



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년11월05일

(11) 등록번호 10-1566552

(24) 등록일자 2015년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 C07C 69/675 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)  
 A61P 9/10 (2006.01) C07C 69/34 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2009-0021652  
 (22) 출원일자 2009년03월13일  
 심사청구일자 2013년08월27일  
 (65) 공개번호 10-2010-0103174  
 (43) 공개일자 2010년09월27일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 KR100633682 B1\*  
 KR1020060037066 A\*  
 US20080206341 A1  
 KR1020070100733 A  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
 영남대학교 산학협력단  
 경상북도 경산시 대학로 280 (대동)  
 (72) 발명자  
 조경현  
 대구광역시 수성구 달구벌대로669길 70, 104동 605호 (사월동, 시지6차태왕리더스)  
 이기택  
 대전광역시 유성구 어은로 57, 107동 1204호 (어은동, 한빛아파트)  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
 위병갑

전체 청구항 수 : 총 3 항

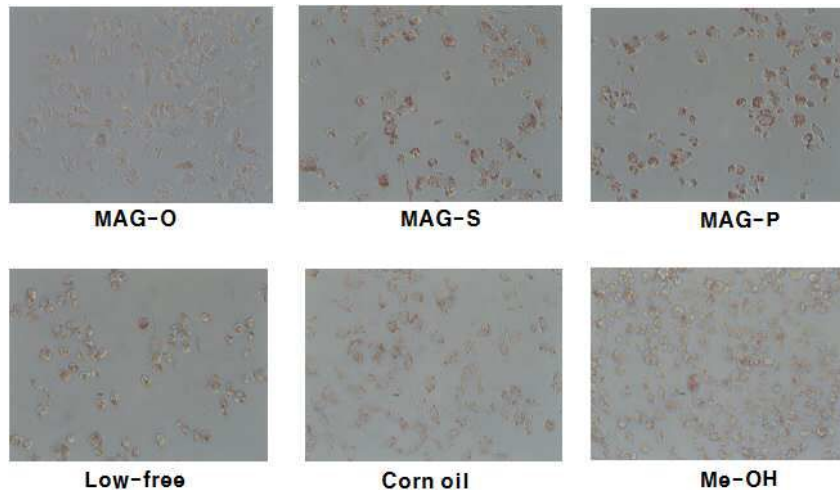
심사관 : 방성철

(54) 발명의 명칭 **항산화, 항동맥경화 및 항당뇨 효과가 우수한 기능성 리피드**

(57) 요약

본 발명은 항산화, 항동맥경화 및 항당뇨 효과가 우수한 기능성 리피드에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 항산화능, 항동맥경화능 및 항당뇨능이 모노아실글리세롤(Monoacylglycerol-fatty acid), 디아실글리세롤(diacylglycerol), 트리아실글리세롤(triacylglycerol)에 비해 월등히 우수한 모노아실글리세롤(monoacylglycerol)의 1번 위치에 지방산으로 올레인산(oleic acid), 팔미틴산(palmitic acid) 또는 스테아린산(stearic acid)이 결합된 기능성 리피드에 관한 것이다.

대표도 - 도11



(72) 발명자

**이정희**

대전광역시 유성구 어은로 57, 107동 1204호 (어은동, 한빛아파트)

**윤채욱**

서울특별시 서초구 동광로 157, 301호 (반포동, 비엔에프르)

**김재룡**

대구광역시 달서구 비슬로 2724, 한라하우젠트 102동 2302호 (대곡동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R13-2005-005-01003-0 (2013)

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 교육과학기술부

연구사업명 교육과학기술부 의과학연구센터 (MRC) 사업

연구과제명 노인성혈관질환 연구

기 여 율 1/1

주관기관 영남대학교 산학협력단

연구기간 2007.03.01 ~ 2014.02.28

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

모노아실글리세롤-올레인산(monoacylglycerol-oleic acid)을 유효성분으로 함유하는 항동맥경화 조성물.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

모노아실글리세롤-올레인산(monoacylglycerol-oleic acid)을 유효성분으로 함유하는 항동맥경화 건강식품.

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

청구항 1의 모노아실글리세롤-올레인산(monoacylglycerol-oleic acid)을 포함하는 것을 특징으로 하는 프로테오 리포솜.

**발명의 설명**

**발명의 상세한 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 항산화, 항동맥경화 및 항당뇨 효과가 우수한 기능성 리피드에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 새로운 식용 가능한 유지(油脂) 및 오일(oil), 의약품/화장품, 유전자 치료제등의 전달을 위한 리피드(lipid) 개발을 위하여 트리아실글리세롤로부터 디아실글리세롤, 모노아실글리세롤을 생산하고, 글리세롤 골격에 결합되는 지방산을 탄소길이와 이중결합 유무에 따라 다양하게 바꾸어 구조 지방산(structured lipid) 혹은 새로운 기능성 리피드를 개발하고자 하는 연구가 진행되어 왔다.

