcg/g 및 비오틴 7305 mcg/g

[0165] 삭제

[0166] 비타민 DEK 예비 혼합물 (예비 혼합물 g 당): 비타민 D₃ 8130 IU/g, 비타민 E 838 IU/g, 비타민 K₁ 1.42 mg/g

[0167] UTM/TM 예비 혼합물(예비 혼합물 g 당): 아연 45.6 mg/g, 철 54 mg/g, 망간 15.7, 구리 6.39 mg/g, 셀레늄 222 mcg/g, 크롬 301 mcg/g 및 몰리브덴 480 mcg/g

[0168] 본 발명의 당노 액체 영양 생성물은 함께 배합하여, 가열 처리한 다음, 표준화하여, 포장 및 멸균한 네 개의 슬러리를 생성하여 제조한다.

[0169] 탄수화물/무기질 슬러리는 먼저 물 약 82 kg을 교반하에 약 65 내지 약 71 °C의 온도로 가열하여 제조한다. 교반하에, 필요한 양의 칼슘 HMB를 가하고, 5분 동안 교반한다. 필요한 양의 나트륨 시트레이트 및 젤란 고무(판매: the Kelco, Division of Merck and Company Incorporated, San Diego, California, U.S.A.)를 가하고, 5분 동안 교반한다. 필요한 양의 초미량 무기질/미량 무기질(UTM/TM) 예비 혼합물(판매: Fortitech, Schnectady, New York)을 가한다. 슬러리는 녹색색이다. 무기질이 완전히 분산될 때까지 교반을 유지한다. 그 다음에, 교반하에, 필요한 양의 하기 무기질을 가한다: 칼륨 시트레이트, 염화칼륨, 염화크롬, 염화마그네슘 및 요오드화칼륨. 이어서, 먼저 말토덱스트린(판매: Grain Processing Corporation, Muscatine, Iowa, U.S.A.) 및 프럭토스를 강한 교반하에 슬러리에 가하고, 용해시킨다. 교반하에, 필요한 양의 말티톨 분말(판매: Roquette Americ, Inc., Keokuk, Iowa), 말티톨 시럽(판매: ALGroup Lonza, Fair Lawn, New Jersey), 프럭토 올리고당(판매: Golden Technologies Company, Golden, Colorado, U.S.A.) 및 제2 말토덱스트린(판매: Matsutani Chemical Industry Co., Hyogo, Japan; 상표명 Fibersol^R2(E))을 가하고, 완전히 용해될 때까지 잘 교반한다. 필요한 양의 인산삼칼슘 및 인산마그네슘을 교반하에 슬러리에 가한다. 완성된 탄수화물/무기질 슬러리는 다른 슬러리와 혼합될 때까지 12시간 이하 동안 약 65 내지 약 71 °C의 온도에서 교반하에 유지한다.

- [0170] 오일중 섬유 슬러리는 필요한 양의 고 올레산 홍화씨유 및 카놀라유를 합하고, 교반하에 약 40.5 내지 약 49 °C의 온도로 가열하여 제조한다. 교반하에, 필요한 양의 루테인 에스테르(제조원: Cognis; LaGrange, Illinois 소재)를 가한다. 최소 15분 동안 교반한다. 교반하에, 필요한 양의 하기 성분들을 가열된 오일에 가한다: 레시틴(판매: Central Soya Company, Fort Wayne, Indiana), 비타민 D, E, K 예비 혼합물(판매: Vitamins Inc., Chicago, Illinois), 비타민 A, 비타민 E 및 베타-카로틴. 필요한 양의 대두 다당류(판매: Protein Technology International, St. Louis, Missouri)를 가열된 오일에 서서히 분산시킨다. 완성된 오일/섬유 슬러리는 다른 슬러리와 혼합될 때까지 12시간 이하 동안 약 55 내지 65 °C의 온도에서 중간 교반하에 유지한다.
- [0171] 물중 제1 단백질 슬러리는 물 293 kg을 60 내지 65 °C로 가열하여 제조한다. 교반하에, 필요한 양의 20% 칼륨 시트레이트 용액을 가하고, 1분 동안 유지한다. 필요한 양의 산 카제인을 강한 교반하에 가한 다음, 필요한 양의 20% 수산화나트륨을 즉시 가한다. 카제인이 용해될 때까지 교반을 강하게 유지한다. 슬러리를 중간 교반하에, 약 60 내지 65 °C로 유지한다.
- [0172] 물중 제2 단백질 슬러리는 먼저 물 약 77 kg을 교반하에 약 40 °C의 온도로 가열하여 제조한다. 카제이네이트를 가하고, 슬러리는 카제이네이트가 완전히 분산될 때까지 잘 교반한다. 계속 교반하면서, 슬러리는 60 내지 65 °C로 서서히 가온한다. 슬러리는 다른 슬러리와 혼합될 때까지 12시간 이하 동안 유지한다.
- [0173] 배치는 344 kg의 단백질 슬러리 1을 84 kg의 단백질 슬러리 2와 혼합하여 조합한다. 교반하에, 오일/섬유 슬러리 37 kg을 가한다. 1분 이상 동안 기다린 후에, 탄수화물/무기질 슬러리 216 kg을 교반하에 전술한 단계로부터의 혼합된 슬러리에 가하고, 생성된 혼합 슬러리는 약 55 내지 약 60 °C의 온도에서 유지한다. 혼합된 배치의 pH는 1N 수산화칼륨을 사용하여 pH 6.45 내지 6.75로 조절한다.
- [0174] 1분 이상, 2시간 이하 동안 기다린 후에, 혼합된 슬러리를 탈기시키고, 초고온 처리한 다음, 균질화시킨다. 혼합된 슬러리를 약 71 내지 약 82 °C의 온도로 가열하고, 진공하에 탈기시킨다. 그 다음에, 가열된 슬러리를 900 내지 1100 psig에서 단일 단계 균질화기를 통해 유화시킨다. 유화시킨 후, 슬러리는 약 99 내지 약 110 °C로 가열한 다음, 약 5초 동안 약 146 °C의 온도로 가열한다. 슬러리는 순간 냉각기를 통해 통과시켜 약 99 내지 약 110 °C의 온도로 감소시키고, 플레이트 냉각기를 통해 약 71 내지 약 76 °C의 온도로 감소시킨다. 이어서, 슬러리는 3900 내지 4100/400 내지 600 psig에서 균질화시킨다. 슬러리를 16초 동안 약 74 내지 약 80 °C에서 유지한 다음, 1 내지 약 7 °C로 냉각시킨다. 이때, 샘플은 미생물학적 및 분석 시험을 위해 취한다. 혼합물을 교반하에 유지한다.
- [0175] 수용성 비타민(WSV) 용액은 별도로 제조한 다음, 가공된 혼합 슬러리에 가한다.
- [0176] 비타민 용액은 하기의 성분들을 9.4 kg의 물에 교반하에 가하여 제조한다: WSV 예비 혼합물(판매: J.B. Laboratories, Holland, Michigan), 비타민 C, 콜린 클로라이드, L-카르니틴, 타우린, 이노시톨, 엽산, 피리독신 하이드로클로라이드 및 시아노코발라민. 필요한 양의 45% 수산화칼륨 슬러리를 가하여 pH를 7 내지 10으로 만든다.
- [0177] 품질 관리 시험의 분석적 결과를 근거로 하여, 적절한 양의 물을 교반하에 배치에 가하여 목적하는 전체 고체를 성취한다. 또한, 비타민 용액 8.8 kg을 교반하에 희석된 배치에 가한다. 생성물의 pH를 최적의 생성물 안정성을 성취하도록 조절할 수 있다. 그 다음에, 완성된 생성물을 적절한 용기에 놓고, 최종 멸균시킨다.

