



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0056826
(43) 공개일자 2019년05월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/216 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/216 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0154156
(22) 출원일자 2017년11월17일
심사청구일자 2017년11월17일

(71) 출원인
연세대학교 원주산학협력단
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
(72) 발명자
이기중
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 원주캠퍼스 미래관 211호
황순재
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 원주캠퍼스 미래관 214호 면역 및 조직병리학 연구실
조민정
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 원주캠퍼스 미래관 214호 면역 및 조직병리학 연구실
(74) 대리인
김보민

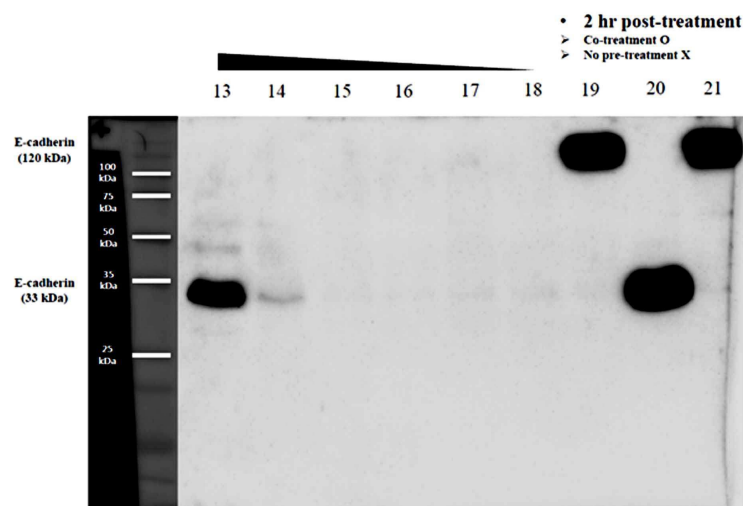
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 신장 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 카페인산 페네틸 에스테르(caffeic acid phenethyl ester) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 신장 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 카페인산 페네틸 에스테르가 감마-세크레타제 활성을 저해하는 감마-세크레타제 저해제(gamma-secretase inhibitor)로 작용하여, 신장 기능 손상을 억제할 수 있음을 확인하였으므로, 상기 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 신장 질환 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 이용할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017H1A2A1045727

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 글로벌박사펠로우십

연구과제명 장독소성 박테로이디스 프라질리스균에 의해 유발되는 장염의 기전 및 면역세포의 역할 규명

기 여 율 1/3

주관기관 연세대학교 원주산학협력단

연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1D1A1A02018088

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원사업

연구과제명 Th17면역반응으로 촉진되는 대장용종 형성 wild-type 마우스 모델 개발을 통해 고염식과 대장암 간에 상관관계 규명 및 병태생리적 메커니즘 연구

기 여 율 1/3

주관기관 연세대학교 원주산학협력단

연구기간 2017.06.01 ~ 2018.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016M3A9B4919711

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발사업(줄기세포연구사업)

연구과제명 세포미세환경 조절을 통한 생체모사 3차원 심혈관 조직재생 기술 개발

기 여 율 1/3

주관기관 서울대학교 산학협력단

연구기간 2016.07.01 ~ 2021.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

카페인산 페네틸 에스테르(caffeic acid phenethyl ester) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 신장 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 카페인산 페네틸 에스테르(caffeic acid phenethyl ester) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 신장 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신장은 생체의 항상성(homeostasis)을 유지하는 중요한 장기로, 체내 체액량, 혈액 내의 이온 농도와 pH를 조절하고, 대사성 노폐물, 독소, 약물 등의 노폐물을 배설하며, 혈압 조절 및 기타 대사성, 내분비 기능을 수행한다. 또한, 비타민 D를 활성화시켜서 소장에서 칼슘이 흡수되도록 도와주며 여러 가지 호르몬의 합성에도 관여한다.

[0003] 이러한 신장이 배설, 조절, 대사 및 내분비적 기능을 정상적으로 수행하지 못하고 전체적으로 기능이 저하되거나 이상이 초래된 상태를 신장 질환이라고 한다. 신장의 손상으로 인한 기능의 저하는 신장 및 관련 구조의 증대, 신장의 위축, 체액량의 변화, 전해질 불균형, 대사성 산증, 가스교환장애, 항감염 기능 손상, 요독성 독소의 축적 등을 초래한다.

[0004] 신장 질환은 진행 상태에 따라 급성신부전증, 만성신부전증으로 분류되며, 또는 발병 원인에 따라 혈관 복합체의 침착으로 인한 사구체 신염, 당뇨병에 수반되는 당뇨병성 신장 질환 또는 고혈압에 수반되는 고혈압성 신장 질환, 항생제 또는 항암제 등의 약물투여에 의한 독성신병증, 세균 감염 등으로 나뉜다. 원인이 되는 신장 질환의 종류에 관계없이 만성적으로 신기능 장애가 진행되어 사구체 여과율이 50% 이하로 감소하면, 대부분의 경우 계속적으로 사구체 여과율이 감소하게 되며, 궁극적으로 말기 신부전증에 도달하게 되고 혈액학적 이상, 신경계 합병증, 위장관계 합병증, 면역학적 합병증, 감염 또는 골이영양증 등의 합병증이 일어나 심한 경우 죽음에 이르게 된다.

