(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0106331
(43) 공개일자 2015년09월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/198 (2006.01) *A23L 1/29* (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/198 (2013.01)
A23L 1/29 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0014920
(22) 출원일자 2015년01월30일
심사청구일자 2015년01월30일
(30) 우선권주장
1020140027774 2014년03월10일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이광원
경기 성남시 분당구 양현로 220, 1104동 1901호 (이매동, 이매촌 삼환아파트)
홍충의
서울 성북구 안암로 145, CJ 식품안전관 203호 (안암동5가, 고려대학교이과대학)
오준구
경남 거제시 해명로 52, 108동 1302호 (수월동, 거제자이)
(74) 대리인
김순웅

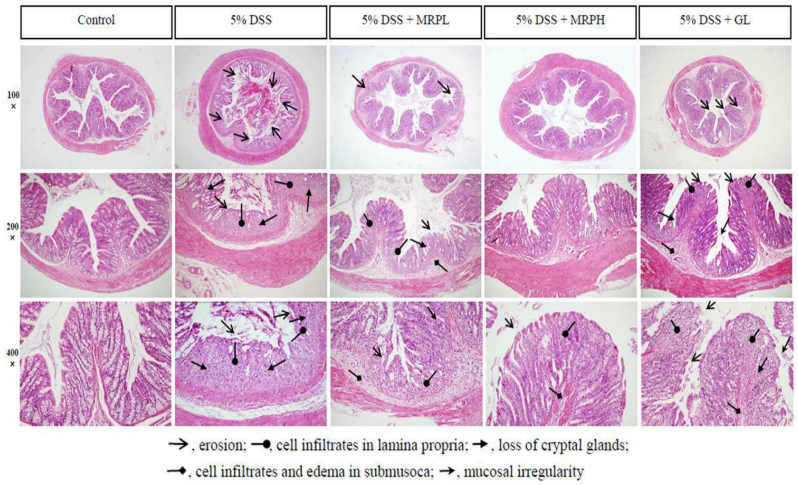
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **마이얄 반응 생성물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 마이얄 반응 생성물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 마이얄 반응 생성물은 인간 장내 세포에서 염증 반응을 억제하고, 대장염 동물모델에서 체중 감소, 결장의 단축, 직장 출혈, 설사성 배변 횟수 증가 및 장 조직의 붕괴를 정상 수준으로 회복시키는 등 염증성 장질환을 예방 및 치료하는 우수한 효과를 가지고 있어, 염증성 장질환의 예방, 개선, 또는 치료를 위한 의약품 및 건강기능식품 등에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61K 31/70 (2013.01)
A61K 9/0053 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

마이얄 반응 생성물(Maillard reaction product)을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 마이얄 반응 생성물은 아미노산 및 당의 반응에 의해 생성되는 것을 특징으로 하는, 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 아미노산은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 트레오닌, 세린, 시스테인, 메티오닌, 아스파르트산, 아스파라긴, 글루탐산, 글루타민, 리신, 아르기닌, 히스티딘, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판 및 프롤린으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 당은 글루코오스, 프룩토오스, 갈락토오스, 수크로오스, 말토오스, 락토오스 및 자일로오스로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 염증성 장질환은 크론병(Chron's disease), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 장형 베체트병, 장결핵 및 장염으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

마이얄 반응 생성물(Maillard reaction product)을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 마이얄 반응 생성물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 염증성 장질환(Inflammatory Bowel Disease, IBD)이란 장에서 발생하는 원인 불명의 만성 또는 급성 염증에 의

해 일어나는 질병을 말하며, 원인은 아직까지 정확하게 알려지지 않고 있으나 이 질환들은 유전 및 환경적 영향을 받으며 면역과 관련된 염증이 매개 되어 있다고 알려져 있다(이형주 외 4명, Functional food 기능성식품학, 수학사, 2011, p. 126-127).

[0003] 염증성 장질환은 크게 궤양성 장질환(Ulcerative colitis)과 크론병(Crohn's disease)으로 분류된다. 상기 질환의 발병 요인 중 하나로 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)의 발현 증가 때문이라는 연구 보고가 있으며, 장내 항상성 유지를 위한 사이토카인 발현과 면역체계의 변화가 염증성 장질환 발병의 중요 요인으로 알려져 있다(PAN, Min-Hsiung; LAI, Ching-Shu; HO, Chi-Tang. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. Food & function, 2010, 1(1): p. 15-31).

[0004] 염증성 장질환은 서양에서는 흔한 병이지만 아시아 지역에는 드문 질병으로 인식되어 왔으나 최근에는 점차 서구화되어가는 생활습관에 의해 동양에서도 염증성 장질환의 발생 빈도가 급격하게 증가하고 있는 추세이다. 서울대학교 병원의 연구에 따르면 국내에서 염증성 장질환 환자 수가 1980년대 이후 급격한 증가를 보이고 있으며, 향후 발병률이 빠르게 증가할 것으로 예상하고 있다(양석균, 만성 염증은 만병의 근원. 헬스조선. 2013.06.05). 최근 염증성 장질환의 개선과 관련된 연구가 많이 시도되고 있으며, 그 치료 또는 예방 소재를 천연에서 찾고자 하는 노력이 계속되고 있다.

[0005] 한편, 아미노산은 근육을 형성하여 에너지를 발생시키고 활력을 도우며, 인체 내 여러 가지 신진대사를 활성화시킨다. 각 아미노산은 종류별로 체내에서 다양한 생리적 기능을 수행하며, 비만, 고콜레스테롤, 당뇨병, 불면증 등과 같은 여러 질병이 신진대사의 장애로 인한다는 것이 밝혀졌다.

[0006] 최근에는 개별 아미노산의 생리활성에 대한 과학적 자료의 축적과 함께 아미노산은 단백질을 구성하는 기본 단위 또는 질소 공급원으로서의 영양공급이라는 전통적 범주를 벗어나 각 아미노산의 다양한 생리활성 및 기능성들이 논의되고 있다.

[0007] 아미노산이나 펩타이드에 기능성을 부여하는 하나의 방법으로 마이얄 반응(또는 글라이케이션 반응)을 이용할 수가 있는데, 이 반응은 아미노산, 펩타이드, 단백질의 아미노기와 환원당의 카보닐기와의 축합에 의하여 시작되는 일련의 반응이다. 이 반응은 MRPs(Maillard Reaction Products, 당화산물)라 불리는 다수의 반응 물질들을 생산한다.