[0178] 실시예 VII

[0179] 소아용 영양 생성물의 조성물

[0180] 표 3은 본 발명의 소아용 장내 영양 생성물 771 kg을 제조하기 위한 물질의 목록을 나타낸다. 이의 제조에 대한 상세한 설명은 다음과 같다.

표 3a

[0181] 바닐라 소아용 영양 생성물을 위한 물질 목록

성분	771 kg당 양
스톡 PIF 슬러리	
고 올레산 홍화씨유	40.7 kg

대두유	24.4 kg
MCT 유	16.3 kg
레시틴	840.2 g
모노글리세라이드	840.2 g
카라기난	508.9 g
카제이네이트	32.8 kg
스톡 OSV 혼합물	
DEK 예비 혼합물	83.3 g
비타민 A	7.1 g
루테인 에스테르(5%)	92 g
스톡 PIW 슬러리	
물	530 kg
카제이네이트	11.3 kg
유청 단백질	11.9 kg
스톡 MIN 슬러리	
물	18 kg
셀룰로즈 고무	1696 g
칼슘 HMB 일수화물	4.4 kg
염화마그네슘	2.7 kg
염화칼륨	1.0 kg
칼륨 시트레이트	2.7 kg
요오드화칼륨	0.25 g
인산이칼륨	1.45 kg
최종 혼합물	
PIW 슬러리	251 kg
PIN 슬러리	53 kg
MIN 슬러리	12.6 kg
염화나트륨	127.4 g
수크로즈	77.6 kg
인산삼칼슘	2.5 kg
물	167 kg

표 3b

[0182]

스톡 WSV 용액	
물	31.7 kg
칼륨 시트레이트	3.74 g
UTM/TM 예비 혼합물	172.2 g
WSV 예비 혼합물	134.1 g
m-이노시톨	176.7 g
타우린	145.5 g
L-카르니틴	34.92 g
콜린 클로라이드	638.7 g
스톡 아스코르브산 용액	
물	18.6 kg
아스코르브산	550.0 g
45% KOH	341 g
스톡 바닐라 용액	
물	38.5 kg
바닐라 향	4.3 kg

[0183]

DEK 예비 혼합물(예비 혼합물 g 당): 비타민 D₃ 12,100 IU, 비타민 E 523 IU, 비타민 K₁ 0.962 mg

- [0184] UTM/TM 예비 혼합물(예비 혼합물 g 당): 아연 132 mg, 철 147 mg, 망간 10.8 mg, 구리 12.5 mg, 셀레늄 0.328 mg 및 몰리브덴 0.284 mg
- [0185] WSV 예비 혼합물(예비 혼합물 g 당): 니아신아미드 375 mg, d-칼슘 판토테네이트 242 mg, 엽산 8.4 mg, 티아민 클로라이드 하이드로클로라이드 62 mg, 리보플라빈 48.4 mg, 피리독신 하이드로클로라이드 59.6 mg, 시아노코발라민 165.5 mcg 및 비오틴 7305 mcg
- [0186]
- [0187] 스톡 오일 가용성 비타민 혼합물(OSV 혼합물)은 특정량의 DEK 예비 혼합물을 오일 가용성 비타민 54 g을 유지하기에 충분히 큰 광보호 용기인, 스크류 캡으로 중량하여 제조한다. 플라스틱 피펫을 사용하여, 필요한 양의 비타민 A를 DEK 모액에 가한다. 용기는 뚜껑을 적용시키기 전에 질소로 플러시한다.
- [0188] 스톡 지방중 단백질 슬러리(PIF)는 필요한 양의 고 올레산 홍화씨유, 대두유 및 MCT 유를 혼합물 탱크에 가하여 제조한다. 혼합물을 교반하에 40.5 내지 49 °C로 가열한다. 교반하에, 필요한 양의 루테인 에스테르(제조원: American River Nutrition of Hadley, Massachusetts)를 가한다. 최소 15분 동안 교반한다. 유화제, 레시틴(판매: Central Soya; Decatur, Indiana) 및 모노글리세라이드(판매: Quest of Owings Mills, Maryland)를 가하고, 용해되도록 잘 혼합한다. 그 다음에, 모든 OSV 혼합물을 가한다. 비타민의 완전한 전달을 보장하기 위해 용기는 오일 혼합물로 4 내지 5회 세정한다. 카라기난(판매: FMC, Rockland, Maine) 및 카제이네이트를 가한다. 슬러리는 잘 혼합하여 단백질을 분산시킨다. PIF 슬러리는 사용할 때까지 중간 교반하에 60 내지 65 °C에서 6시간까지 유지한다.
- [0189] 스톡 수중 단백질 슬러리(PIW)는 필요한 양의 물을 혼합물 탱크에 가하여 제조한다. 물은 중간 교반하에 유지하고, 76 내지 82 °C로 만든다. 필요한 양의 카제이네이트를 강한 교반하에 물에 가하고, 단백질이 완전히 분산될 때까지 강하게 혼합한다. 단백질 슬러리는 가공 전에 54 내지 60 °C로 냉각시킨다. 냉각시, 필요한 양의 유청 단백질을 가하고, 완전 분산되고/용해될 때까지 혼합한다. PIW 슬러리는 사용할 때까지 54 내지 60 °C에서 2시간까지 유지한다.
- [0190] 스톡 무기질 용액(MIN)은 는 필요한 양의 물을 혼합물 탱크에 가하고, 60 내지 68 °C로 가열하여 제조한다. 셀룰로즈 고무 혼합물(판매: FMC, Newark, Delaware)을 물에 가하고, 가공 전에 중간 교반하에 최소 5분 동안 유지한다. 칼슘 HMB를 가하고, 가공 전에 최소 5분 동안 교반한다. 무기질 염 염화마그네슘, 염화칼륨, 칼륨 시트레이트, 요오드화칼륨 및 인산이칼륨을 각 부가 사이에 혼합하면서 한 번에 하나를 가하여 무기질이 용해되도록 보장한다. 완성된 MIN 용액은 사용할 때까지 약한 교반 내지 중간 교반하에 54 내지 65 °C에서 유지한다.
- [0191] 최종 혼합물은 특정량의 PIW 슬러리를 혼합물 탱크에 가하고, 교반하에 54 내지 60 °C로 가열하여 제조한다. 특정량의 PIF 슬러리를 탱크에 가하고, 잘 혼합한다. 특정량의 MIN 용액을 혼합물에 가하고, 잘 혼합한다. 특정량의 염화나트륨을 혼합물에 가하고, 잘 혼합한다. 특정량의 수크로스를 혼합물에 가하고, 용해되도록 잘 혼합한다. 인산삼칼슘을 혼합물에 가하고, 분산되도록 잘 혼합한다. 특정량의 부가의 물을 혼합물에 가하고, 잘 혼합한다. 완성된 최종 혼합물은 54 내지 60 °C에서 계속되는 교반하에 유지한다. 경우에 따라, pH는 1N KOH를 사용하여 6.45 내지 6.8로 조절한다.
- [0192] 1분 이상, 2시간 이하 동안 기다린 후에, 혼합된 슬러리를 탈기시키고, 초고온 처리한 다음, 균질화시킨다. 혼합된 슬러리를 약 68 내지 약 74 °C의 온도로 가열하고, 진공하에 탈기시킨다. 그 다음에, 가열된 슬러리를 900 내지 1100 psig에서 유화시킨다. 유화시킨 후, 슬러리는 약 120 내지 약 122 °C로 가열한 다음, 약 149 내지 약 150 °C의 온도로 가열한다. 슬러리는 순간 냉각기를 통해 통과시켜 약 120 내지 약 122 °C의 온도로 감소시키고, 플레이트 냉각기를 통해 약 74 내지 약 79 °C의 온도로 감소시킨다. 이어서, 슬러리는 3900 내지 4100/400 내지 600 psig에서 균질화시킨다. 슬러리를 16초 동안 약 74 내지 약 85 °C에서 유지한 다음, 1 내지 약 6 °C로 냉각시킨다. 이때, 샘플은 미생물학적 및 분석 시험을 위해 취한다. 혼합물을 교반하에 유지한다.
- [0193] 표준화 공정은 다음과 같다. 스톡 비타민 용액(WSV)은 혼합 탱크에서 특정량의 물을 48 내지 60 °C로 가열하여 제조한다. 칼륨 시트레이트, UTM/TM 예비 혼합물(판매: Fortitech of Schenectady, New York), WSV 예비 혼합물, m-이노시톨, 타우린, L-카르니틴 및 콜린 클로라이드를 각각 나열된 순서대로 용액에 가하고, 각 성분이 용해되거나 분산되도록 잘 혼합한다. 비타민 용액 14.2 kg을 가공된 혼합 탱크에 가한다.
- [0194] 스톡 바닐라 용액은 특정량의 물을 혼합물 탱크에 가하여 제조한다. 특정량의 바닐라(판매: Givaudan Roure, Cincinnati, Ohio)를 물에 가하고, 잘 혼합한다. 바닐라 용액 18.5 kg을 가공된 혼합 탱크에 가하고, 잘 혼합