[0003] 그러나, 트리아실글리세롤(triacylglycerol, TAG), 디아실글리세롤(diacylglycerol, DAG) 혹은 모노아실글리세롤(monoacylglycerol, MAG)의 골격에 결합된 지방산을 다양하게 재구성하여 항산화, 항동맥경화 효과를 조사한 문헌이나 특허는 아직 없다.

**발명의 내용**

**해결 하고자하는 과제**

[0004] 이에, 본 발명자들은 MAG의 골격에 생리적으로 적용 가능한 다양한 지방산을 결합시켜 다양한 종류의 기능성 리피드를 생산하였으며, 이들의 생리적 활성을 항산화, 항동맥경화, 항당뇨 효과에 대하여 비교한 결과, 올레인산, 팔미틴산 또는 스테아린산이 결합된 경우에 DAG 혹은 TAG 보다 우수한 항산화, 항동맥경화, 항당뇨 활성을 보였으며, 그 중에서도 올레익산이 결합된 MAG(MAG-O)가 가장 우수한 항산화, 항동맥경화 및 항당뇨 활



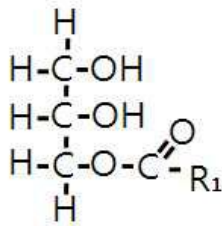
- [0018] 상기 화학식 1에서 R은 올레인산(oleic acid), 팔미틴산(palmitic acid) 또는 스테아린산(stearic acid)이다.
- [0019] 상기 기능성 리피드가 항산화, 항당뇨 및 항동맥경화 효과를 나타내므로, 이들을 포함하는 본 발명의 조성물은 당뇨병, 동맥경화증 등의 치료 또는 예방, 식품의 유지 및 피부의 산화에 의한 손상을 방지, 주름 및 미백 개선 등에 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물을 사용하여 통상적인 방법에 따라 약학 제형을 제조할 수 있다. 제형의 제조에 있어, 활성 성분을 담체와 함께 혼합하거나, 담체로 희석하거나, 캡셀, 새세이 또는 기타 용기 형태의 담체 내에 봉입시키는 것이 바람직하다. 따라서, 제형은 정제, 환제, 분제, 새세이, 엘릭시르, 현탁제, 에멀전, 액제, 시럽제, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀제, 주사용 용액 또는 현탁액, 연고제, 크림제, 겔제 또는 로션제 등의 형태일 수 있다.
- [0021] 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제형은 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당 업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화 될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 조성물에 포함되는 기능성 리피드의 유효량은 2 mg/kg 내지 20 mg/kg이다. 바람직하게는 5 내지 10 mg/kg 의 범위가 통상적이며, 일부 질환에 따라 더 높은 일일 투여량이 요구될 수 있다. 또한, 특정 환자에 대한 특이 용량 수준은 사용될 특정 화합물, 체중, 연령, 성, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률, 약제 혼합 및 질환의 중증도에 따라 변화될 수 있다.
- [0023] 상기 유효성분으로 포함하는 조성물은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여할 수 있으며, 일반적인 의약품, 의약품 및 건강식품 등의 형태로 사용될 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명의 기능성 리피드를 각종 식품의 건조중량에 대하여 0.05 ~ 90 중량%의 함량으로 배합하여 활성산소 유발 억제용 건강식품을 제조할 수도 있다.
- [0025] 본 발명의 기능성 리피드는 활성이 우수하여 산화에 의해서 일어나는 식품의 냄새나 풍미의 변화, 유지의 산패, 그리고 식품의 변색을 효과적으로 방지할 수 있다. 따라서, 기능성 리피드를 종래의 각종 식품류에 배합함으로써 이들 식품류를 보존하거나 식품의 신선도 및 품질을 장기간에 걸쳐 유지하기 위해 사용할 수 있다.
- [0026] 또한, 여기에서 건강식품으로는 과자, 가공식품, 조합 유지, 유제품, 음료 등의 각종 식품을 들 수 있고, 형상·성상도 특별히 제한되지 않아 고체 형상, 반고체 형상, 겔 형상, 액체 형상, 분말 형상 등 어느 것이라도 된다.
- [0027] 한편, 본 발명의 기능성 리피드를 포함하고 항산화 활성을 가지는 화장료를 포함한다. 본 발명의 기능성 리피드는 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 기제, 보조제 및 첨가제를 사용하여 액체 또는 고체 형태로 제조될 수 있다. 액체 또는 고체 형태의 화장료로는 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 화장수, 크림제, 로션제 및 입욕제 등의 형태를 포함할 수 있다. 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 기제, 보조제 및 첨가제는 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, 물, 알코올, 프로필렌글리콜, 스테아르산, 글리세롤, 세틸알코올 및 유동 파라핀 등을 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명에 따른 화장품 조성물은 피부의 산화에 의한 손상, 예를 들면, 반점(갈색반), 주근깨, 피부균열, 자외선 손상(햇볕에 탐) 등의 미백 개선에 매우 유용하며, 화장품 자체의 산화를 방지함으로써 화장품의 품질을 유지하는데도 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [0029] 특히, 본 발명의 기능성 리피드는 약물전달체 또는 유전자 전달체로서 프로테오리포솜의 형태로 의약품, 화장품, 식품 등에 적용될 수 있다.
- [0030] 이하, 본 발명을 다음 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명하겠는 바, 본 발명이 다음 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