[0008] MRPs는 화학적 모델 및 식품 시스템 모두에서 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, 가열된 카제인-포도당 혼합물은 유화 리놀레산(emulsified linoleic acid) 모델에서 지질 과산화 비율을 감소시킨다. 또한 카제인-당 유래 마이얄 반응 생성물은 펜톤(Fenton)에 의해 유발된 하이드로실 자유 라디칼에 대해서는 항산화 활성을 보였으나, 소수성 라디칼에 대해서는 활성을 나타내지 않았다 (Gu et al., Food Chemistry(2009), 117(1):48-54). 또한, 마이얄 반응은 유청 단백질의 열 안정성, 유화 특성 및 항산화 활성을 증진시키는 것으로 보고되었다 (Chevalier et al., J Agric Food Chem.(2001), 49(10):5031-5038). 혈장 단백질과 글루코오스, 갈락토오스, 프룩토오스를 이용해 만든 MRPs에서 DPPH 라디칼 소거능을 통해 항산화 효과를 확인하였고(Soottawat Benjakul, Wittayachai Lertittikul, Friedrich Bauer, Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-sugar model system, Food Chemistry, 93(2), 2005, p.189-196), 프룩토오스와 아르기닌의 MRPs가 지질과산화물의 형성 억제 및 과산화수소를 소거시키는 항산화 효과가 있다는 연구가 보고되었다(Nagatoshi Ide, Benjamin H.S. Lau, Kenjiro Ryu, Hiromichi Matsuura, Yoichi Itakura, Antioxidant effects of fructosyl arginine, a Maillard reaction product in aged garlic extract, The Journal of Nutritional Biochemistry, 10(6), 1999, p. 372-376). 또한 호밀빵 제조시 생성되는 MRPs 중 furosine을 추출하여 과산화수소 라디칼과 ABTS 라디칼을 소거시키는 등의 항산화 활성을 가지고 있음이 보고되었다(Anna Michalska,, Miryam Amigo-Benavent, Henryk Zielinski,, Maria Dolores del Castillo, Effect of bread making on formation of Maillard reaction products contributing to the overall antioxidant activity of rye bread. Journal of Cereal Science, 48(1), 2008, p. 123-132).

[0009] 그러나 현재까지 마이얄 반응 생성물이 갖는 염증성 장질환에 대한 예방 또는 치료 효과에 대해서는 알려진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 이에 본 발명자들은 새로운 염증성 장질환의 예방 또는 치료제를 찾기 위한 연구를 수행한 결과, 마이얄 반응 생성물이 인간 장내 세포에서 염증 반응을 억제하고, 대장염 동물모델에서 염증성 장질환에 대한 우수한 치료 활성을 가지고 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 마이얄 반응 생성물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 마이얄 반응 생성물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은 마이얄 반응 생성물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 마이얄 반응 생성물은 인간 장내 세포에서 염증반응을 억제하고, 대장염 동물모델에서 체중 감소, 결장의 단축, 직장 출혈, 설사성 배변 횟수 증가 및 장 조직의 붕괴를 정상 수준으로 회복시키는 등 염증성 장질환을 예방 및 치료하는 우수한 효과를 가지고 있어, 염증성 장질환의 예방, 개선, 또는 치료를 위한 의약품 및 건강기능식품 등에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 사람의 장내 세포에서 본 발명에 따른 마이얄 반응 생성물이 H_2O_2에 의해 유발되는 세포 독성(A) 및 PMA에 의해 유발되는 ROS 생성(B)에 미치는 영향을 확인한 도이다(A에서 $p<0.01$, B에서 $p<0.05$임).

도 2는 상호배양 시스템에서 본 발명에 따른 마이얄 반응 생성물이 LPS에 의해 유도되는 염증성 사이토카인(TNF-α, IL-1β, MCP-1, IL-8)의 발현에 미치는 영향을 확인한 도이다($p<0.05$).

도 3은 대장염 동물모델에서 본 발명에 따른 마이얄 반응 생성물의 투여가 체중(A) 및 질병활성지수(B)에 미치는 영향을 확인한 도이다(A에서 $p<0.01$, B에서 $p<0.001$임).

도 4는 대장염 동물모델에서 본 발명에 따른 마이얄 반응 생성물의 투여가 장의 길이(A 및 B) 및 장의 길이/무게(C)에 미치는 영향을 확인한 도이다(B에서 $p<0.001$, C에서 $p<0.05$임).

도 5는 대장염 동물모델에서 본 발명에 따른 마이얄 반응 생성물의 투여가 장 염증 병변에 미치는 영향을 H&E 염색을 통해 확인한 도이다.

도 6은 대장염 동물모델에서 본 발명에 따른 마이얄 반응 생성물의 투여가 결장 조직 내의 염증성 사이토카인(TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, NF-κB) 발현에 미치는 영향을 확인한 도이다($p<0.05$).

도 7은 대장염 동물모델에서 본 발명에 따른 마이얄 반응 생성물의 투여가 결장 조직 내의 MPO 활성에 미치는 영향을 확인한 도이다($p<0.05$).

도 8은 대장염 동물모델에서 본 발명에 따른 마이얄 반응 생성물의 투여가 혈청 내 NO 생성(A) 및 lysozyme 활성(B)에 미치는 영향을 확인한 도이다($p<0.05$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0017] 본 발명은 마이얄 반응 생성물을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0018] 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 식품 조성물을 포함한다.

[0019] 본 발명에서 “마이얄 반응(Maillard reaction)”은 아미노산의 아미노기와 당(환원당)의 카보닐기가 축합하여 새로운 물질이 만들어지는 현상을 의미한다.