한다.

[0195] 스탁 아스코르브산 용액은 필요한 양의 물을 혼합물 탱크에 가하여 제조한다. 특정량의 아스코르브산을 가하고, 용해되도록 잘 혼합한다. 특정량의 45% KOH를 가하고, 잘 혼합한다. 아스코르브산 용액 8.4 kg을 혼합 탱크에 가하고, 잘 혼합한다.

[0196] 최종 혼합물은 물 92.5 kg을 가하여 최종 전체 고체로 희석하고, 잘 혼합한다. 생성물을 최종(레토르트) 멸균 전에 적절한 용기에 충전시킨다.

[0197] 실시예 VIII

[0198] 완전한 영양 보충물의 조성물

[0199] 표 4는 통상의 바닐라 향 식사 대용 액체 1,000 kg을 제조하기 위한 물질 목록이다. 이의 제조에 대한 상세한 설명은 다음과 같다.

표 4

[0200] 바닐라 액체 영양 생성물의 물질 목록

성분	1,000 kg당 양
물	적당량
옥수수 시럽	33 kg
말토덱스트린	28 kg
수크로즈	19.4 kg
카제이네이트	8.7 kg
칼슘 HMB 일수화물	5.7 kg
고 올레산 홍화씨유	4.1 kg
카놀라유	4.1 kg
대두 단백질	3.7 kg
유청 단백질	3.2 kg
카제이네이트	2.9 kg
옥수수 오일	2.0 kg
인산삼칼슘	1.4 kg
칼륨 시트레이트	1.3 kg
인산마그네슘	952 gm
레시틴	658 gm
염화마그네슘	558 gm
바닐라 향	544 gm
염화나트륨	272 gm
카라기난	227 gm
콜린 클로라이드	218 gm
UTM/TM 예비 혼합물	165 gm
염화칼륨	146 gm
아스코르브산	145 gm
나트륨 시트레이트	119 gm
수산화칼륨	104 gm
루테인(5%)	46 gm
WSV 예비 혼합물	33 gm
비타민 DEK 예비 혼합물	29 gm
비타민 A	3.7 gm
요오드화칼륨	86 mcg

[0201] WSV 예비 혼합물(예비 혼합물 g 당): 니아신아미드 375 mg/g, 칼슘 판토텐네이트 242 mg/g, 엽산 8.4 gm/g, 티아민 클로라이드 하이드로클로라이드 62 mg/g, 리보플라빈 48.4 gm/g, 피리독신 하이드로클로라이드 59.6 mg/g,

시아노코발라민 165 mcg/g 및 비오틴 7305 mcg/g

[0202] 비타민 DEK 예비 혼합물 (예비 혼합물 g 당): 비타민 D₃ 8130 IU/g, 비타민 E 838 IU/g, 비타민 K₁ 1.42 mg/g

[0203] UTM/TM 예비 혼합물(예비 혼합물 g 당): 아연 45.6 mg/g, 철 54 mg/g, 망간 15.7, 구리 6.39 mg/g, 셀레늄 222 mcg/g, 크롬 301 mcg/g 및 몰리브덴 480 mcg/g

[0204] 본 발명의 액체 식사 대용 생성물은 함께 배합하여, 가열 처리한 다음, 표준화하여, 포장 및 멸균한 세 개의 슬러리를 생성하여 제조한다.

[0205] 탄수화물/무기질 슬러리는 먼저 필요한 양의 물을 교반하에 약 65 내지 약 71 °C의 온도로 가열하여 제조한다. 필요한 양의 칼슘 HMB를 가하고, 최소 5분 동안 교반한다. 교반하에, 필요한 양의 칼륨 시트레이트 및 초미량 무기질/미량 무기질(UTM/TM) 예비 혼합물(판매: Fortitech, Schnectady, New York)을 가한다. 슬러리는 녹색이다. 무기질이 완전히 분산될 때까지 교반을 유지한다. 그 다음에, 교반하에, 필요한 양의 하기 무기질을 가한다: 염화마그네슘, 염화칼륨, 염화나트륨, 나트륨 시트레이트, 요오드화칼륨, 인산마그네슘 및 인산삼칼슘. 이어서, 먼저 말토크스트린(판매: Grain Processing Corporation, Muscatine, Iowa, U.S.A.), 수크로즈 및 옥수수 시럽을 강한 교반하에 슬러리에 가하고, 용해시킨다. 완성된 탄수화물/무기질 슬러리는 다른 슬러리와 혼합될 때까지 8시간 이하 동안 약 65 내지 약 71 °C의 온도에서 교반하에 유지한다.