**실시예**

**실시예 1: 새로운 리피드의 합성 및 분석**

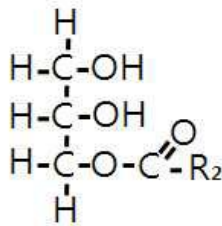
11.4% 팔미틴산, 32.6% 올레익산, 53.6% 리놀렌산, 1.3% 스테아릭산 및 미량 지방산들로 구성된 옥수수유를 글리세롤과 고정화된 Lipase RMIM(Rhizomucor miehei에서 유래된 lipase의 고정화된 형태)을 이용하여 효소적 반응 후, TAG, DAG, 및 MAG가 주요 반응 산물이었고, 이들을 칼럼크로마토그래피로 각각 분리하였다. 이때, MAG를 구성하고 있는 지방산은 가스 크로마토그래피로 분석하였으며, 48.3% 리놀렌산, 36.6% 올레익산, 12.0% 팔미틴산, 1.9% 스테아린산 및 미량 지방산이었다. 이들을 각각 HPLC를 이용하여 고순도로 분리한 결과, MAG-O(Monoacylglycerol-oleic acid, MW=356.6, 화학식 1a), MAG-S(Monoacylglycerol-stearic acid, MW=358.6, 화학식 1b), MAG-P(Monoacylglycerol-palmitic acid, MW=330.5, 화학식 1c)를 각각 분리하였다.

[화학식 1a]



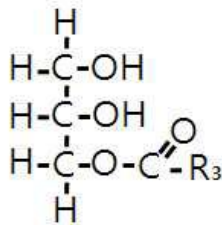
상기 화학식 1a에서 R<sub>1</sub>은 올레익산(oleic acid)이다.

[화학식 1b]



상기 화학식 1b에서 R<sub>2</sub>는 스테아린산(stearic acid)이다.

[화학식 1c]



상기 화학식 1c에서 R<sub>3</sub>은 팔미틴산(palmitic acid)이다.

상기 3종의 리피드는 메탄올(Me-OH)에 녹여서 기능 분석 실험에 사용하였으며, 세포실험 시에는 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹여서 사용하였다.

- [0043] **실시예 2: 항산화 활성 확인**
- [0044] 본 발명에서 생산된 기능성 리피드들의 항산화 활성을 비교하기 위해 라디칼이온을 소거하는 능력을 측정하였다.
- [0045] 1) DPPH 라디칼 소거능 확인
- [0046] DPPH 라디칼 소거 능력을 비교하기 위해, 선행논문[Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol* 1995;28:25-30]에 따라 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)을 2.4 mg을 100 mL의 메탄올에 녹여 자유라디칼 용액을 만들고, 0.95 mL의 DPPH 용액과 0.05 mL의 기능성 리피드(최종 농도0.056 mM) 용액을 혼합하여 석영 큐벳으로 분광광도계(DU 800 spectrophotometer) 515 nm 의 흡광도를 10분간 측정하였다.
- [0047] 도 1에서와 같이, MAG-O 오일이 최초 흡광도에서 35% 감소하는 우수한 라디칼 소거 능력을 보여주었다,
- [0048] 2) DMPD 라디칼 소거능 확인
- [0049] 라디칼 소거 능력을 비교하는 두 번째 방법으로 위해, 선행논문[Fogliano V, Verde V, Randazzo G, Ritieni A: Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J Agric Food Chem*1999;47:1035-1040]에 따라 DMPD 라디칼 21 mg의 DMPD (4-amino-N,N-dimethylaniline dihydrochloride, Fluka 07767; Fluka Chemicals, Buchs, Switzerland)을 1 mL의 물에 녹인 후 100 mL의 0.1 M 아세테이트 버퍼와 0.5 mL의 20 mM 염화제2철(ferric chloride) 용액에 혼합하여 라디칼 용액을 만들고, 라디칼 용액 0.95 mL과 리피드 용액 0.05 mL을 혼합하여 505 nm의 흡광도를 분광광도계(DU 800 spectrophotometer)를 사용하여 10분간 측정하였다.
- [0050] 도 2에서 보는 바와 같이, 최종 농도 0.056 mM이 첨가된 조건에서 MAG-O는 초기 흡광도에 비해 22%의 흡광도 감소를 보여 우수한 항산화 활성을 보여주었다.
- [0051] 3) FRAP 분석
- [0052] 선행논문에 따라[Benzie IF, Strain JJ: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996;239:70-76] 철 이온 환원능력을 시험하기 위해, 25 mL의 0.2 M 아세테이트 버퍼(pH 3.6)와 2.5 mL의 10 mM 2,4,6-TPTZ(tripyridyl-s-triazine; Fluka Chemicals), 그리고 2.5 mL의 20 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O를 혼합하여 철 이온 용액을 만들고, 철이온 용액 0.3 mL와 리피드 용액 0.03 mL을 혼합하여 철 이온이 환원되면서 나타나는 흡광도의 증가를 593 nm의 파장에서 비교하였다.
- [0053] 그 결과, MAG-O가 초기 값에 비해 73%의 증가를 보여 가장 우수한 철 이온 환원 항산화 활성을 보여주었다[도 3].
- [0054] **실시예 3: 사람 혈청으로부터 저밀도 지단백질 분리**
- [0055] 영남대학교 부속의료원 혈액은행에서 공급 받은 사람 혈청(300 mL)에 NaCl을 첨가하여 혈청의 밀도를 1.019로 조정하여 24시간 동안 초원심분리(100,000 g, Hitachi Himac CP-90 alpha)를 통해 최저밀도지단백질(VLDL)을 분리하고, 남은 용액에 KBr을 첨가하여 밀도를 1.063으로 조정하여 다시 24시간 동안 초원심분리를 통해 저밀도 지단백질(LDL)(1.019<d<1.063)을 분리하였다. 분리된 LDL은 포스페이트버퍼 등장액(phosphate buffered saline, pH 7.4)을 사용하여 투석하고, Markwell 등의 방법[Markwell MAK, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem.* 1978; 87:206-210]에 따라 단백질의 양을 정량하여 4 °C의 냉암소에 보관하여 사용하였다.
- [0056] **실시예 4: 구리이온 처리에 의한 LDL 산화 활성 비교**
- [0057] 상기 실시예 3에서 분리된 신선한 LDL(0.1 mg 단백질)을 0.01 mM의 CuSO<sub>4</sub>와 2시간 동안 37 °C에서 반응시켜 구리이온에 의한 산화를 유도하고, 상기 실시예 1에서 합성한 리피드들을 최종 농도 0.056 mM 되도록 첨가하여 Esterbauer 등의 방법에 따라 항산화 효과를 비교하였다[Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M:



Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun* 1989;6:67-75]. 산화의 생성물인 conjugated diene의 양을 분광광도계 흡광도 234 nm에서 정량하여 그 결과 도 4에서와 같이 PBS를 처리한 대조군 LDL(산화된 LDL)이 10%의 증가율을 보이는데 비해, 리피드들을 처리한 LDL들은 흡광도가 증가하지 않아 산화 억제 효과가 있으며, 그 중에서도 MAG-0가 17%의 감소율을 보여 우수한 LDL 산화 억제 활성을 보여주었다. 이 결과는 산화 억제의 능력이 리피드 중에 따라 차이가 있음을 시사하고 있다. 이러한 차이를 확인하기 위해, 각 실험군과 대조군의 LDL들을 일정량 씩(0.02 mg 단백질) 취하여 전기영동 상에서의 이동상의 차이를 Noble의 방법에 따라 0.5% 아가로스 겔 전기영동으로 확인하였다[Noble RP: Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gel. *J Lipid Res* 1968;9:693-700]. 산화가 많이 진행될수록 LDL의 전하가 증가하며 입자크기가 감소하여 전기장에서의 이동속도가 빨라진다.

[0058]

도 5와 같이, 모든 리피드들이 native LDL과 유사한 이동성을 보여 항산화 활성이 있으며, 그 중에서도 MAG-0를 처리한 LDL이 오히려 native LDL 보다 더 느린 이동성을 보여주어 LDL의 항산화 효과 개선에 크게 기여하는 것으로 나타났다. PBS를 처리하여 산화가 유도된 LDL(라인 0)은 가장 빠른 이동상을 보여주어 도 4의 결과와 잘 일치함을 알 수 있었다.

[0059]

**실시예 4: 파라옥소나아제 활성화 비교**

[0060]

혈청 내에 존재하는 효소인 파라옥소나아제(paraoxonase)는 산화된 지방산들을 제거 절단하는 기능으로 동맥경화 진행 억제와 항산화 활성 유지에 기여하므로, 본 발명에서 합성된 리피드들이 파라옥소나아제를 활성화 시키는지를 선행논문에서 따라[, , . The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet.* 1983;35:1126-1138] 비교하였다. 사람의 혈청 0.01 mL과 상기 실시예 1에서 합성된 리피드를 각각 0.2 mL의 기질용액(paraoxon-ethyl/90 mM Tris-HCl/3.6 mM NaCl/2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH8.5)을 혼합하여 37 °C에서 1시간 동안 반응시켜 생성되는 *p*-nitrophenol의 양을 405 nm의 흡광도에서 정량하여 효소활성화량(U/L)을 계산하였다. 이때, *p*-nitrophenol의 분자흡광계수는 17000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>을 사용하였다.