[0020] 상기 아미노산은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 트레오닌, 세린, 시스테인, 메티오닌, 아스파르트산, 아스파라긴, 글루탐산, 글루타민, 리신, 아르기닌, 히스티딘, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 프롤린 등을 포함하며, 바람직하게는 리신이나 이에 제한되지 않는다. 또한 상기 아미노산에는 아미노산들이 결합한 형태인 펩타이드 또는 단백질 및, 이들을 포함하는 식품 부산물 또는 기타 부산물 등이 포함되며, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 상기 당은 글루코오스, 프룩토오스, 갈락토오스, 수크로오스, 말토오스, 락토오스, 자일로오스 등을 포함하며, 바람직하게는 글루코오스이나 이에 제한되지 않는다. 또한 상기 당에는 당이 결합한 형태인 이당류 이상의 다당류 및, 이들을 포함하는 식품 부산물 또는 기타 부산물 등이 포함되며 이에 제한되지 않는다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에서는 아미노산으로 리신을, 당으로 글루코오스를 이용하여, 마이얄 반응 생성물(Maillard reaction products, MRPs)을 수득하였다.

[0023] 본 발명에 따른 마이얄 반응 생성물은 인간 장내 세포에서 염증반응을 억제하고, 대장염 동물모델에서 체중 감소, 결장의 단축, 직장 출혈, 설사성 배변 횟수 증가 및 장 조직의 붕괴를 정상 수준으로 회복시키는 등 염증성 장질환을 예방 및 치료하는 우수한 효과를 가지고 있다.

[0024] 따라서, 본 발명에 따른 마이얄 반응 생성물은 염증성 장질환의 예방 또는 치료를 위한 의약품 및 건강기능식품 등에 유용하게 이용될 수 있다.

[0025] 본 발명에서 “염증성 장질환”은 장관에 염증을 일으키는 질환을 총칭하는 용어로 궤양성 대장염, 크론병, 베체트병, 장결핵, 장염(아메바 장염, 방사선 장염, 약제유발 장염 등)을 포함한다.

[0026] 상기 궤양성 대장염은 대장의 점막에 진무름(미란)이나 궤양이 연속적으로 형성되는 질환으로, 혈변, 점혈변, 설사, 복통이 일어나고, 중증인 경우에는 발열, 체중 감소, 빈혈 등의 전신성 증상이 나타난다. 또한, 크론병은 입에서 항문에 이르는 소화관의 임의 부위에 궤양 등의 병변이 비연속적으로 발생하는 질환으로서, 복통, 설사, 혈변과 더불어, 중증의 경우에는 발열, 하혈, 체중 감소, 전신 권태감, 빈혈 등의 증상이 나타난다. 궤양성 대장염 및 크론병 모두 일시적으로 증상이 좋아지다가 재발이 반복되는 만성 난치성 질환으로 대장암으로 발전할 가능성이 높다.

[0027] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다.

[0028] 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[0030] 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라

다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물은 1일 0.1 내지 10000 mg/kg(체중)의 양으로 투여할 수 있다. 상기 조성물의 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다.

[0031] 본 발명의 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0032] 본 발명의 조성물은 마이얄 반응 생성물과 함께 염증성 장질환의 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명의 조성물은 염증성 장질환의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0034] 본 발명의 마이얄 반응 생성물은 염증성 장질환의 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있다.

[0035] 본 발명에서 건강기능식품이란 질병의 예방 및 치료, 생체방어, 면역, 병후의 회복, 노화 억제 등 생체조절기능을 가지는 식품을 말하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해하여야 한다.

[0036] 본 발명의 마이얄 반응 생성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 마이얄 반응 생성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 마이얄 반응 생성물은 원료에 대하여 15 중량 % 이하, 바람직하게는 10 중량 % 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0037] 본 발명의 마이얄 반응 생성물이 포함될 수 있는 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명의 마이얄 반응 생성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0038] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g 이다.

[0039] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0040] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0041] **실시예 1. 아미노산 및 당을 이용한 마이얄 반응 생성물의 제조**

[0042] 아미노산으로 리신(Lysine, 1 mol/L), 당으로 글루코오스(glucose, 1 mol/L)를 이용하였으며, 이를 1:1 (molar ratio)의 비율로 반응시켜 마이얄 반응 생성물 (이하, Glc-Lys MRPs 라고 함)을 제조하였다. 보다 구체적으로, 리신과 글루코오스를 105~110℃의 진탕반응기(shaking water bath)에서 120 rpm으로 30분간 혼합하여 마이얄 반

응을 수행하였다. 반응 종료 후 급격히 냉각한 후 동결건조를 통하여 수분을 제거하고, 마이얄 반응 생성물을 수득하여 이를 사용 전까지 -70℃에서 보관하였다.

[0043] **실험예 1. *in vitro* 상에서 마이얄 반응 생성물의 장 염증 개선 효과 검증**

[0044] 상기 실시예 1에서 제조한 마이얄 반응 생성물이 *in vitro* 상에서 장 염증 반응에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0045] 먼저, 단핵구는 ATCC (American Type Culture Collection)에서 분양받은 THP-1 세포를 사용했으며, 이를 5 mM의 머캅토에탄올(mercaptoethanol) 및 10% FBS를 포함하는 RPMI-1640 배지에서 배양하였다(37℃, 5% CO_2 조건).

사람의 장내 세포인 Caco-2 세포는 ATCC에서 분양받아 사용했으며, 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였다(37℃, 5% CO_2 조건).

[0046] Caco-2 세포가 플라스크에서 단일층 상태로 자라면, 산화 스트레스를 유발하는 물질인 2 mM H_2O_2와 함께 상기 실시예 1에서 제조한 마이얄 반응 생성물을 처리하고, MTT assay를 통하여 세포 생존률을 측정하였다. 또한, ROS 생성 억제능을 측정하기 위하여, Caco-2 세포에 산화 스트레스를 유발하는 물질인 0.1 μM PMA (phorbol myristate acetate)와 함께 상기 실시예 1에서 제조한 마이얄 반응 생성물을 처리한 후, ROS 생성 정도를 측정하였다. 대조군(Control)의 경우 아무것도 처리하지 않았다. 이하, 모든 실험에서 유의성 평가는 일원분산분석(one-way analysis of variance)을 통해 수행하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0047] 도 1에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 마이얄 반응 생성물(Glc-Lys MRPs)은 농도 의존적으로 사람의 장내 세포에서 H_2O_2에 의해 유발되는 세포 독성을 완화시키고, PMA에 의해 유도되는 ROS 생성을 억제하였다.