[0206] 지방중 단백질 슬러리(PIF)는 필요한 양의 고 올레산 홍화씨유 및 카놀라유를 합하고, 교반하에 약 40.5 내지 약 49 °C의 온도로 가열하여 제조한다. 교반하에, 필요한 양의 루테인(제조원: Foods of Des Moines, Iowa)을 가한다. 최소 15분 동안 교반한다. 하기의 성분들을 가열된 오일에 가한다: 레시틴(판매: Central Soya Company; Fort Wayne, Indiana), 비타민 A 및 비타민 D, E, K 예비 혼합물(판매: Vitamins Inc., Chicago, Illinois). 필요한 양의 카라기난을 필요한 양의 유청 단백질과 무수 혼합하고, 교반된 지질 혼합물에 가하여, 최소 10분 동안 교반한다. 적절한 혼합을 보장하기 위해 필요한 양의 대두 단백질을 혼합물에 서서히 가한다. 완성된 오일/단백질 슬러리는 다른 슬러리와 혼합할 때까지 중간 교반하에 약 40 내지 약 43 °C에서 2시간 이하 동안 유지한다.

[0207] 수중 단백질 슬러리는 먼저 대략 필요한 양의 물을 교반하에 약 40 °C의 온도로 가열하여 제조한다. 카제이네이트를 가하고, 슬러리는 카제이네이트가 완전히 분산될 때까지 잘 교반한다. 계속해서 교반하면서, 슬러리는 60 내지 65 °C로 서서히 가온한다. 슬러리는 다른 슬러리와 혼합할 때까지 12시간 이하 동안 유지한다.

[0208] 배치는 필요한 양의 단백질 슬러리와 필요한 양의 탄수화물/무기질 슬러리를 혼합하여 조합하고, 10분 동안 교반시킨다. 교반하에, 필요한 양의 오일/단백질 슬러리를 가하고, 10분 이상 동안 교반한다. 혼합된 배치의 pH는 1N 수산화칼륨을 사용하여 pH 6.66 내지 6.75로 조절한다.

[0209] 1분 이상, 2시간 이하 동안 기다린 후에, 혼합된 슬러리를 탈기시키고, 초고온 처리한 다음, 균질화시킨다. 혼합된 슬러리를 약 71 내지 약 82 °C의 온도로 가열하고, 진공하에 탈기시킨다. 그 다음에, 가열된 슬러리를 900 내지 1100 psig에서 단일 단계 균질화기를 통해 유화시킨다. 유화시킨 후, 슬러리는 약 99 내지 약 110 °C로 가열한 다음, 약 5초 동안 약 146 °C의 온도로 가열한다. 슬러리는 순간 냉각기를 통해 통과시켜 약 99 내지 약 110 °C의 온도로 감소시키고, 플레이트 냉각기를 통해 약 71 내지 약 76 °C의 온도로 감소시킨다. 이어서, 슬러리는 3900 내지 4100/400 내지 600 psig에서 균질화시킨다. 슬러리를 16초 동안 약 74 내지 약 80 °C에서 유지한 다음, 약 1 내지 약 7 °C로 냉각시킨다. 이때, 샘플은 미생물학적 및 분석 시험을 위해 취한다. 혼합물을 교반하에 유지한다.

[0210] 수용성 비타민(WSV) 용액은 별도로 제조한 다음, 가공된 혼합 슬러리에 가한다.

[0211] 비타민 용액은 하기의 성분들을 9.4 kg의 물에 교반하에 가하여 제조한다: WSV 예비 혼합물(판매: J.B. Laboratories, Holland, Michigan), 비타민 C, 콜린 클로라이드, L-카르니틴, 타우린, 이노시톨, 엽산, 피리독신 하이드로클로라이드 및 시아노코발라민. 필요한 양의 45% 수산화칼륨 슬러리를 가하여 pH를 7 내지 10으로 만든다.

[0212] 품질 관리 시험의 분석 결과를 근거로 하여, 적절한 양의 물을 교반하에 배치에 가하여 목적하는 전체 고체를 성취한다. 또한, 비타민 용액 8.8 kg을 교반하에 희석된 배치에 가한다.

[0213] 생성물의 pH를 최적의 생성물 안정성을 성취하도록 조절할 수 있다. 그 다음에, 완성된 생성물을 적절한 용기

에 넣고, 최종 멸균시킨다.

[0214] 실시예 IX

[0215] 음료 조성물

[0216] 즉시 마실 수 있는 음료의 배치 1000 kg을 제조하기 위하여, 물 987.31 kg을 교반기가 장착된 용기에 넣는다. 주위 온도에서, 필요한 양의 칼륨 벤조에이트를 가하고, 완전히 용해시킨다. 필요한 양의 칼슘 HMB를 가하고, 완전히 용해시킨다. 이어서, 하기의 성분들을 나열된 순서로 가한다. 각각의 성분은 다음 성분을 가하기 전에 완전히 용해시킨다.

표 5

[0217] 즉시 음용 가능한 음료

칼륨 벤조에이트	0.30 kg
칼슘 HMB 일수화물	5.7 kg
칼륨 시트레이트	0.15 kg
시트르산	2.89 kg
락트산	1.41 kg
아스파르탐	0.55 kg
칼슘 글리세로포스페이트	6.06 kg
착색제	0.0019 kg
천연 및 인공 향	1.00 kg
아스코르브산	0.33 kg

[0218] 아스코르브산은 12-oz 알루미늄 캔으로 충전하기 직전에 가한다. 음료는 알루미늄 캔으로 충전하기 전에 탄산 화시킬 수 있다. 용액을 탈기시킨 다음, "카보-쿨러(carbo-cooler)"로 옮기고, 여기서 냉각시켜, 대략 2.5 용 적의 이산화탄소로 탄산화시킨다.

[0219] 실시예 X

[0220] 전해질 대용 생성물의 조성물

[0221] 하기의 실시예는 즉시 음용 가능한 재수화 용액을 제조하는 방법을 설명하고 있다. ORS는 표 6에 나열된 조성을 갖는다.