[0061]

도 7에서 보는 바와 같이, MAG-S와 MAG-P가 농도 의존적으로 단위 시간당 가장 높은 효소 활성을 보여 0.037 mM이 처리되었을 때 42~44 U/L의 활성화량을 보여주었다. 같은 처리농도에서 MAG-0는 25 U/L의 활성화량을, low-free oil은 18 U/L, corn oil은 10 U/L의 활성화량을 보여 주었다.

[0062]

**실시예 5: 저밀도지단백질 부착 인산분해효소 활성 비교**

[0063]

저밀도지단백질에 부착된 인산분해 효소(Low-density Lipoprotein-associated phospholipase)는 동맥경화를 일으키는 주요 원인이므로 [Packard CJ, O'Reilly DSJ, Caslake MJ, McMahon AD, Ford I, Cooney J, Macphee CH, Suckling KE, Krishna M, Wilkinson FE, Rumley A, Lowe GDO. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *NEnglJMed.*2000;343:1148-1155], 상기 실시예 3에서 분리한 LDL 분획(0.01 mL, 0.02 mg)을 효소원으로 Boyd 등의 방법[Boyd HF, Fell SCM, Flynn ST, Hickey DMB, Ife RJ, Leach CA, Macphee CH, Milliner KJ, Moores KE, Pinto IL, Porter RA, Rawlings DA, Smith SA, Stansfield IG, Tew DG, Theobald CJ, Whittaker CM. N-1 substituted pyrimidin-4-ones: novel, orally active inhibitors of lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub>. *BioorgMedChemLett.*2000;10:2557-2561]에 따라 [<sup>3</sup>H]-platelet activating factor(hexadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine, Perkin-Elmer, NET910, 0.1 mCi/mL)와 1-O-헥사데실-2-아세틸-sn-글리세로-3-포스포콜린을 기질로 사용하고 리피드를 첨가하여 0.3 mL의 용액에서 1시간 동안 반응한 다음, 0.6 mL의 클로로포름:메탄올 용액(2:1, v/v)을 첨가하여 원심분리 후 반응을 중단시키고, 상등액을 취하여 클로로포름과 혼합하고 원심분리 후 상등액을 취하여 섬광계수기(Scintillation counting) 측정으로 LDL-PLA2의 저해 활성을 계산하였다.

[0064]

도 6에서 보는 바와 같이, MAG-0가 농도 의존적으로 0.037 mM이 첨가된 조건에서 40% 이상의 저해율을 보여, 같은 농도에서 MAG-S와 MAG-P 보다 두 배 가까운 저해율을 보였다. 같은 농도조건에서 DAG와 TAG는 저해 활성을 보이지 않아, MAG가 LDL-PLA2를 특이적으로 저해함을 보여주었다.



[0065]

**실시예 6: apoA-I의 순수 분리**

[0066]

혈액은행에서 제공받은 사람의 혈청을 Brewer의 방법[Brewer HB, Ronan R, Meng M, Bishop C: Isolation and characterization of apolipoprotein A-I, A-II, and A-IV. *Meth.Enzymol.*1986;28:223-246]에 따라 초원심분리와 칼럼크로마토그래피의 방법에 따라 apoA-I(28 kDa)를 분리하였고, 전기영동으로 순도를 확인한 결과, 도 8에서 보는 바와 같이 95% 이상의 매우 순수한 apoA-I임을 확인하였고, 순수 분리된 apoA-I를 -80 °C에서 보관하면서 다음 실험에 사용하였다.

[0067]

**실시예 7: apoA-I 당화 저해 활성 비교**

[0068]

단백질의 당화(glycation)는 당뇨가 진행되는 초기의 메카니즘이며[Gugliucci A: Glycation as the glucose link to diabetic complications. *J Am Osteopath Assoc* 2000;100:621-634], 특히 혈청 아포리포프로테인 A-I의 당화는 당뇨와 동맥경화의 공통적인 유발 원인이 된다[Hoang A, Murphy AJ, Coughlan MT, Thomas MC, Forbes JM, O'Brien R, Cooper ME, Chin-Dusting JP, Sviridov D: Advanced glycation of apolipoprotein A-I impairs its anti-atherogenic properties. *Diabetologia*2007;50:1770-1779]. 본 발명에서 제공하는 리피드들이 apoA-I의 당화를 억제하는지를 조사하기 위하여, McPherson 등의 방법 [McPherson JD, Shilton BH, Walton DJ: Role of fructose in glycation and crosslinking of proteins. *Biochemistry*1988;27:1901-1907]에 따라 최종 농도 250 mM의 과당(Fructose)을 0.09 mL의 apoA-I(10 mg/mL)에 첨가하여 5%의 CO<sub>2</sub>-배양기에 90시간 반응시켜 당화를 유발하면서, 상기 실시예 1에서 합성한 리피드(0.01 mL, 최종 농도 0.2 혹은 2 mg/mL)들을 첨가하여 apoA-I 당화를 저해하는지를 비교하였다. 당화가 일어나면서 생기는 형광 세기(fluorometric intensity)를 Spectrofluorometer(Perkin-Elmer LS55 model)와 WinLab 4.0 software package를 사용하여 370 nm(Excitiation)와 440 nm(Emission)의 파장에서 검출하여 다음 수학적 식 1에 따라 당화 저해율을 계산하였다.