[0005] 신장 질환은 전 세계적으로 매년 그 발병자가 증가하고 있으며 더욱이 증상이 나타나지 않거나 잘 인지하지 못하여 초기 발견하더라도 말기 신부전에 이르는 경우가 많다. 미국 신장 데이터 시스템(United States Renal Data System, USRDS)에 보고된 메디케어(Medicare) 수혜자를 대상으로 한 분석에 의하면 2000년 2.7%였던 만성 신부전증의 유병률은 2009년 8.5%로 증가하였으며, 우리나라의 경우에도 2006년 대비 2010년에 만성신부전증으로 진료 받은 환자수는 총 37.1%, 연평균으로 환산 시 8.2%씩 증가한 것으로 보고된 바 있다. 특히, 미국에서 신사구체 관련 질병들은 1차적으로 말기 신장 질환과 연관된 의료비용을 상승시키는 주요 원인이 되고 있다.

[0006] 유전적으로 관련된 신사구체 질병들에 관한 최근 연구에서는 신장에서 신사구체 여과 세포(glomerular filter cells)인 족세포(podocytes)가 인간 신장 기능 손실에 결정적인 영향을 미치는 요소로 정의하고 있다. 신사구체 형성 과정 중 신장 여과 기능의 성숙에 관여하는 프로그램은 신사구체 여과 장벽의 손상에 반응하여 재활성화된다. Notch 신호 기작은 이 프로그램 중 하나로 초기 신장 형성, 도관 형성과 사구체 형성을 포함하는 다양한 발달 과정에서 활성화된다. 이러한 Notch 세포 신호전달 기작에 문제가 발생할 경우 생쥐와 사람에서 족세포 손상을 유도하고 신장의 기능을 잃게 한다고 알려져 있다. 일례로, 최근 연구를 통해 족세포의 손실 과정에서 Notch의 발현이 증가되고, 인간의 당뇨 합병증으로 인한 신장 기능 장애와 사구체경화증(glomerulosclerosis)에

서도 Notch가 활성화 된다고 보고된 바 있다. 또한, Notch는 Jagged와 Delta-like와 같은 리간드에 의해 활성화되며 감마-세크레타제(gamma-secretase) 복합체에 의해 Notch의 세포 안에 존재하는 부분이 잘려져 핵 안으로 이동하여 Notch가 목표로 하는 유전자의 전사를 증가시키며, 상기 감마-세크레타제 억제제를 사용하여 족세포 손상 모델에서 질병을 치료할 뿐 아니라 이미 형성된 사구체여과 손상을 복구하는 치료 효과가 있음이 보고되고 있다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 신장 질환 치료제로서 감마-세크레타제 억제제를 개발하기 위해 노력한 결과, 카페인산 페네틸 에스테르(caffeic acid phenethyl ester) 농도가 40 ~ 80 μ M일 경우에 감마-세크레타제 활성을 저해하는 감마-세크레타제 저해제로 작용하는 것을 확인하여, 상기 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 신장 질환 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 이용할 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Akihiko Ohtaka, Tetsuya Ootaka, Hiroshi Sato, Jun Soma, Toshinobu Sato, Takao Saito, Sadayoshi Ito (2002) Significance of early phenotypic change of glomerular podocytes detected by Pax2 in primary focal segmental glomerulosclerosis. AM. J. Kidney Dis 39:475.

(비특허문헌 0002) Ulla-Maj Fiuza & Alfonso Martinez Arias (2007) Cell and molecular biology of Notch. J. Endocrinol 194: 459-474.

(비특허문헌 0003) Hui-Teng Cheng, Jeffrey H. Miner, MeeiHua Lin, Malu G. Tansey, Kevin Roth, Raphael Kopan (2003) γ -Secretase activity is dispensable for mesenchyme-to-epithelium transition but required for podocyte and proximal tubule formation in developing mouse kidney. Development and disease 130: 5031-5042.

(비특허문헌 0004) Wu, S., Lim, K.-C., Huang, J., Saidi, R. F. and Sears, C. L. (1998) Bacteroides fragilis enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 14979-14984.

(비특허문헌 0005) Shaoguang Wu, Ki-Jong Rhee, Ming Zhang, Augusto Franco and Cynthia L. Sears (2007) Bacteroides fragilis toxin stimulates intestinal epithelial cell shedding and γ -secretase-dependent E-cadherin cleavage. Journal of Cell Science 120(11): 1944-1952.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 카페인산 페네틸 에스테르(caffeic acid phenethyl ester) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 신장 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 신장 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 카페인산 페네틸 에스테르(caffeic acid phenethyl ester) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 신장 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 신

장 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 BFT(Bacteroides fragilis toxin)을 처리하여 감마-세크레타제(gamma-secretase)의 활성화를 유도한 세포에서 카페인산 페네틸 에스테르(caffeic acid phenethyl ester)가 감마-세크레타제 활성을 저해하고, 염증 반응과 관련된 인자의 발현을 억제하는 것을 확인하였으므로, 상기 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 신장 질환 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 HCT116 대장암 세포주에 CAPE 또는 DMSO, 및 recom ET 또는 recom NT를 동시에 1시간 동안 처리한 후 E-cadherin의 분절 양상을 확인한 도이다:

- 1: CAPE (80 μ M) + recom ET (1:10);
- 2: DMSO + recom ET (1:10);
- 3: CAPE (80 μ M) + recom NT (1:10);
- 4: DMSO + recom NT (1:10);
- 5: DMSO + BHIB (1:10); 및
- 6: DMSO + FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지(serum free media).

도 2는 HCT116 대장암 세포주에 CAPE, DMSO 또는 감마-세크레타제 저해제(gamma-secretase inhibitor), 및 recom ET를 동시에 30분 또는 1시간 동안 처리한 후 E-cadherin의 분절 양상을 확인한 도이다:

- 7: CAPE (80 μ M) + recom ET (1:10), 30분 처리;
- 8: DMSO + recom ET (1:10), 30분 처리;
- 9: 감마-세크레타제 저해제 (1.5 μ M) + recom ET (1:10), 30분 처리;
- 10: CAPE (80 μ M) + recom ET (1:10), 1시간 처리;
- 11: DMSO + recom ET (1:10), 1시간 처리;
- 12: 감마-세크레타제 저해제 (1.5 μ M) + recom ET (1:10), 1시간 처리;
- 13: CAPE (80 μ M) + recom ET (1:10), 1시간 처리;
- 14: 감마-세크레타제 저해제 (1.5 μ M) + FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지, 1시간 처리; 및
- 15: DMSO + FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지, 1시간 처리.