표 6

[0222] 즉시 음용 가능한 재수화 용액

성분	454 kg 당 양
물	437 kg
덱스트로즈, 일수화물	10 kg
프럭토즈	2.4 kg
시트르산	1.2 kg
염화나트륨	0.937 kg
칼륨 시트레이트	1 kg
나트륨 시트레이트	492.0 g
칼슘 HMB 일수화물	5.7 kg
과일향	226.8 g
아연 글루코네이트	80.62 g
수크랄로즈	179.2 g
아세살팜 칼륨	38.1 g
옐로우 #6	7.2 g

[0223] 필요한 양의 여과된 물을 칭량하고, 혼합물 탱크에 가한다. 물을 중간 교반하에 43 내지 54 °C로 가열한다. 중간 교반을 유지하면서, 칼슘 HMB를 가하고, 최소 5분 동안 혼합한다. 계속해서 중간 교반을 하면서, 필요한 양의 텍스트로즈를 가한다. 용해될 때까지 교반한다. 필요한 양의 프럭토스를 가한다. 용해될 때까지 교반한다. 필요한 양의 하기의 성분들을 나열된 순서로 텍스트로즈/프럭토스 혼합물에 가하고, 용해될 때까지 교반한다: 아연 글루코네이트, 나트륨 시트레이트, 염화나트륨, 칼륨 시트레이트 및 시트르산. 필요한 양의 수크랄로즈(판매: McNeil Speciality Products Company, New Brunswick, New Jersey) 및 아세설팜 칼륨(판매: Sunett^R by Hoechst Food Ingredients, Somerset, New Jersey)을 가하고, 용해될 때까지 교반한다. 용해될 때까지 옐로우 #6 및 과일 편지향을 배치에 가한다. 혼합물을 1.1 내지 7.2 °C로 냉각시키고, 약하게 교반하면서 유지한다. 필요한 수의 1 ℓ 플라스틱 병을 채우고, 병 입구에 호일 열봉합을 적용시켜, 식품 등급 무균 표준으로 레토르트 처리한다.

[0224] 또는, 냉각된 혼합물을 밀봉 가능한 동결성 포장재에 캡슐화시켜, 열봉합에 의한 것과 같이 밀봉한다. 단일 용량의 재수화 용액을 밀봉한 동결 가능한 파우치에 포장한다. 본 발명의 실행시 사용될 수 있는 다양한 형태의 포장재(예컨대, 전통적인 냉동고 팝으로 사용될 수 있는)는 당해 분야의 숙련가가 용이하게 알 수 있을 것이다. 포장재는 바람직하게는 이의 외부 표면에 표식(예: 생성물 확인, 성분 등)을 할 수 있도록 하는 형태이다. 재수화 제형은 바람직하게는 이 상태에서 이의 다중 유닛으로 선적하고 저장한다. 다중 유닛 또는 냉동고 팝은 시판을 목적으로 함께 포장하도록 시도되고 있다.

[0225] 투여 전에, 액체 재수화 용액의 패키지를 동결시킨다. 동결에 이어서, 패키지를 개봉하고, 이의 내용물을 먹는다. 동결된 재수화 제형은 통상 주위 온도에서 투여되므로, 각 패키지에 함유된 재수화 액체의 양은 바람직하게는 동결 상태로 여전히 유지하면서, 이의 전체를 소비할 수 있는 양이다. 바람직하게는, 20 내지 35 온스, 보다 바람직하게는 2.0 내지 2.5 온스/패키지이다. 특히 바람직한 양태에서, 2.1 온스의 멸균 재수화 용액을 직사각형, 예를 들면, 1" x 8", 동결 가능한 포장재에 캡슐화시킨다. 투명한 플라스틱 포장재가 바람직하다.

도면의 간단한 설명

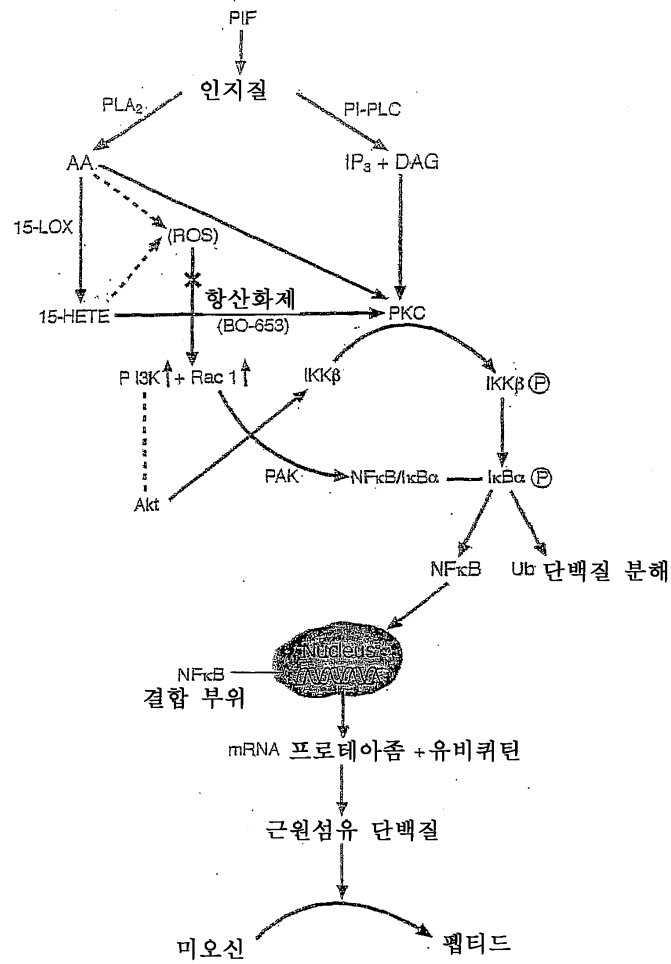
- [0029] 도 1은 PIF 유도된 프로테아좀 활성화에 관련된 골격근의 잠재적인 세포내 과정을 설명하는 도식을 나타낸다.
- [0030] 도 2는 MAC16 종양을 포함하는 마우스에서 체중(A) 및 종양 용적(B)에 대한 HMB의 효과에 대한 용량-반응 곡선을 나타낸다. HMB(PBS 중)는 0.05(●), 0.125(○) 및 0.25 g/kg(X)의 농도로 하루 섭생시 유동식에 의해 경구 투여된다. 대조용 마우스는 PBS만 투여한다(◆). 제시된 결과는 평균 ± SEM(이때, n은 20이다)이다.
- [0031] 도 3은 MAC16 종양을 포함하는 마우스의 체중에 대한 PBS 대조용(●)과 함께, HMB(0.25 g/kg; ■), EPA(0.6 g/kg; X) 및 배합물(○)의 효과를 나타낸다. 제시된 결과는 평균 ± SEM(이때, n은 20이다)이다.
- [0032] 도 4는 EPA(0.6 g/kg), HMB(0.25 g/kg) 또는 이의 혼합물로 3일 동안 처리된 MAC16 종양을 포함하는 마우스의 가자미근의 중량(A) 및 가자미근에서의 단백질 분해 속도(B)를 나타낸다.
- [0033] 도 5는 MAC16 종양을 포함하고 3일 동안 처리된 마우스의 비복근에서 '키모트립신-유사' 효소 활성으로서 측정되는 프로테아좀 작용 활성화에 대한 HMB 및 EPA의 효과를 나타낸다.
- [0034] 도 6은 PBS(대조용), HMB(0.25 g/kg), EPA(0.6 g/kg) 또는 이의 배합물로 3일 동안 처리된 마우스의 비복근에서, 웨스턴 블롯팅에 의해 감지되는, 프로테아좀 20S α-서브유닛(A) 및 β-서브유닛(B)의 발현을 나타낸다. 블롯(n=6)의 밀도측정 분석(densitometric analysis)이 제시되어 있다. 대조용(암색 바아), HMB(개방 바아), EPA(해시 바아(hashed bar)) 및 배합물(도트 바아).
- [0035] 도 7은 PBS(대조용), HMB(0.25 g/kg), EPA(0.6 g/kg) 또는 배합물(HMB+EPA)로 3일 동안 처리된 마우스의 비복근에서, 웨스턴 블롯팅에 의해 감지되는, 프로테아좀 19S 서브유닛, MSS1(A) 및 p42(B)의 발현을 나타낸다. 블롯(n=6)의 밀도측정 분석이 제시되어 있다.
- [0036] 도 8은 PBS(대조용), HMB(0.25 g/kg), EPA(0.6 g/kg) 또는 혼합물(HMB+EPA)로 3일 동안 처리된 마우스의 비복근에서, 웨스턴 블롯팅에 의해 감지되는, E2_{14K}의 발현을 나타낸다. 블롯(n=6)의 밀도측정 분석이 제시되어 있다.