[0069]

[수학적 식 1]

$$\text{당화 저해율(\%)} = \frac{1 - (\text{시료의 형광활성} - \text{공시료의 형광활성})}{\text{음성대조군의 형광활성} - \text{공시료의 형광활성}} \times 100$$

[0070]

도 9에서 보는 바와 같이, 2 mg/mL(최종 농도)의 농도 처리에서 모든 MAG들이 73-78%의 저해율을 보이는데 비해, DAG는 거의 저해 활성을 보이지 않았으며, corn oil은 대략 25%의 저해율을 보여 주었다.

[0071]

[0072]

apoA-I 단백질의 당화가 일어날수록 같은 단량체 분자끼리 결합하여, 이량체, 삼량체, 사량체를 형성하는 경향이 강해지므로 형광활성의 차이에 의한 저해율을 전기영동으로 확인하기 위하여 각 반응 시료들을 0.01 mL씩 취하여 15% SDS-PAGE로 확인하였다.

[0073]

도 10에 나타난 바와 같이, 저해제를 처리하지 않은 apoA-I의 경우 강한 다량화 경향을 보여주는데 비해(라인 1), MAG 종류들을 처리한 apoA-I의 경우 훨씬 더 약한 다량화 경향이 나타나(라인 2, 3, 4), 도 9의 결과와 잘 일치함을 알 수 있었다.

[0074]

**실시예 7: 세포 배양 및 산화된 LDL 탐식 저해**

[0075]

대식세포가 산화된 LDL을 탐식하여 거품세포로 전환되어 동맥내강에 축적되는 것이 동맥경화의 초기 메카니즘이므로, 상기 실시예 1에서 합성된 리피드들이 대식세포의 LDL 탐식을 저해하는지를 조사하였다. 사람 단핵구 세포(monocyte)인 THP-1 cell American Type Culture Collection(ATCC, #TIB-202™)을 24 well plate에 1 x 10<sup>5</sup> cell/well 씩 분주하고 24시간 이상 10% FBS(fetal bovine serum)가 포함된 RPMI1640 배지(Hyclone)에서 배양한 후 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate, 최종 농도 150 nM)를 48시간 동안 처리하여 대식세포(Macrophage)로 분화시키고, 산화된 LDL(0.05 mL, 1 mg 단백질/mL)과 각 리피드(0.05 mL, 최종농도 0.002 mM)를 처리하여 다시 48시간동안 배양하였다. 배양 후 배지를 수집하고 PBS로 세포를 린스한 다음 대식세포 내로 산화된 LDL이 탐식된 정도를 비교하기 위해 모든 well의 세포들을 oil-red O로 염색하였다.

[0076]

그 결과, 음성대조군인 MeOH 처리군은 강한 적색 염색 강도를 보이는데 비해 MAG-O를 처리한 세포들은 현저히 감소된 염색 강도를 보여주었고, MAG-S나 MAG-P를 처리한 세포들은 Me-OH 처리군과 유사한 적색 강도를 보여주

었다[도 11].

[0077] 각 배지들을 일정량(0.2 mL) 취하여 Blois 등의 방법[Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958;181:1199-200] 에 따라 TBARS(thiobarbituric acid reactive substances) 방법으로 산화물의 양을 비교하여 본 결과, MeOH 처리군에 비해 MAG-O 처리군이 3배 이상의 산화물의 양 (Malondialdehyde)이 감소하였고 MAG-S와 MAG-P는 Me-OH 처리군과 유사한 양의 산화물을 보여 도 10의 결과와 잘 일치하였다[도 12].

[0078] **실시예 8: 독성시험**

[0079] 상기 화학식 1a로 표시되는 기능성 리피드를 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide, DMSO)에 용해하고 물로 희석한 후 이를 마우스(군당 10마리)에 각각 100 mg/kg을 투여한 다음 7일간 관찰하였으나 사망하는 쥐는 없었다.

[0080] **제조예 1: 분말 및 캡슐제의 제조**

[0081] 상기 화학식 1a로 표시되는 기능성 리피드 10 mg을 락토오스 14.8 mg, 결정성 셀룰로오스 3 mg, 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg과 함께 섞었다. 혼합물을 적당한 장치를 사용하여 No.5 젤라틴 캡슐에 채웠다.

[0082] 상기 분말 및 캡슐제의 구성성분은 다음과 같다.

[0083]	유효성분	10 mg
[0084]	락토오스	14.8 mg
[0085]	결정성 셀룰로오스	3 mg
[0086]	마그네슘 스테아레이트	0.2 mg

[0087] **제조예 2: 주사액제의 제조**

[0088] 상기 화학식 1a로 표시되는 기능성 리피드 10 mg을 함유하는 주사액제는 다음과 같은 방법으로 제조하였다.