[0048] 다음으로, 상호배양 시스템(Co-culture)을 이용한 항염증 반응 조절을 확인하기 위하여, THP-1 세포를 Trans-well 아래층에 배양하고, Caco-2 세포는 Trans-well 위층에 단일층으로 배양하여 장 내 모델과 똑같이 만들었다. 염증 유발 물질인 2 μg/mL LPS (lopopolysaccharide)를 사용하여 세포 내 염증 반응을 유도하였다. 대조군(Control)의 경우 아무것도 처리하지 않았으며, 실험군의 경우 상기 실시예 1에서 제조한 마이얄 반응 생성물을 LPS와 함께 처리하였다. 12시간 후, 배지를 제거하고, 트리졸(trizol)을 이용하여 세포에서 RNA를 분리한 후, RT-PCR을 통해 대표적 염증 관련 사이토카인인 TNF-α(Tumor necrosis factor-alpha), IL-1β (Intereukin-1 beta), MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1) 및 IL-8의 발현을 측정하였다. 상기 실험에 사용된 프라이머 서열을 표 1에 나타내었으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

표 1

[0049]

Gene	Oligonucleotide sequence
TNF-a	sense, 5′ -ATGAGCACTGAAAGCATGATCCGG-3′ antisense, 5′ -GAAGACCCCTCCCAGATAGATGG-3′
IL-1β	sense, 5′ -AAACAGATGAAGTGCTCCTTCCAGG-3′ antisense, 5′ -TGGAGAACACCACTTGTTGCTCCA-3′
IL-8	sense, 5′ -CTGGCCGTGGCTCTCTTGGCAGCCTTCCTG-3′ antisense, 5′ -GGCAACCCTACAACAGACCCACACAATACA-3′
MCP-1	sense, 5′ -TCGCGAGCTATAGAAGAATCA-3′ antisense, 5′ -TGTTCAAGTCTTCGGAGTTTG-3′ .
GAPDH	sense, 5′ - AGGTCGGAGTCAACGGATTTG-3′ antisense, 5′ -ACAGTCTTCTGGGTGGCAGTG-3′

[0050] 도 2에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 마이얄 반응 생성물(Glc-Lys MRPs)은 장 내와 똑같은 모델인 상호배양 시스템에서 LPS에 의해 유도되는 염증성 사이토카인의 발현을 하향 조절하였다.

[0051] 이상의 실험 결과를 통하여, *in vitro* 상에서 본 발명의 마이얄 반응 생성물(Glc-Lys MRPs)이 장 내 항산화 및 항염증 효과를 가지고 있음을 확인하였다.

[0052] **실험예 2. *in vivo* 상에서 마이얄 반응 생성물의 염증성 장질환 치료 효과 검증**

[0053] 상기 실시예 1에서 제조한 마이얄 반응 생성물이 *in vivo* 상에서 염증성 장질환에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다. 대장염 동물모델로는 6~7주령의 수컷 Wistar 랫트를 이용하였으며, 6마리씩 5개의 그룹으로 나누었다 (그룹 1은 대조군 그룹. 그룹 2는 DSS(dextran sulfate sodium)로 대장염이 유발된 그룹. 그룹 3(MRPL), 4(MRPH), 5(GL)는 DSS로 대장염 유발 및 각 샘플(MRPL: 42.1 mg의 Glc-Lys MRPs, MRPH: 421 mg의 Glc-Lys MRPs, GL: 421 mg의 GL, /200 g rat)을 투여한 그룹임). 대장염은 식수에 DSS (5%)를 처리한 후, 자유 급수시켜 유도시켰으며, 각 샘플은 대장염이 유도되기 7일 전부터 대장염 유발 기간 동안까지 총 14일간 경구 투여하였다. 실험이 끝나고 18시간 뒤 랫트를 희생시킨 후, 결장을 적출하여 PBS로 두 번 세척하고 두 개의 여과지 사이에서 말린 다음 무게를 측정하였다. 그 후 결장을 잘 늘어뜨려 결장 교차지점부터 직장 말단부분까지 길이를 측정하였다. 결장 말단 부분은 현미경과 생화학적 분석을 위해 사용하였으며, 결장의 나머지 부분은 100 mg/1 ml의 PBS에서 균질화하고 나누어 -70℃에서 보관하여 이후 실험에 이용하였다.

[0054] **2-1. 체중 및 질병활성지수(Disease activity index, DAI) 측정**

[0055] 실험 기간 동안 체중을 측정하였으며, 분변의 농도와 상태를 DAI scoring system을 이용하여 DSS 투여 전 날부터 5일 동안 측정하였다. DAI 점수는 각 랫트의 분변 농도와 혈변 점수를 더하고 2로 나누어 계산하였다. 각각의 점수 환산은 다음과 같다. 분변 농도 (0과 1: 보통, 2와 3: 묽은 변, 4: 설사), 혈변(0: 음성, 1: ±, 2: +, 3: ++, 4: 매우 심함). 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0056] 도 3에 나타낸 바와 같이, 대조군과 비교하였을 때 DSS로 대장염을 유발할 경우 체중은 현저히 줄어들고 질병활성지수는 증가하지만, 본 발명의 마이얄 반응 생성물(Glc-Lys MRPs)을 투여할 경우 체중 및 질병활성지수가 정상 수준으로 회복되었다.

[0057] **2-2. 장의 길이 측정**

[0058] 대표적인 염증성 장질환의 마커로서, 각 랫트의 장의 길이를 측정하고, 장의 길이/무게 비율을 계산하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0059] 도 4에 나타낸 바와 같이, 대조군과 비교하였을 때 DSS로 대장염을 유발할 경우 장의 길이가 현저히 줄어들지만, 본 발명의 마이얄 반응 생성물(Glc-Lys MRPs)을 투여할 경우 장의 길이가 정상 수준으로 회복되었다. 또한, 대조군과 비교하였을 때 DSS로 대장염을 유발할 경우 장의 길이/무게 비율이 증가하지만, 본 발명의 마이얄 반응 생성물(Glc-Lys MRPs)을 투여할 경우 정상 수준으로 회복되었다.