도 3은 HT29/C1 대장암 세포주에 CAPE, DMSO 또는 감마-세크레타제 저해제, 및 recom ET를 동시에 30분 또는 1시간 동안 처리한 후 E-cadherin의 분절 양상을 확인한 도이다:

- 12: CAPE (80 μ M) + recom ET (1:10), 30분 처리;
- 13: DMSO + recom ET (1:10), 30분 처리;
- 14: 감마-세크레타제 저해제 (1.5 μ M) + recom ET (1:10), 30분 처리;
- 15: CAPE (80 μ M) + recom ET (1:10), 1시간 처리;
- 16: DMSO + recom ET (1:10), 1시간 처리;
- 17: 감마-세크레타제 저해제 (1.5 μ M) + recom ET (1:10), 1시간 처리;
- 18: DMSO + FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지, 1시간 처리

19: CAPE (80 μ M) + FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지, 1시간 처리; 및

20: 감마-세크레타제 저해제 (1.5 μ M) + FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지, 1시간 처리.

도 4는 HT29/C1 대장암 세포주에 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M 또는 5 μ l의 CAPE, 80 μ M의 DMSO 또는 1.5 μ M의 감마-세크레타제 저해제, 및 recom ET를 동시에 2시간 동안 처리한 후 E-cadherin의 분절 양상을 확인한 도이다:

13: CAPE (80 μ M) + recom ET (1:10);

14: CAPE (40 μ M) + recom ET (1:10);

15: CAPE (20 μ M) + recom ET (1:10);

16: CAPE (10 μ M) + recom ET (1:10);

17: CAPE (5 μ M) + recom ET (1:10);

18: DMSO + recom ET (1:10);

19: DMSO + FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지;

20: 감마-세크레타제 저해제 (1.5 μ M) + recom ET (1:10); 및

21: 감마-세크레타제 저해제 (1.5 μ M) + FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지.

도 5a 및 도 5b는 HCT116 대장암 세포주에 CAPE 0.4 μ M, 0.8 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M 또는 80 μ M, 및 recom ET를 동시에 처리하거나(도 5a), recom NT, WT-NT, BHIB 또는 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지를 처리하고(도 5b) 1시간 후 NF- κ B 프로모터 활성을 확인한 도이다.

도 6은 HCT116 대장암 세포주에 CAPE 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M 또는 80 μ M, 및 recom ET를 동시에 처리, 또는 5 μ l의 DMSO 또는 1.5 μ M의 감마-세크레타제 저해제, 및 recom ET를 동시에 처리, 또는 recom NT, WT-NT, BHIB 또는 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지를 처리하고 3시간 후 CXCL8의 발현을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015]

이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0016]

본 발명은 카페인산 페네틸 에스테르(caffeic acid phenethyl ester) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 신장 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017]

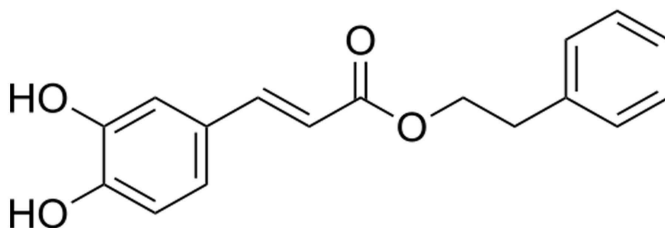
본 발명에서 카페인산 페네틸 에스테르는 당업계에서 공지된 추출 및 분리 방법을 사용하여 벌집, 벌꿀 또는 프로폴리스(Propolis)로부터 추출 및 분리하여 수득하거나, 화학적 합성으로 합성한 것 모두 무방하게 사용될 수 있다.

[0018]

또한, 상기 카페인산 페네틸 에스테르는 하기 [화학적 1]로 기재되는 화합물인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않으며, 카페인산 페네틸 에스테르 유도체도 본 발명에 포함된다.

[0019]

[화학적 1]



[0020]

[0021]

본 발명에서, 상기 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 20 ~ 80 μ M로 함유하는 것이 바람직하고, 40 ~ 80 μ M로 함유하는 것이 보다 바람직하며, 감마-세크레타제 저해제(gamma-secretase

inhibitor)로서, 감마-세크레타제(γ -secretase) 활성을 억제하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 20 μ M 미만 또는 80 μ M 초과하여 함유할 경우 카페인산 페네틸 에스테르가 감마-세크레타제 저해제로서 작용하지 못하여 치료 효과가 미비할 수 있다.

[0022] 본 발명에서, 상기 신장 질환은 예를 들어, 사구체신염, 신부전증, 신우신염, 신장결석, 신세뇨관산증, 다낭성 신증, 단백뇨, 사구체경화증, 신증후군, 당뇨병성 신장 질환, 고혈압성 신장 질환 또는 독성신병증일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0023] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 대장암 세포주에 ETBF가 분비하는 활성 BFT(*Bacteroides fragilis* toxin)와 카페인산 페네틸 에스테르를 동시에 처리한 결과, 카페인산 페네틸 에스테르가 감마-세크레타제 저해제로 작용하여 33 kDa의 E-cadherin 절편을 생성함으로써, ETBF에 의하여 세포에 분포하는 E-cadherin이 분절되어 분해되는 것을 억제하는 것을 확인하였고, 특히 40 ~ 80 μ M 농도에서 카페인산 페네틸 에스테르가 감마-세크레타제 저해제로 작용함을 확인하였다(도 1 내지 도 4 참조).