[0089] 상기 화학식 1a로 표시되는 기능성 리피드 1 g, 염화나트륨 0.6 g 및 아스코르빈산 0.1 g을 증류수에 용해시켜서 100 mL을 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20 °C에서 30 분간 가열하여 멸균시켰다.

[0090] 상기 주사액제의 구성성분은 다음과 같다.

[0091]	유효성분	1 g
[0092]	염화나트륨	0.6 g
[0093]	아스코르빈산	0.1 g
[0094]	증류수	적량

[0095] **제조예 3: 화장료의 제조**

[0096] 화학식 1a로 표시되는 기능성 리피드를 유효성분으로 이용하여 다음과 같은 조성으로 에센스를 제조하였다.

[0097] [조성]

[0098] 유효성분 10.0 mg, 글리세린 3.0 mg, EDTA 0.05 mg, 벤조페논-9 0.04 mg, 카르복시비닐 폴리머 0.2 mg, 트리에탄올아민 0.18 mg, 옥시도테세스-25 0.6 mg, 글리세릴모노스테아레이트 1.0 mg, 방부제 0.01 mg, 향료 0.01 mg, 정제수 잔량

[0099] **제조예 4: 음료의 제조**

[0100] 화학식 1a로 표시되는 기능성 리피드 500 mg을 적당량의 물에 용해시킨 후에 보조성분으로서 비타민 C, 교미제

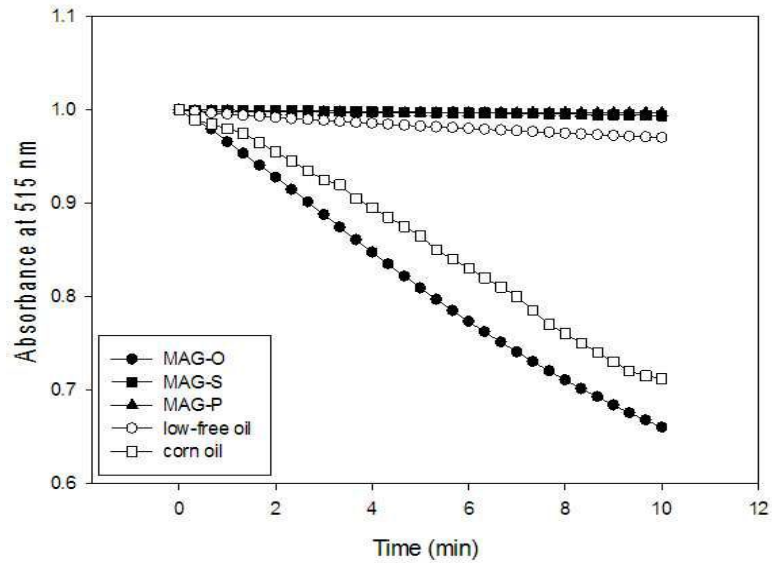
로서 구연산, 구연산나트륨, 올리고당을 적당량 가하고, 보존제로서 적당량의 나트륨벤조에이트를 가한 후에 물을 가하여 전량을 100 ml로 만들어 음료용 조성물을 제조하였다. 이때, 타우린이나 마이오 이노시톨, 엽산, 판토텐산 등을 단독으로 혹은 함께 첨가할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