[0060] **2-3. 조직병리학적 검사**

[0061] 각 랫트에서 분리한 결장 말단 부분을 10% 포르말린 용액에서 24시간 고정하고, PBS에 세척한 후, 알코올을 이용(serial dilution)하여 탈수시켰다. 각 샘플을 파라핀으로 고정하고 56℃에서 24시간 동안 반응시킨 후, 4 μm 두께로 마이크로톰 절편법에 따라 준비하였다. 이를 탈파라핀화한 후, 헤마토실린과 에오신으로 염색하여 광학현미경을 통해 관찰하였으며, 병변 스코어를 측정하였다. 그 결과를 도 5 및 표 2에 나타내었다.

표 2

[0062]

Group	Acute ulcer	Mucosal erosion	Inflammatory cell infiltration in the mucosa	Submucosal edema	Inflammatory cell infiltration in the submucosa
Control	0.00±0.00	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{a}	0.00±0.00
5% DSS	0.60±1.3	1.8 ± 0.84^{b}	2.00 ± 1.00^{b}	0.80 ± 0.45^{b}	0.60±0.55
5% DSS + MRPL	0.00±0.00	0.20 ± 0.45^{a}	1.00 ± 0.71^{c}	0.80 ± 0.45^{b}	0.40±0.55
5% DSS + MRPH	0.00±0.00	0.40 ± 0.55^{a}	0.80 ± 0.45^{ac}	0.00 ± 0.00^{a}	0.00±0.00
5% DSS + GL	0.60±1.3	1.6 ± 1.3^{b}	1.60 ± 0.89^{bc}	0.40 ± 0.55^{ab}	0.20±0.45

[0063] (Means within a column with different letters are significantly different ($p<0.05$), according to one-way analysis of variance.)

[0064] 도 5 및 표 2에 나타낸 바와 같이, DSS로 대장염을 유발할 경우 장 염증의 대표적인 병변들(Acute ulcer, Mucosal erosion, Inflammatory cell infiltration in the mucosa, Submucosal edema, Inflammatory cell infiltration in the submucosa)의 스코어가 대조군과 비교하였을 때 현저히 증가하지만, 본 발명의 마이얄 반응 생성물(Glc-Lys MRPs)을 투여할 경우 상기 병변들의 스코어가 정상 수준으로 회복되었다.

[0065] **2-4. 사이토카인 발현 측정**

[0066] 각 랫트의 결장 조직에서 TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10 및 NF-κB(nuclear factor-κB) 등의 사이토카인의 발현 정도를 Quantitative real-time RT-PCR을 통하여 측정하였다. 상기 실험에 사용된 프라이머 서열을 표 3에 나타내었으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

표 3

[0067]

Gene	Oligonucleotide sequence
TNF-a	sense, 5'-CGTGTTCATCCGTTCTCTAC-3' antisense, 5'-CAGCGTCTCGTGTGTTTC-3'
IL-1β	sense, 5'-GCACCTTCTTTTCCTTCATC-3' antisense, 5'-GCCGTCTTTCATCACACA-3'
IL-6	sense, 5'-AAGTCGGAGGCTTAATTACATATGTTC-3' antisense, 5'-TCATCGCTGTTCATACAATCAGAA-3'
IL-10	sense, 5'-CGGGGTGACAATAACTGC-3' antisense, 5'-CCTGGGGCATCACTTCTAC-3'
NF-κB	sense, 5'-GGCAGCACTCCTTATCAA-3' antisense, 5'-GGTGTCGTCCCATCGTAG-3'
β-Actin	sense, 5'-TCAGGAGGAGCAATGATCTTGA-3' antisense, 5'-GACAGGATGCAGAAGGAGATCAC-3'

[0068] 도 6에 나타낸 바와 같이, 대조군과 비교하였을 때 DSS로 대장염을 유발할 경우 염증성 사이토카인(TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, NF-κB)의 발현이 현저하게 증가하지만, 본 발명의 마이얄 반응 생성물(Glc-Lys MRPs)을 투여할 경우 염증성 사이토카인의 발현이 매우 낮은 수준으로 감소되었다.

[0069] **2-5. MPO(Myeloperoxidase) 활성 측정**

[0070] 각 랫트의 결장 조직 균질액에서 fluorimetric detection kit를 이용하여 MPO 효소 활성을 측정하였다. 이는 과산화수소와 MPO의 존재 하에서 비형광성 물질을 감지하여 산화시키는 시약을 사용하는 것으로, 450 nm에서 흡광도 측정하여 계산한다. MPO의 활성은 U/mg protein으로 표현하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0071] 도 7에 나타낸 바와 같이, 대조군과 비교하였을 때 DSS로 대장염을 유발할 경우 염증성 장질환의 마커인 MPO의 활성이 현저하게 증가하지만, 본 발명의 마이얄 반응 생성물(Glc-Lys MRPs)을 투여할 경우 MPO의 활성이 매우 낮은 수준으로 감소하였다.

[0072] **2-6. NO(Nitric Oxide) 측정 및 Plasma lysozyme activity assay**

[0073] 각 랫트의 혈액 샘플을 1000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 혈청을 분리하였다.

[0074] 먼저 NO 측정을 위해, 96 웰 플레이트에 혈청 80 μL와 griess 시약 80 μL (1% Sulfanilamide / 5% phosphoric acid 용액)을 첨가하고, 실온에서 10분간 배양한 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 NO의 농도(mM)는 $NaNO_2$ 표준액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

[0075] 또한, Lysozyme 활성 측정을 위해, Micrococcus lysodeikticus (75 mg/100 mL of 0.1M phosphate / citrate

buffer with 0.09% NaCl, pH 5.6) 현탁액의 용균을 측정하였다. (P4809로 buffer 제조 후 0.09% NaCl로 pH 조정). 상기 Micrococcus lysodeikticus 현탁액 175 μL에 25 μL의 혈청이나 표준시약을 첨가하고, 30분 간 상온에 방치 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 hen egg white lysozyme (L6876)를 0.1M phosphate/citrate buffer(with 0.09% NaCl (pH 5.8))에 녹여 사용하였으며, 각 혈청 시료의 단백함량을 측정하여 mg lysozyme/mg protein으로 표기하였다.

[0076] 이상의 실험 결과를 도 8에 나타내었다.