- [0037] 도 9(A)는 부재(×) 또는, 50 μ M EPA(□) 또는 25 μ M(○) 또는 50 μ M(●) HMB의 존재하에 C₂-C₁₂ 근관중 전체 단백질 분해에 대한 PIF의 효과를 나타낸다. 측정은 PIF를 부가한 지 24시간 후에 수행하며, 평균 $\pm$ SEM(이때, n은 9이다)으로 제시된다. 1(B)는 EPA(50 μ M) 또는 HMB(25 또는 50 μ M)의 부재 또는 존재하에 PIF로 처리된 마우스의 근관의 가용성 추출물의 키모트립틱 활성을 나타낸다. 기호는 (A)에서와 동일하다. 결과는 평균 $\pm$ SEM(이때, n은 9이다)이다.
- [0038] 도 10은 20S 프로테아좀 α -서브유닛(A), β -서브유닛(B) 및 p42(C)의 PIF-유도에 대한 EPA 및 HMB의 효과를 나타낸다. 악틴 부하 대조용은 (D)로 제시되어 있다. 4.2 nM(레인 B, E, H 및 K) 또는 10 nM(레인 C, F, I 및 L)의 PIF의 농도에서 PIF 단독(레인 A-C)으로 또는, 50 μ M EPA(레인 D-F), 50 μ M HMB(레인 G-I) 또는 25 μ M HMB(레인 J-L)의 존재하에 PIF로 처리한 지 24시간 후에, C₂-C₁₂ 근관의 가용성 추출물의 웨스턴 블롯. 대조용 배양물에 PBS(레인 A), 50 μ M EPA(레인 D), 50 μ M HMB(레인 G) 또는 25 μ M HMB(레인 J)를 가한다. 제시된 블롯은 3개의 별도의 실험을 나타낸다.
- [0039] 도 11은 마우스의 근관에서 세포질(A) 및 막-결합(B) PKC α 에 대한 PIF의 효과의 웨스턴 블롯을 나타낸다. 세포는 4.2 nM(레인 B, E, H 및 K) 또는 10 nM(레인 C, F, I 및 L) PIF에서 PIF 단독(레인 A-C)으로 또는, 50 μ M EPA(레인 D-F), 50 μ M HMB(레인 G-I) 또는 25 μ M HMB(레인 J-L)의 존재하에 PIF로 처리한다. 대조용 세포에 PBS(레인 A), 50 μ M EPA(레인 D), 50 μ M HMB(레인 G) 또는 25 μ M HMB(레인 J)를 가한다. 제시된 블롯은 3개의 별도의 실험을 나타낸다.
- [0040] 도 12는 4.2 nM(레인 B, E, H 및 K) 또는 10 nM(레인 C, F, I 및 L)의 PIF 농도에서 PIF 단독(레인 A-C)으로 또는, 50 μ M EPA(레인 D-F), 50 μ M HMB(레인 G-I) 또는 25 μ M HMB(레인 J-L)의 존재하에 PIF로 처리한 마우스 근관의 가용성 추출물중 전체 ERK 1/2(p44 및 p42)(A) 및 활성 물질(포스포릴화) ERK 1/2(B)의 웨스턴 블롯을 나타낸다. 대조용 세포에 PBS(레인 A), 50 μ M EPA(레인 D), 50 μ M HMB(레인 G) 또는 25 μ M HMB(레인 J)를 가한다. 제시된 블롯은 3개의 별도의 실험을 나타낸다.
- [0041] 도 13은 웨스턴 블롯팅으로 측정되는, I κ B α 의 사이토솔 수준에 대한 30분 동안의 C₂-C₁₂ 근관의 노출(A) 및 EMSA에 의해 측정되는 바와 같은, DNA에 결합되는 NF- κ B의 활성화(B 및 C)의 효과를 나타낸다. 밀도측정 분석은 3개의 반복되는 블롯 또는 EMSA의 평균이다. (A) 근관은 0(레인 A 및 F), 2.1(레인 B 및 G), 4.2(레인 C 및 H), 10.5(레인 D 및 I) 또는 16.8 nM PIF(레인 E 및 J)의 농도에서 PIF 단독(레인 A-E)으로 또는, 50 μ M HMB의 존재하에 PIF로 처리하였다. (B) 및 (C)에서, 근관은 25 μ M HMB(B) 또는 50 μ M HMB(C)의 부재(암색 바아) 또는 존재(개방 바아)하에 0, 2.1, 4.2, 10.5 또는 16.8 nM PIF로 처리하였다.