[0024] 또한, 본 발명자들은 대장암 세포주에 BFT와 카페인산 페네틸 에스테르를 동시에 처리한 결과, 카페인산 페네틸 에스테르가 감마-세크레타제 저해제로 작용하여, ETBF에 의해 E-cadherin이 분해되고 NF- κ B 경로가 활성화되는 것을 억제하는 것을 확인하였고, 특히 40 ~ 80 μ M 농도에서 카페인산 페네틸 에스테르가 감마-세크레타제 저해제로 작용하여 NF- κ B 경로의 활성을 억제하는 효과가 우수함을 확인하였다(도 5a 및 도 5b 참조).

[0025] 또한, 본 발명자들은 대장암 세포주에 BFT와 카페인산 페네틸 에스테르를 동시에 처리한 결과, 카페인산 페네틸 에스테르가 감마-세크레타제 저해제로 작용하여, ETBF에 의하여 E-cadherin이 분해되고 염증 반응과 관련된 CXCL8의 발현이 증가되는 것을 억제하는 것을 확인하였고, 특히 40 ~ 80 μ M 농도에서 카페인산 페네틸 에스테르가 감마-세크레타제 저해제로 작용하여 CXCL8의 발현을 억제하는 효과가 우수함을 확인하였다(도 6 참조).

[0026] 따라서, 본 발명의 카페인산 페네틸 에스테르 농도가 40 ~ 80 μ M일 경우에 감마-세크레타제 활성을 저해하는 감마-세크레타제 저해제로 작용하여 신장 기능 손상을 억제할 수 있음을 확인하였으므로, 상기 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 신장 질환 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 이용할 수 있다.

[0027] 본 발명은 [화학적 1]로 표시되는 카페인산 페네틸 에스테르뿐만 아니라, 이의 약학적으로 허용되는 염, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 라세미체, 또는 입체이성질체를 모두 포함한다.

[0028] 본 발명의 [화학적 1]로 표시되는 카페인산 페네틸 에스테르는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설페이트, 바이설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[0029] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, [화학적 1]로 표시되는 카페인산 페네틸 에스테르를 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시켜서 건조하거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

- [0030] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은 염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.
- [0031] 상기 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.
- [0032] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 화학식 1로 표시되는 카페인산 페네틸 에스테르에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0033] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다.
- [0034] 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0036] 구체적으로, 본 발명에 따른 화합물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 mg 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0037] 또한, 본 발명은 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 신장 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0038] 본 발명에서, 상기 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 0.1 ~ 80 μ M로 함유하는 것이 바람직하고, 20 ~ 80 μ M로 함유하는 것이 보다 바람직하며, 40 ~ 80 μ M로 함유하는 것이 보다 더 바람직하고, 감마-세크레타제 저해제로서, 감마-세크레타제 활성을 억제하는 것이 바람직하다.
- [0039] 본 발명에서, 상기 신장 질환은 예를 들어, 사구체신염, 신부전증, 신우신염, 신장결석, 신세뇨관산증, 다낭성 신증, 단백뇨, 사구체경화증, 신증후군, 당뇨병성 신장 질환, 고혈압성 신장 질환 또는 독성신병증일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0040] 본 발명의 카페인산 페네틸 에스테르 농도가 40 ~ 80 μ M일 경우에 감마-세크레타제 활성을 저해하는 감마-세크레타제 저해제로 작용하여 신장 기능 손상을 억제할 수 있음을 확인하였으므로, 상기 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 신장 질환 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 이용할 수 있다.

- [0041] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0042] 본 발명의 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명의 화합물을 함유하는 것 외에는 다른 성분에 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ㎖당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 15 g이다.
- [0044] 상기 외에 본 발명의 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0045] 이하 본 발명을 실시예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.
- [0046] 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 실험예 및 제조예에 한정되는 것은 아니다.
- [0047] <실시예 1> BFT(*Bacteroides fragilis* toxin)를 처리한 대장암 세포주에서 CAPE에 의한 감마-세크레타제 활성 저해 효과 확인
- [0048] ETBF(Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*)가 분비한 BFT(*Bacteroides fragilis* toxin)에 의하여 세포에 분포하는 E-cadherin이 분절되어 분해되며, 이 때 감마-세크레타제(gamma-secretase)가 33 kDa 크기의 E-cadherin 절편을 28 kDa 크기의 E-cadherin 절편으로 분절하여 세포 내에서 빠르게 분해된다고 알려져 있다. 따라서, BFT를 처리한 감마-세크레타제의 활성화를 유도한 대장암 세포주에서 CAPE의 효과를 알아보기 위하여 다음의 실험을 수행하였다.
- [0049] <1-1> BFT를 처리한 대장암 세포주에서 CAPE에 의한 감마-세크레타제 활성 저해 효과 확인
- [0050] BFT(*Bacteroides fragilis* toxin)를 처리한 대장암 세포주에서 CAPE가 E-cadherin 분절 과정에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다음과 같이 웨스턴 블롯팅 분석을 수행하였다.
- [0051] 구체적으로, HCT116 대장암 세포주를 10 % FBS 및 1 % 페니실린-스트렙토 마이신이 포함된 DMEM 배지로, 37℃,

5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 그 다음, 상기 세포에 CAPE(tokyo chemical industry, JP) 또는 DMSO 80 μM, 및 재조합을 통해 활성화된 BFT인 recom ET (HCT116 대장암 세포주 : recom ET = 1:10) 또는 재조합을 통해 비 활성화된 돌연변이 BFT인 recom NT(HCT116 대장암 세포주 : recom NT = 1:10)를 동시에 1시간 동안 처리한 후 세포를 회수하였다.