[0077] 도 8에 나타낸 바와 같이, 대조군과 비교하였을 때 DSS로 대장염을 유발할 경우 염증 마커인 NO 생성이 현저하게 증가하고 lysozyme의 활성은 현저하게 감소하지만, 본 발명의 마이얄 반응 생성물(Glc-Lys MRPs)을 투여할 경우 NO 생성 및 lysozyme 활성이 정상 수준으로 회복되었다.

[0078] 상기 실험 결과를 통하여, 본 발명에 따른 마이얄 반응 생성물은 대장염이 유발된 염증성 장질환 동물모델에서 우수한 치료 효과를 가지고 있음을 확인하였다.

[0079] 이하 본 발명의 약학적 조성물 및 식품 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0080] **제제예 1. 약학적 제제의 제조**

[0081] 1. 산제의 제조

[0082] 마이얄 반응 생성물	20 mg
[0083] 유당	100 mg
[0084] 탈크	10 mg

[0085] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

[0086] 2. 정제의 제조

[0087] 마이얄 반응 생성물	10 mg
[0088] 옥수수전분	100 mg
[0089] 유당	100 mg
[0090] 스테아린산 마그네슘	2 mg

[0091] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0092] 3. 캡슐제의 제조

[0093] 마이얄 반응 생성물	10 mg
[0094] 결정성 셀룰로오스	3 mg
[0095] 락토오스	14.8 mg
[0096] 마그네슘 스테아레이트	0.2 mg

[0097] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0098] 4. 주사제의 제조

[0099] 마이얄 반응 생성물 10 mg

[0100] 만니톨 180 mg

[0101] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0102] $Na_2HPO_42H_2O$ 26 mg

[0103] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0104] 5. 액제의 제조

[0105] 마이얄 반응 생성물 10 mg

[0106] 이성화당 10 g

[0107] 만니톨 5 g

[0108] 정제수 적량

[0109] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충진하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0110] **제제예 2. 식품 제제의 제조**

[0111] 마이얄 반응 생성물 100 mg

[0112] 비타민 혼합물 적량

[0113] 비타민 A 아세테이트 70 g

[0114] 비타민 E 1.0 mg

[0115] 비타민 B1 0.13 mg

[0116] 비타민 B2 0.15 mg

[0117] 비타민 B6 0.5 mg

[0118] 비타민 B12 0.2 g

[0119] 비타민 C 10 mg

[0120] 비오틴 10 g

[0121] 니코틴산아미드 1.7 mg

[0122] 엽산 50 g

[0123] 판토텐산 칼슘 0.5 mg

[0124] 무기질 혼합물 적량

[0125] 황산제1철 1.75 mg

[0126] 산화아연 0.82 mg

[0127] 탄산마그네슘 25.3 mg

[0128] 제1인산칼륨 15 mg

[0129] 제2인산칼슘 55 mg

[0130] 구연산칼륨 90 mg

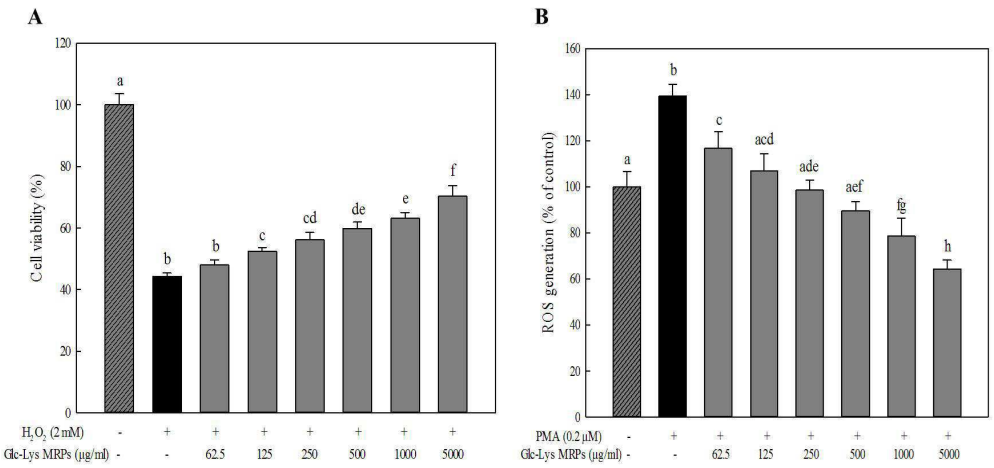
[0131] 탄산칼슘 100 mg

[0132] 염화마그네슘 24.8 mg

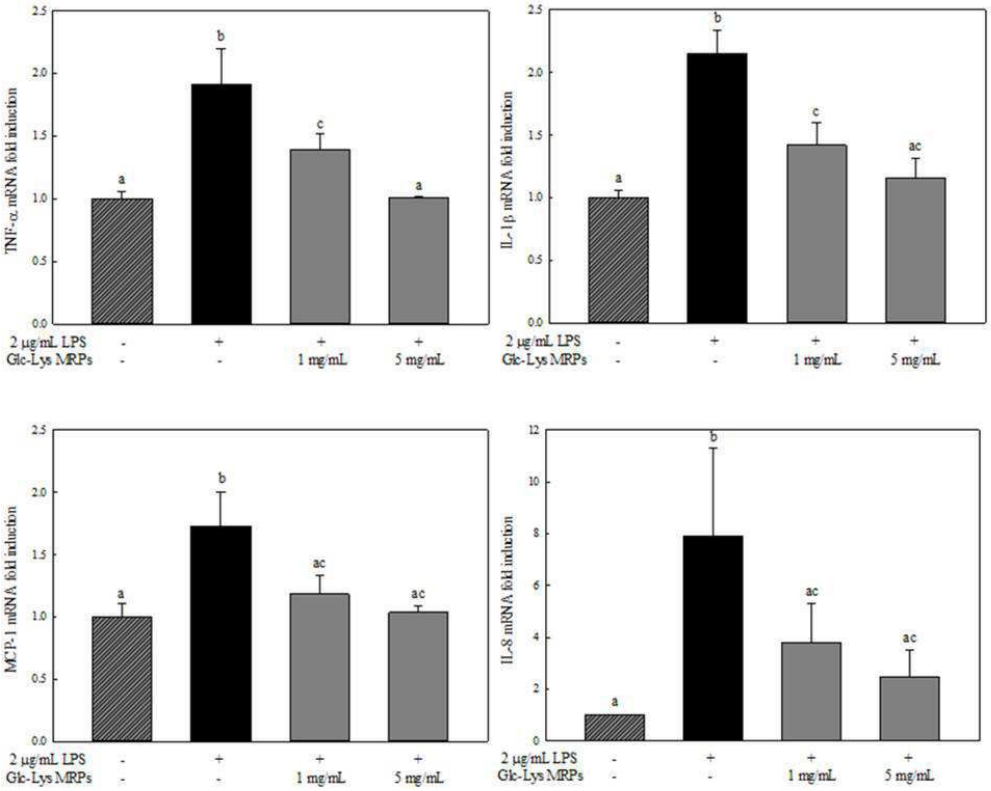
[0133] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 제조에 사용할 수 있다.