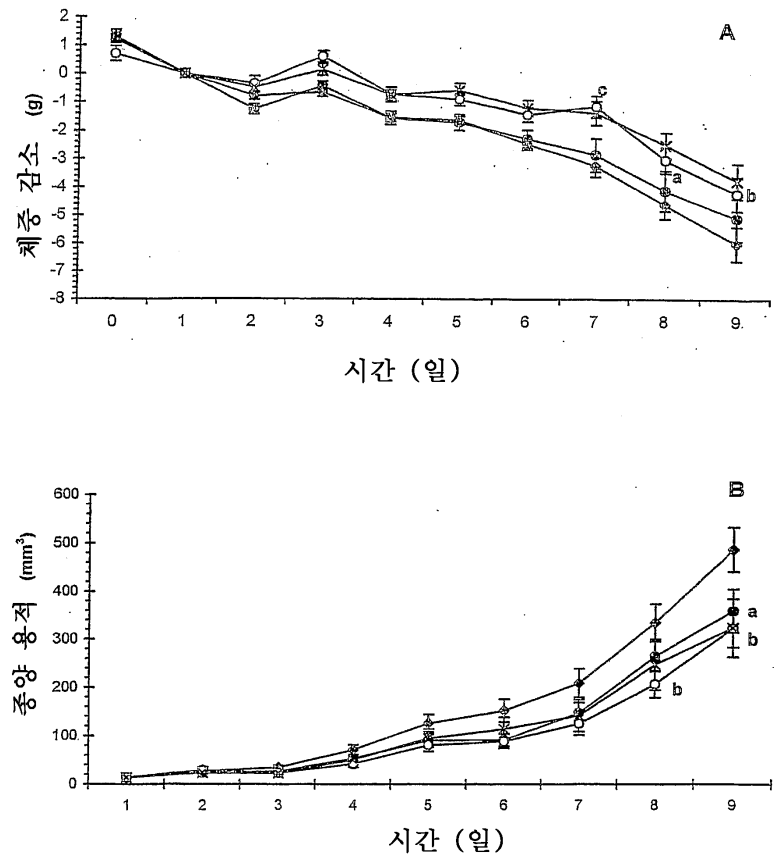
도면

도면1

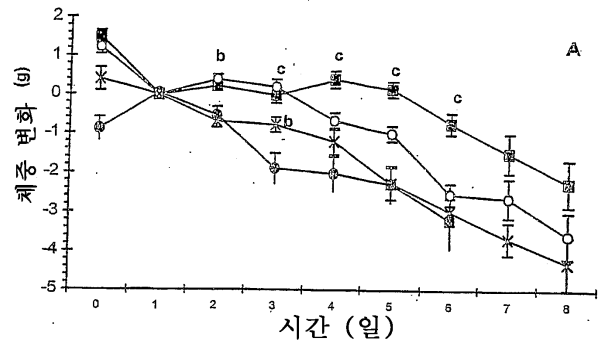
PIF 유도된 프로테아좀 활성화에
관련된 골격근의 잠재적 세포내 과정



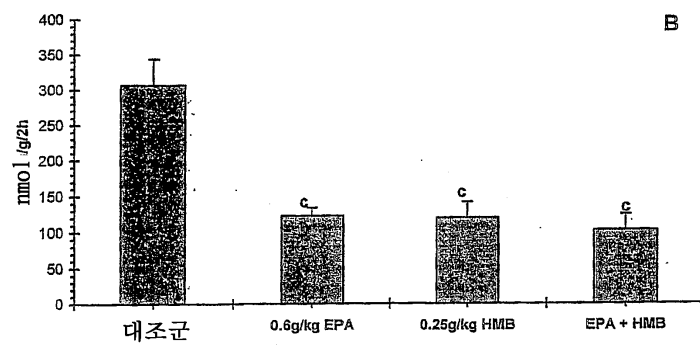
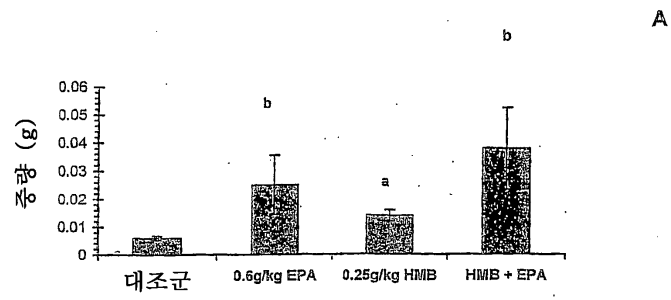
도면2