[0052] 상기 recom ET는 상기 <실시예 1>에 기재된 방법에서 WT-ETBF 균주 대신 활성화된 BFT 유전자를 포함하는 플라스미드로 재조합된 *B.fragilis* NCTC 9343 균주를 이용하는 것을 제외하고 나머지 과정은 동일하게 진행하고 원심분리한 후 회수한 상층액을 말한다. 상기 recom NT는 상기 <실시예 1>에 기재된 WT-ETBF 균주 대신 *B.fragilis* H352Y 균주를 이용하는 것을 제외하고 나머지 과정은 동일하게 진행하고 원심분리한 후 회수한 상층액을 말한다.

[0053] 또한, 대조군으로 이용하기 위하여 상기 세포에 DMSO 5 μl, 및 BHIB (HCT116 대장암 세포주 : BHIB = 1:10) 또는 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지(serum free media)를 동시에 1시간 동안 처리한 후 세포를 회수하였다.

[0054] 그 다음, 프로테아제 및 포스포타아제 억제제 (Roche, Basel, Switzerland)가 풍부한 RIPA 완충액을 사용하여 상기 회수한 세포를 용해하여 단백질을 분리하였다. 상기 세포의 단백질 용해물(30 μg)을 SDS-PAGE로 전기영동한 후, 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membranes)(PALL Life Sciences)으로 전달시켰다. 그 다음, 일차 항체로 항-E-cadherin 항체, 항-GAPDH를 처리하여 반응시킨 후, 상기 막에 붙은 일차 항체에 HRP-접합 이차 항체를 붙이고, 이를 ECL(BIO-RAD, USA)을 이용하여 확인하였다. 이미지는 FUSION SOLO S chemiluminescence & optional fluorescence imaging (VILBER, France)을 이용하였다(도 1).

[0055] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, CAPE와 BFT를 동시에 처리한 대장암 세포주에서는 33 kDa의 E-cadherin 절편이 생성되는 것을 확인하였다(도 1).

[0056] 이에, CAPE가 감마-세크레타제 활성을 억제하는지 알아보기 위하여, 다음과 같이 웨스턴 블롯팅 분석을 수행하였다.

[0057] 구체적으로, 상기 HCT116 대장암 세포주에 CAPE 80 μM, DMSO 5 μl 또는 감마-세크레타제 저해제(gamma-secretase inhibitor, L-685, 458; Calbiochem, SanDiego, CA) 1.5 μM, 및 recom ET (HCT116 대장암 세포주 : recom ET = 1:10)를 동시에 30분 또는 1시간 동안 처리한 후 세포를 회수하였다. 또한, 대조군으로 이용하기 위하여, 상기 HCT116 대장암 세포주에 CAPE 80 μM, DMSO 5 μl 또는 감마-세크레타제 저해제 1.5 μM, 및 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지(serum free media)를 동시에 1시간 동안 처리한 후 세포를 회수하였다. 그 다음, 상기에 기재된 방법과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯팅 분석을 수행하였다(도 2).

[0058] 또한, 또 다른 대장암 세포주인 HT29/C1 세포주에 10 % FBS 및 1 % 페니실린-스트렙토 마이신이 포함된 DMEM 배지로, 37℃, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 그 다음, 상기에 기재된 방법과 동일한 방법으로 CAPE, DMSO 또는 감마-세크레타제 저해제, 및 recom ET 또는 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지를 동시에 30분 또는 1시간 동안 처리한 후 세포를 회수하여 웨스턴 블롯팅 분석을 수행하였다(도 3).

[0059] 그 결과, 도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, HCT116 대장암 세포주에서 CAPE 및 BFT를 동시에 처리한 그룹과 감마-세크레타제 저해제 및 BFT를 동시에 처리한 그룹 모두 33 kDa의 E-cadherin 절편을 형성하는 것을 확인하였다(도 2, 라인 7, 9, 10 및 12). 또한, HT29/C1 대장암 세포주에서도 CAPE 및 BFT를 동시에 처리한 그룹과 감마-세크레타제 저해제 및 BFT를 동시에 처리한 그룹 모두 33 kDa의 E-cadherin 절편을 형성하는 것을 확인하였다(도 3, 라인 12, 14, 15 및 17). 따라서, 상기 결과를 통해 CAPE가 감마-세크레타제 활성을 저해하는 감마-세크레타제 저해제로 작용하여 BFT에 의해 E-cadherin이 분해되는 것을 억제함을 확인하였다.

[0060] <1-2> BFT를 처리한 대장암 세포주에서 CAPE 처리 농도에 의한 감마-세크레타제 활성 억제 효과 확인

[0061] CAPE의 농도에 따른 감마-세크레타제 활성 억제 효과를 알아보기 위하여, 다음과 같이 웨스턴 블롯팅 분석을 수행하였다.

[0062] 구체적으로, HT29/C1 세포주에 10 % FBS 및 1 % 페니실린-스트렙토 마이신이 포함된 DMEM 배지로, 37℃, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 그 다음, 상기 세포주에 5 μM, 10 μM, 20 μM, 40 μM 또는 80 μM의 CAPE, 5 μl의 DMSO 또는 1.5 μM의 감마-세크레타제 저해제, 및 recom ET (HCT116 대장암 세포주 : recom ET = 1:10)를 동시

에 2시간 동안 처리한 후 세포를 회수하였다. 또한, 대조군으로 이용하기 위하여, 상기 HT29/C1 대장암 세포주에 DMSO 80 μ M 또는 감마-세크레타제 저해제 1.5 μ M, 및 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지(serum free media)를 동시에 2시간 동안 처리한 후 세포를 회수하였다. 그 다음, 상기 실시예 <3-2>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯팅 분석을 수행하였다(도 4).