도면

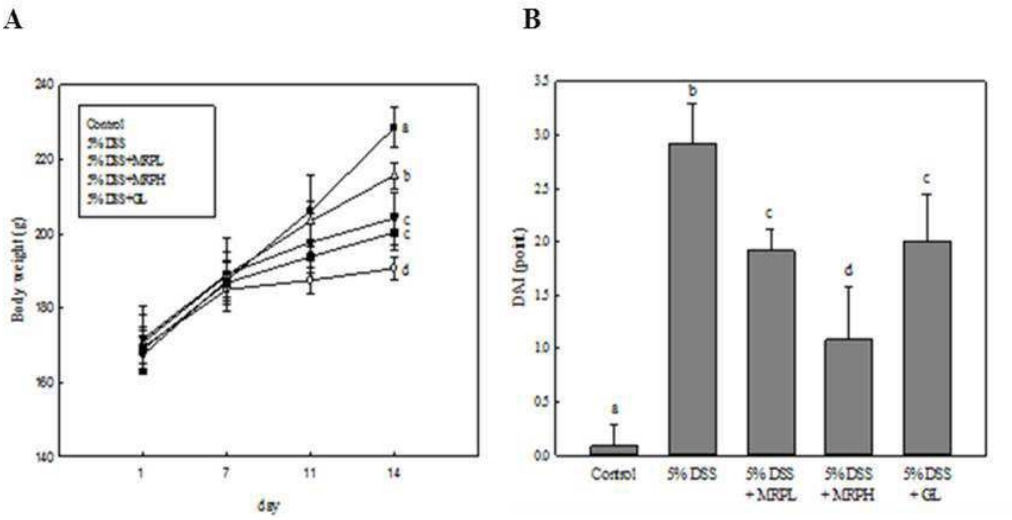
도면1



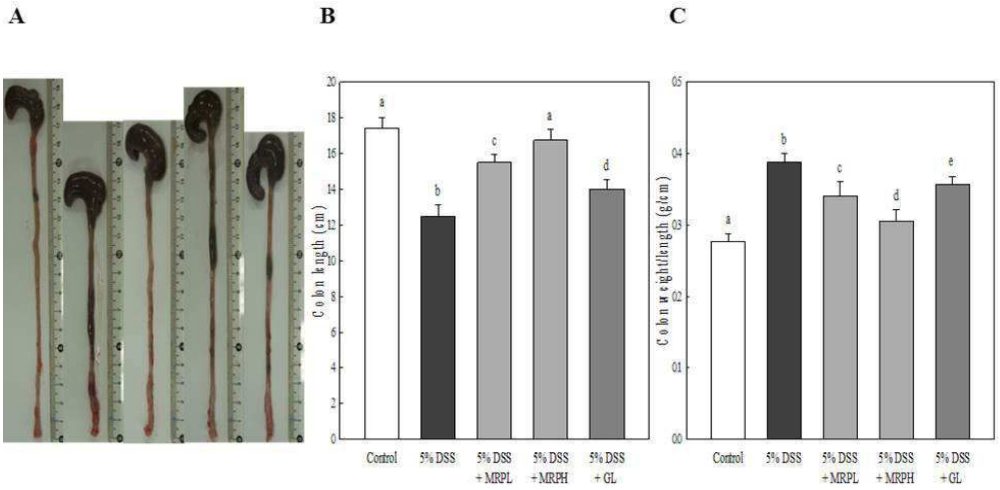
도면2



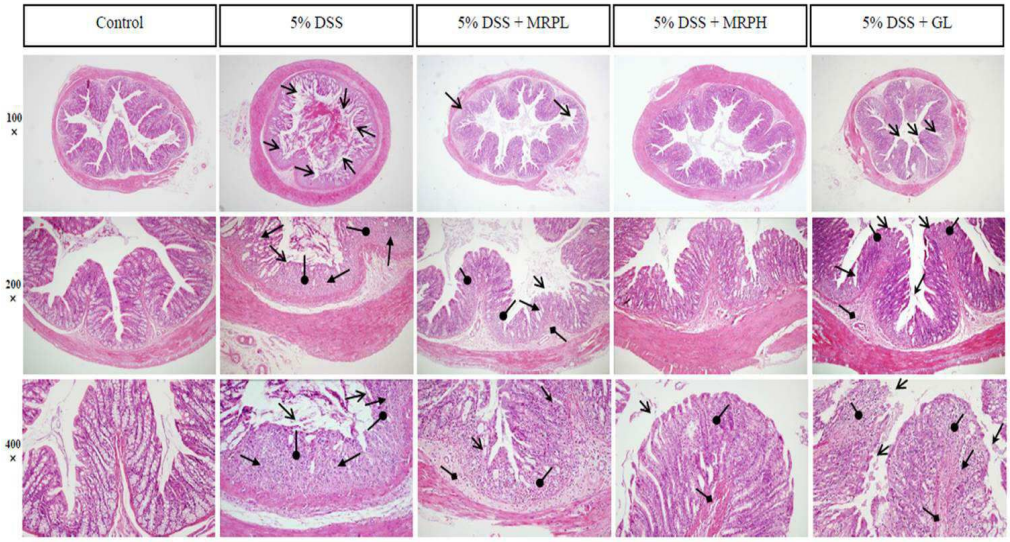
도면3


A
B
Control
5% DSS
5% DSS+MRPL
5% DSS+MRPH
5% DSS+GL
Body weight (g)
day
DAI (point)
Control
5% DSS
5% DSS +MRPL
5% DSS +MRPH
5% DSS +GL