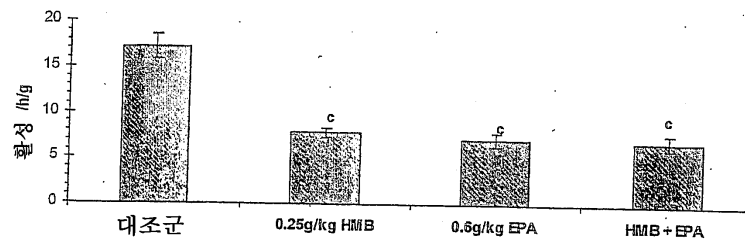
도면3



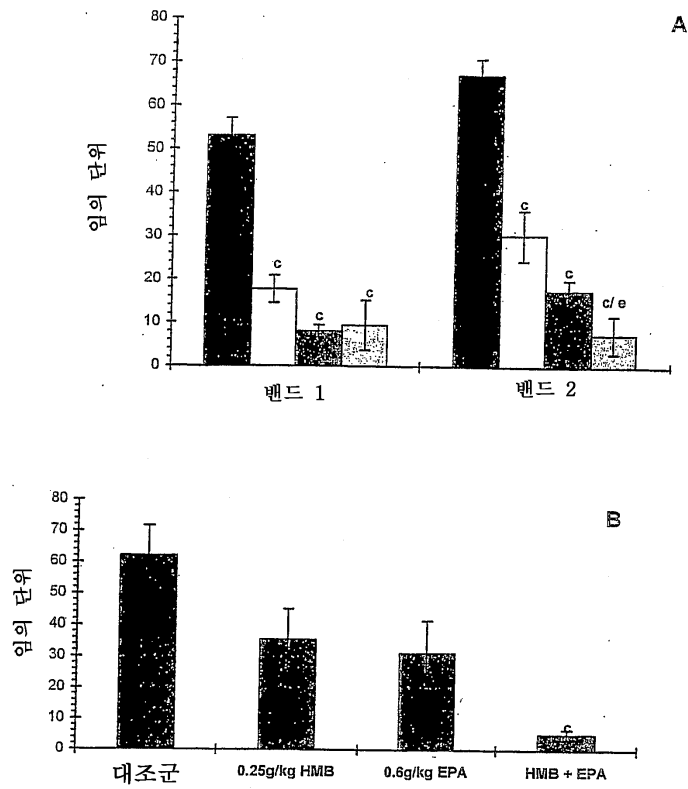
도면4



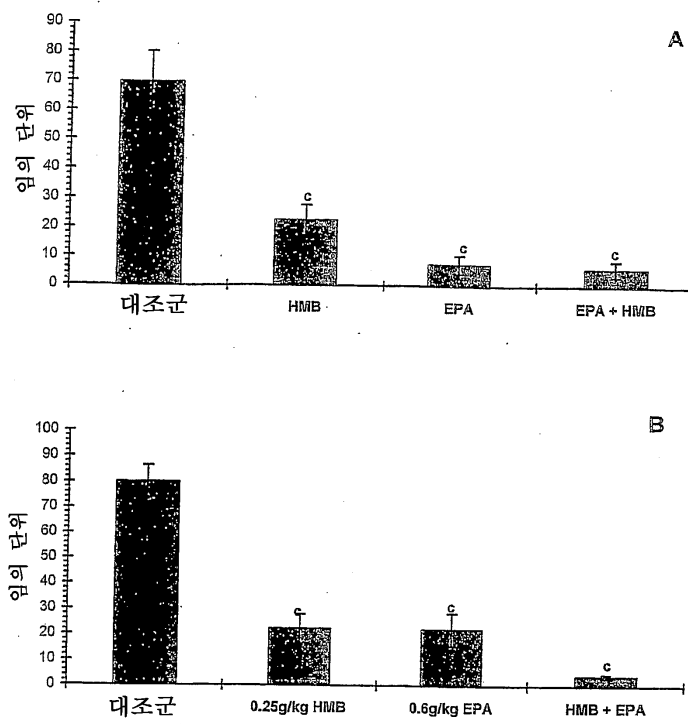
도면5



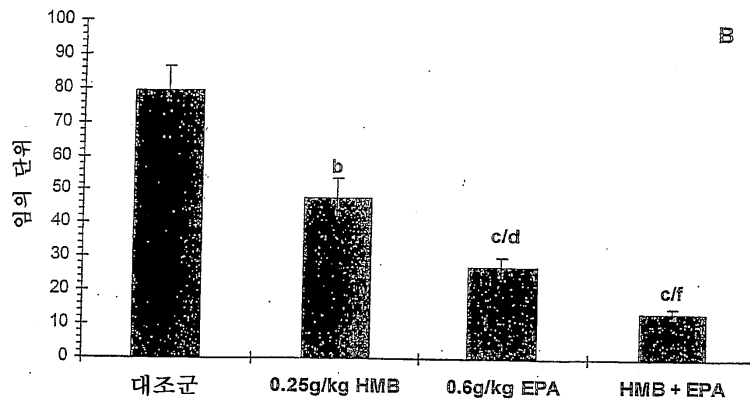
도면6



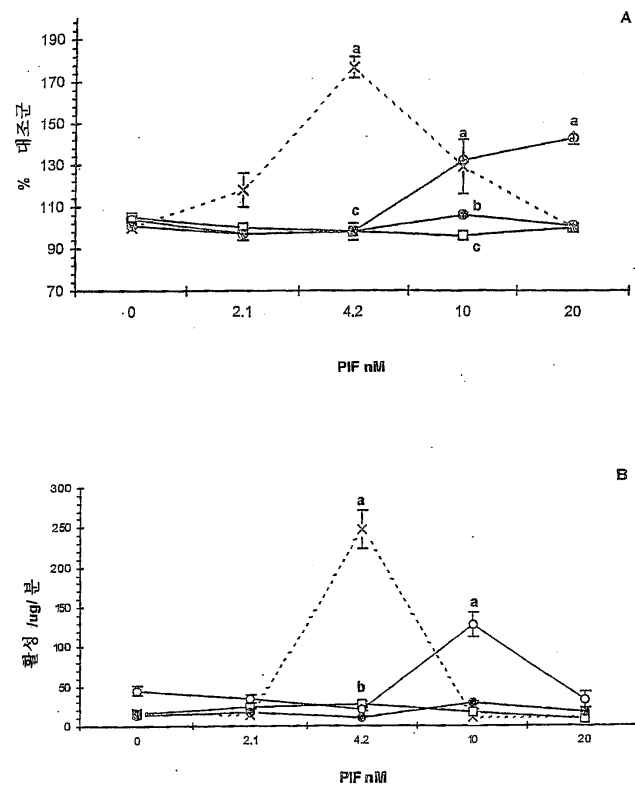
도면7



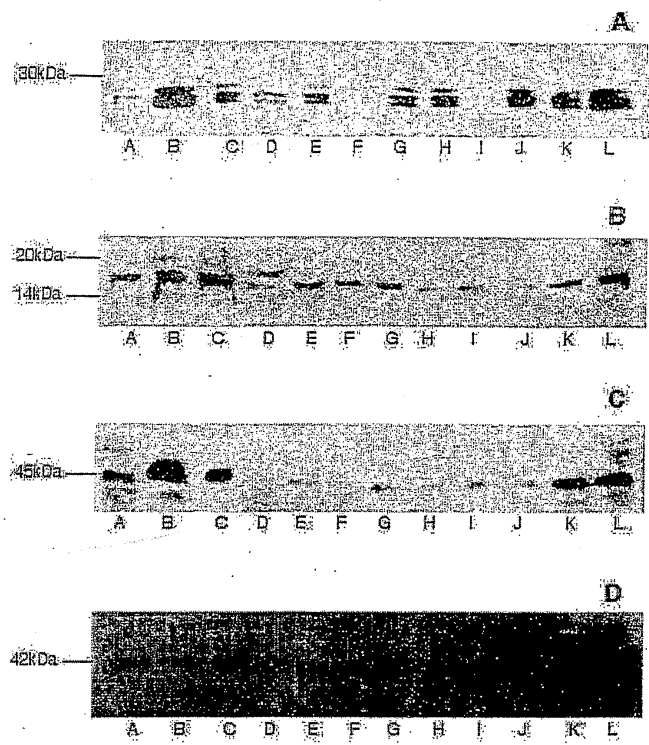
도면8



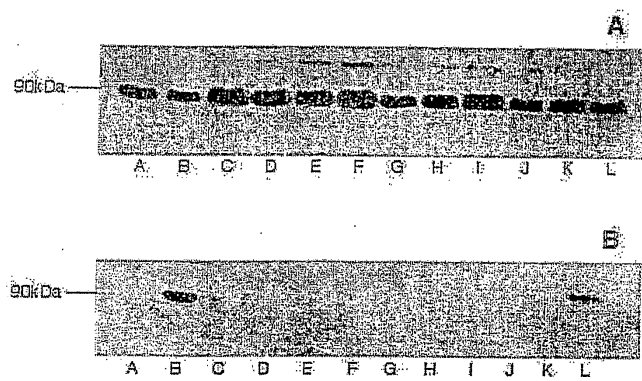
도면9



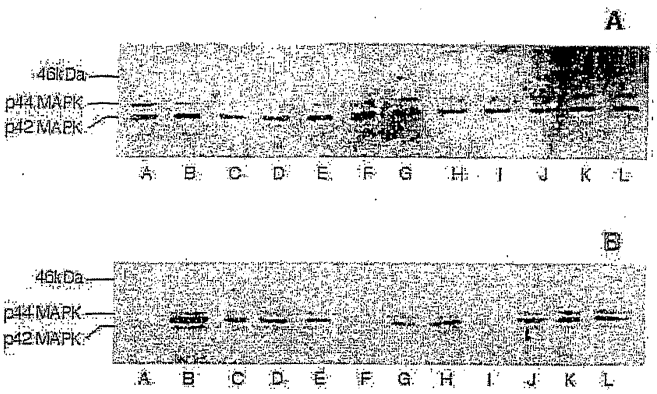
도면10



도면11



도면12



도면13