[0063] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, CAPE를 40 ~ 80 μ M로 처리한 경우 33 kDa의 E-cadherin 절편이 생성되는 것을 확인하였다. 따라서, 상기 결과를 통해 CAPE 농도가 40 ~ 80 μ M일 경우에 감마-세크레타제 활성을 저해하는 감마-세크레타제 저해제로 작용함을 확인하였다(도 4).

[0064] <실시예 2> BFT를 처리한 대장암 세포주에서 CAPE 처리에 의한 NF- κ B 활성 억제 확인

[0065] BFT를 처리한 대장암 세포주에서 CAPE가 NF- κ B 경로에 미치는 영향을 알아보기 위하여, BFT를 처리한 대장암 세포주에 CAPE를 처리한 후 NF- κ B 프로모터 활성을 측정하였다.

[0066] 구체적으로, HCT116 세포를 10 % FBS 및 1 % 페니실린-스트렙토 마이신이 포함된 DMEM 배지로, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 그 다음, NF- κ B-루시페라아제(luciferase)를 상기 세포에 SureENTRY transduction reagent를 사용하여 형질감염하였다. 그 다음, CAPE 0.4 μ M, 0.8 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M 또는 80 μ M, 및 recom ET를 동시에 처리하고 24시간 후 PBS로 세척하였다(도 5a). 또한, 대조군으로 이용하기 위하여, 상기 HCT116 세포주에 recom NT, WT-NT, BHIB 또는 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지만 처리하고 1시간 후 PBS로 세척하였다(도 5b). 상기 WT-NT는 상기 <실시예 1>에 기재된 방법에서 WT-ETBF 균주 대신 *B. fragilis* NCTC 9343 균주를 이용하는 것을 제외하고 나머지 과정은 동일하게 진행하고 원심분리한 후 회수한 상층액을 말한다.

[0067] 그 후, 루시페라아제 활성을 luciferase reporter assay (Promega, WI)를 이용하여 측정하였다.

[0068] 그 결과, 도 5a 및 도 5b에 나타난 바와 같이, recom ET만 처리한 그룹에서는 E-cadherin의 분해로 인해 NF- κ B 경로가 활성화 되어 NF- κ B의 전사 활성이 증가하는 반면, recom ET와 40 ~ 80 μ M의 CAPE를 동시에 처리한 그룹에서는 CAPE가 감마-세크레타제 저해제로 작용하여 E-cadherin 분해가 억제되고, 그 결과 NF- κ B 경로의 활성화도 억제되어 NF- κ B의 전사 활성이 현저히 감소하는 것을 확인하였다(도 5a 및 도 5b).

[0069] <실시예 3> BFT를 처리한 대장암 세포주에서 CAPE 처리에 의한 CXCL8 발현 억제 확인

[0070] BFT를 처리한 대장암 세포주에서 CAPE가 염증 반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여, BFT를 처리한 대장암 세포주에 CAPE를 처리한 후 CXCL8의 발현을 측정하였다.

[0071] 구체적으로, HCT116 세포를 10 % FBS 및 1 % 페니실린-스트렙토 마이신이 포함된 DMEM 배지로, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 그 다음, CAPE 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M 또는 80 μ M, 및 recom ET를 동시에 처리하고 3시간 후 PBS로 세척하고 세포를 회수하였다. 또한, 상기 HCT116 대장암 세포주에 CAPE 80 μ M, DMSO 5 μ l 또는 감마-세크레타제 저해제(gamma-secretase inhibitor) 1.5 μ M, 및 recom ET (HCT116 대장암 세포주 : recom ET = 1:10) 또는 recom NT를 동시에 처리하고 3시간 후 PBS로 세척하고 세포를 회수하였다. 또한, 대조군으로 이용하기 위하여, 상기 HCT116 대장암 세포주에 recom NT, WT-NT, BHIB 또는 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지(serum-free media)를 처리하고 3시간 후 PBS로 세척하고 세포를 회수하였다. 그 후, 상기 회수한 세포를 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 총 RNA를 분리한 후, 분리한 RNA 1을 고용량 cDNA 역전사 키트 (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 제조사의 절차에 따라 cDNA를 합성하였다. 상기 cDNA는 Taqman-probe(GAPDH; Cat number:4331182, CXCL8; Cat number:4331182, Themofisher)를 이용하여 실시간 q-PCR을 수행하였다. Q-PCR은 Applied Biosystems의 2x real-time PCR 마스터(Foster City, CA, USA)를 사용하여 수행하였다(도 6).

[0072] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, recom ET만 처리한 그룹에서는 E-cadherin의 분해로 인해 CXCL8의 발현이 증가하는 반면, recom ET와 40 ~ 80 μ M의 CAPE를 동시에 처리한 그룹에서는 CAPE가 감마-세크레타제 저해제로 작용하여 E-cadherin 분해가 억제되고, 그 결과 CXCL8의 발현이 억제되는 것을 확인하였다(도 6).

[0073] 따라서, 상기 <실시에 1> 내지 <실시에 3>의 결과를 통해 CAPE 농도가 40 ~ 80 μ M일 경우에 감마-세크레타제 활성을 저해하는 감마-세크레타제 저해제로 작용하여, 신장 기능 손상을 억제할 수 있음을 확인하였으므로, 상기 CAPE를 신장 질환 치료에 이용할 수 있음을 확인하였다.