도면4

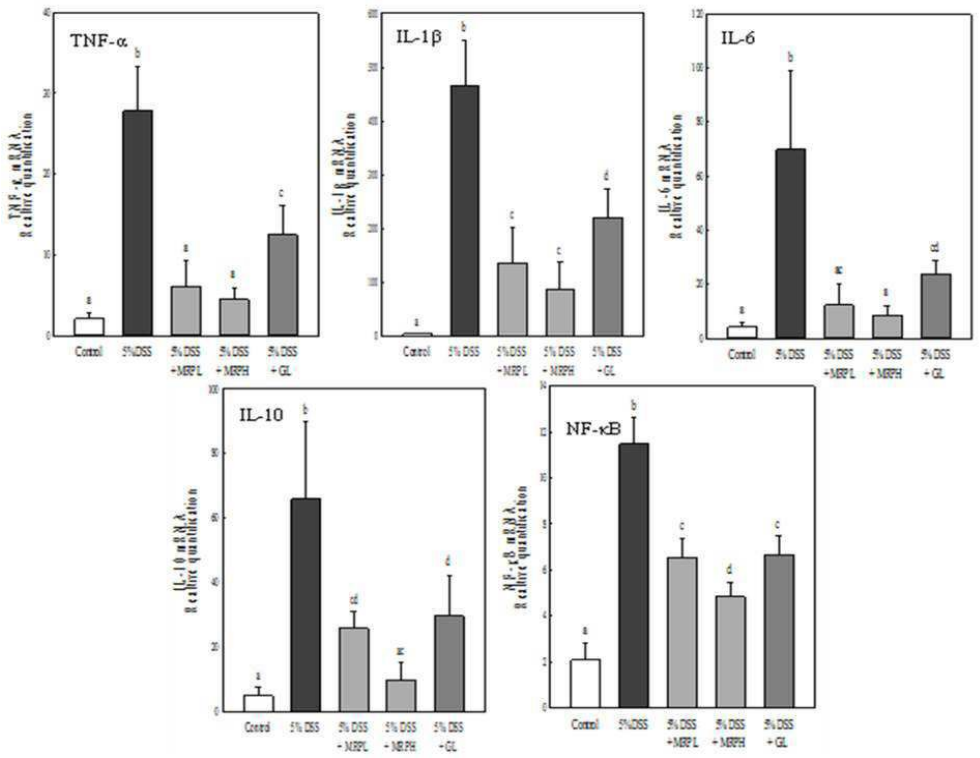

A
B
C
Colon length (cm)
Colon weight/length (g/cm)
Control
5% DSS
5% DSS +MRPL
5% DSS +MRPH
5% DSS +GL

도면5

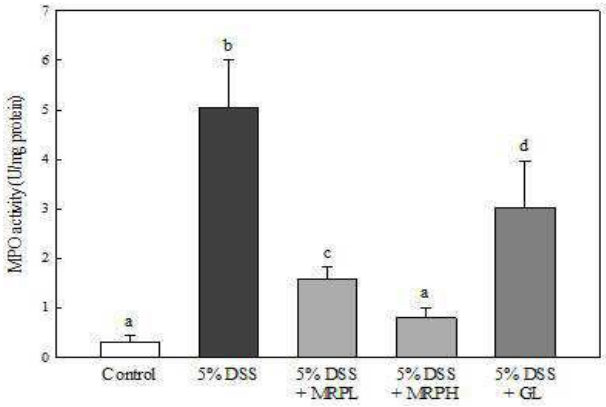


→, erosion; ⊸, cell infiltrates in lamina propria; ➔, loss of cryptal glands;
➔, cell infiltrates and edema in submusoca; ➔, mucosal irregularity

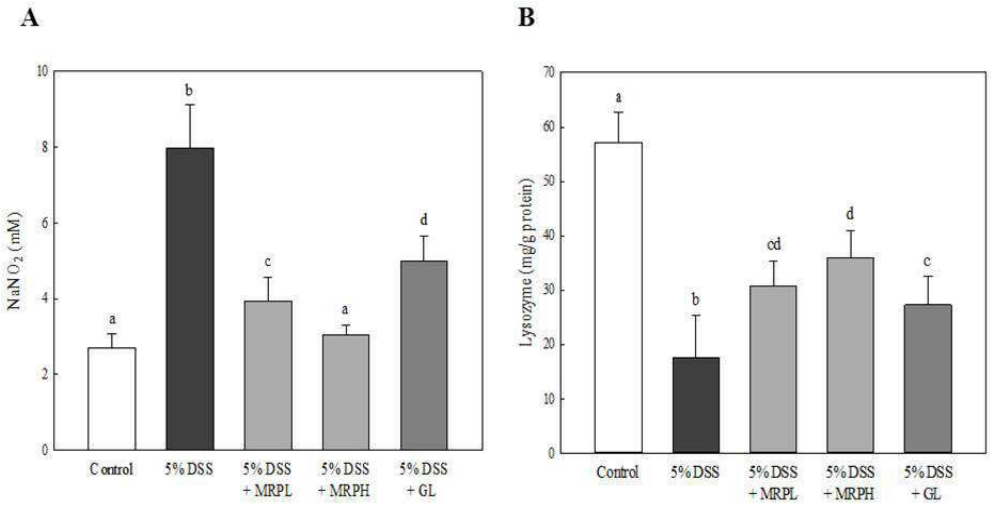
도면6



도면7


MPO activity (U/mg protein)
0
1
2
3
4
5
6
7
a
b
c
a
d
Control
5% DSS
5% DSS + MRPL
5% DSS + MRPH
5% DSS + GL

도면8


A
NaNO2 (mM)
0
2
4
6
8
10
a
b
c
a
d
Control
5% DSS
5% DSS + MRPL
5% DSS + MRPH
5% DSS + GL
B
Lysozyme (mg/g protein)
0
10
20
30
40
50
60
70
a
b
cd
d
c
Control
5% DSS
5% DSS + MRPL
5% DSS + MRPH
5% DSS + GL