[0074] 이하, 본 발명에 따른 각 제제의 제조예를 예시한다. 하기 제조예는 본 발명의 실시예에 대한 이해를 돕기 위한 것이지 본 발명에 따른 제형의 제조방법이 하기 제조예로 한정되는 것을 의미하지 않는다.

[0075] <제조예 1> 약학적 제제의 제조

[0076] <1-1> 산제의 제조

[0077]	CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염	2 g
[0078]	유당	1 g

[0079] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0080] <1-2> 정제의 제조

[0081]	CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염	10 mg
[0082]	옥수수전분	100 mg
[0083]	유 당	100 mg
[0084]	스테아린산 마그네슘	2 mg

[0085] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0086] <1-3> 캡슐제의 제조

[0087]	CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염	10 mg
[0088]	옥수수전분	100 mg
[0089]	유 당	100 mg
[0090]	스테아린산 마그네슘	2 mg

[0091] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0092] <1-4> 환의 제조

[0093]	CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염	1 g
[0094]	유당	1.5 g
[0095]	글리세린	1 g
[0096]	자일리톨	0.5 g

[0097] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0098] <1-5> 과립의 제조

[0099]	CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염	1 g
--------	--------------------------	-----

- [0100] 포도당 200 mg
- [0101] 전분 600 mg
- [0102] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 200 mg을 첨가하여 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.
- [0103] <제조예 2> 건강식품의 제조
- [0104] 본 발명의 CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.
- [0105] <2-1> 밀가루 식품의 제조
- [0106] 본 발명의 CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 0.5 내지 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.
- [0107] <2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조
- [0108] 본 발명의 CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 0.1 내지 5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.
- [0109] <2-3> 유제품(dairy products)의 제조
- [0110] 본 발명의 CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 5 내지 10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.
- [0111] <2-4> 전식의 제조
- [0112] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.
- [0113] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.
- [0114] 본 발명의 CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.
- [0115] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.
- [0116] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),
- [0117] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),
- [0118] CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염(3 중량부),
- [0119] 영지(0.5 중량부),
- [0120] 지황(0.5 중량부)
- [0121] <제조예 3> 건강음료의 제조
- [0122] <3-1> 건강음료의 제조
- [0123] 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 5 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 팩트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[0124] <3-2> 야채 주스의 제조

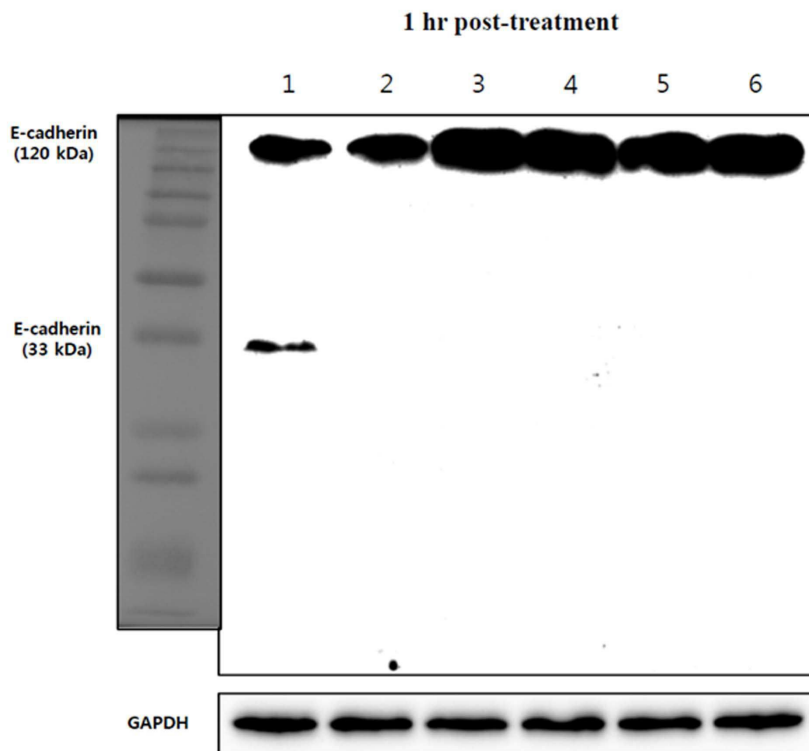
[0125] 본 발명의 CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

[0126] <3-3> 과일 주스의 제조

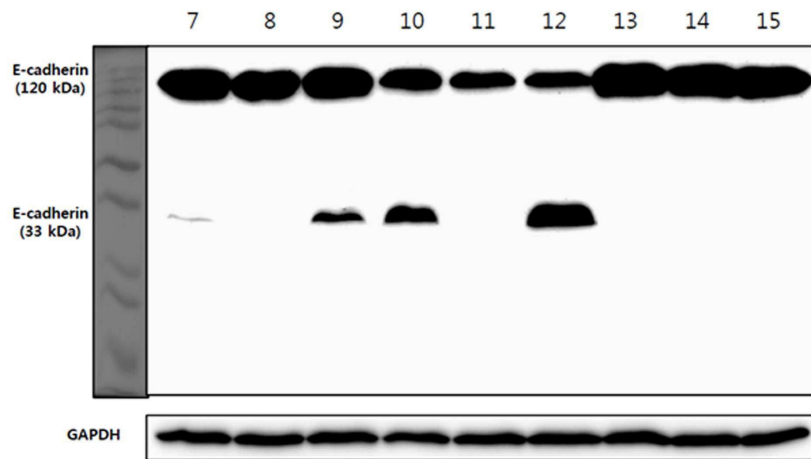
[0127] 본 발명의 CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

도면

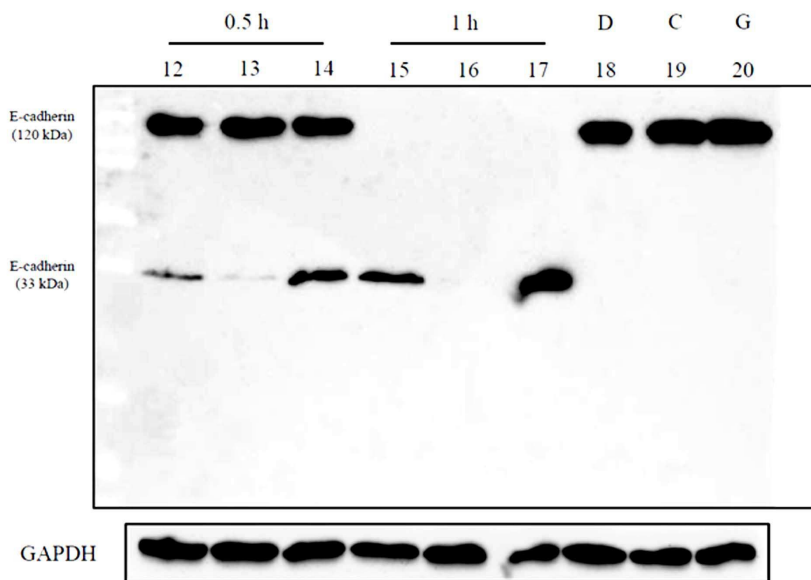
도면1



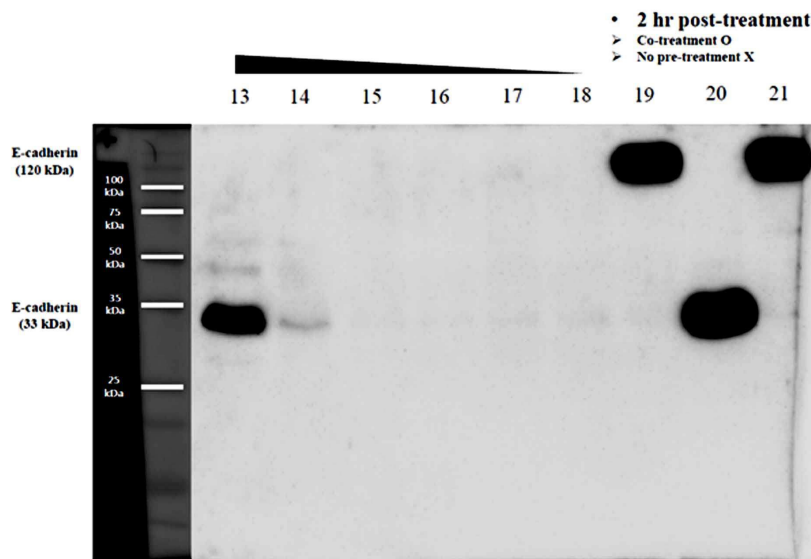
도면2



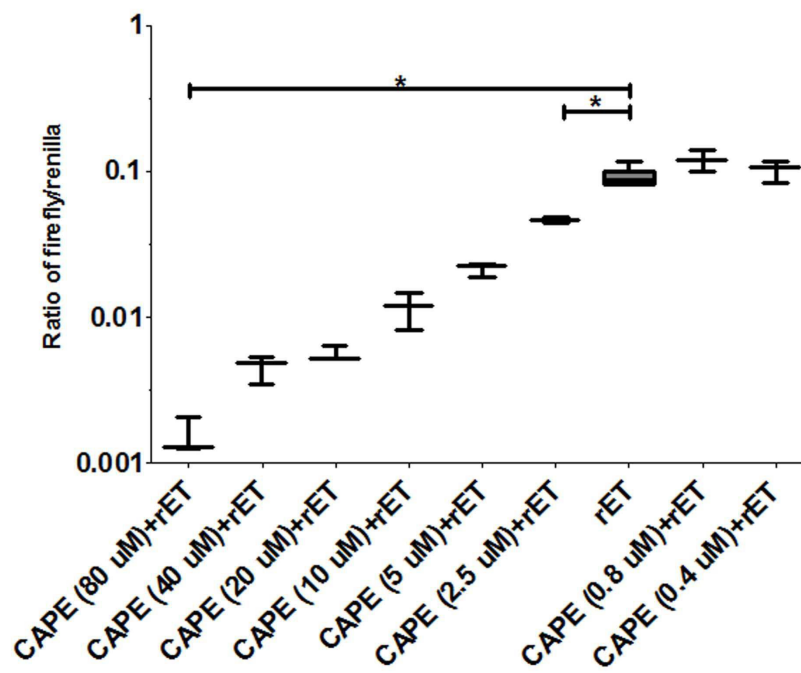
도면3



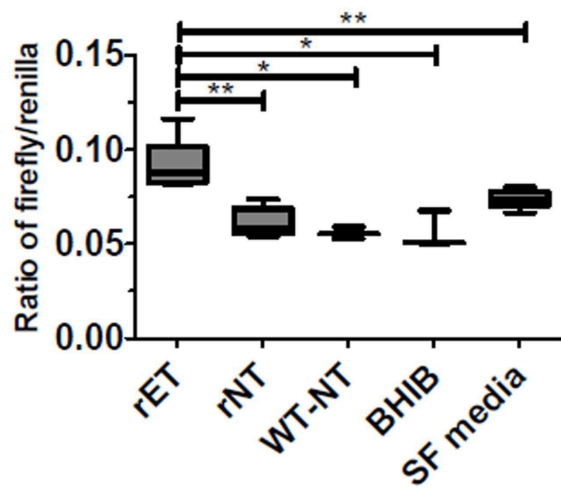
도면4



도면5a



도면5b



도면6