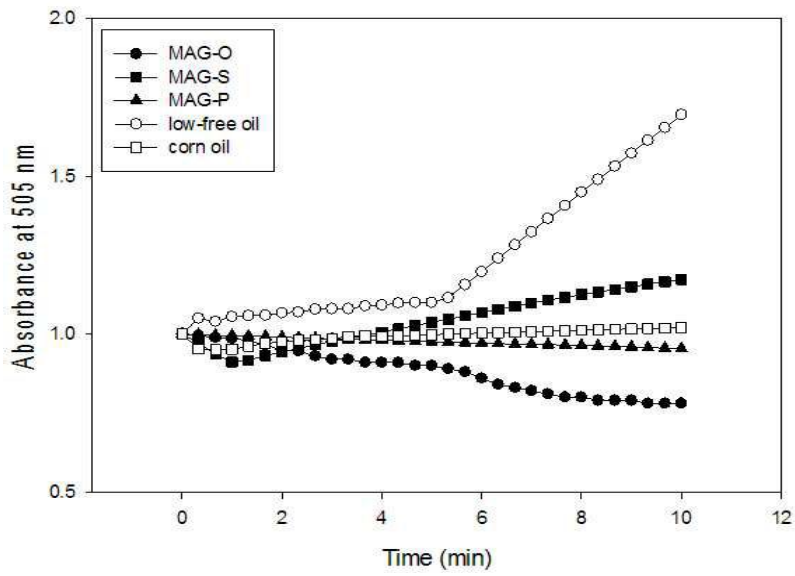
- [0101] 도 1은 본 발명에서 합성된 기능성 리피드들이 라디칼을 소거하는 항산화 능력을 비교하기 위해 DPPH를 시간당 제거하는 속도를 비교한 것이다
- [0102] 도 2는 본 발명에서 합성된 기능성 리피드들이 라디칼을 소거하는 항산화 능력을 비교하기 위해 DMPD<sup>+</sup>를 시간당 제거하는 속도를 비교한 것이다
- [0103] 도 3은 본 발명에서 합성된 기능성 리피드들이 철 이온을 환원시키는 항산화 능력을 비교하기 위해 철 이온 환원능력을 시간당 비교한 것이다.
- [0104] 도 4는 본 발명에서 합성된 기능성 리피드들이 저밀도지단백질(LDL)의 산화를 억제하는 능력을 비교하기 위해, 구리이온으로 LDL의 산화를 유도하면서 기능성 리피드를 첨가하여 생성되는 산화물인 컨쥬게이티드 디엔(conjugated diene)의 양을 시간에 따라 측정된 것이다.
- [0105] 도 5는 본 발명에서 합성된 도 4에서 비교된 LDL의 산화정도를 전기장에서의 이동성으로 확인하기 위해 아가로오스 전기영동으로 비교한 것이다[Lane N, 산화되지 않은 LDL (15 mg of protein); lane 0, 산화된 LDL (10mM CuSO<sub>4</sub>). Lane1, MAG-O를 처리한 LDL ;lane2, MAG-S를 처리한 LDL; lane3,MAG-P를 처리한 LDL; lane4, low-free oil을 처리한 LDL; lane 5, corn oil을 처리한 LDL].
- [0106] 도 6은 본 발명에서 합성된 기능성 리피드들이 Lp-PLA2를 저해하는 능력을 비교한 것이다
- [0107] 도 7은 본 발명에서 합성된 기능성 리피드들이 파라옥소나아제의 활성을 활성화 시키는 능력을 비교한 것이다.
- [0108] 도 8은 사람 혈장으로부터 초원심분리와 컬럼 크로마토그래피를 통해 분리된 apoA-I의 순도를 보여 준다.
- [0109] 도 9는 본 발명에서 합성된 기능성 리피드들이 항당뇨 활성을 가지는지를 비교하기 위해 apoA-I 단백질에 과당 당화가 일어나는 것을 억제하는지를 비교한 것이다.
- [0110] 도 10은 본 발명에서 합성된 기능성 리피드들이 가지는 apoA-I 단백질의 당화 억제 효과를 전기영동(15% SDS-PAGE)으로 비교한 것이다[Lane 1, apoA-I + fructose + Me-OH; lane 2, apoA-I + fructose + MAG-O; lane 3, apoA-I + fructose + MAG-S; lane 4, apoA-I + fructose + MAG-P; lane 5, apoA-I + fructose + DAG; lane 6, apoA-I + fructose + TAG; lane 7, apoA-I + fructose + buffer; lane 8, apoA-I + Me-OH. lane M, 분자량 마커].
- [0111] 도 11은 본 발명에서 합성된 기능성 리피드들이 가지는 항동맥경화 효과를 비교하기 위해 대식세포주가 산화된 LDL을 탐식하는 것을 저해하는 것을 비교한 것이다.
- [0112] 도 12는 도 10의 실시예에서 도출된 각 세포주의 배지에 존재하는 산화 생성물(Malondialdehyde)의 양을 비교한 것이다.

도면

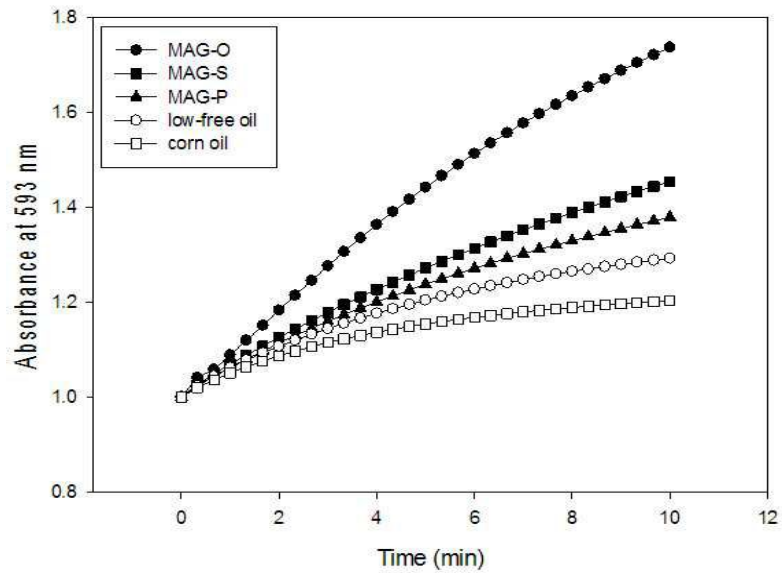
도면1



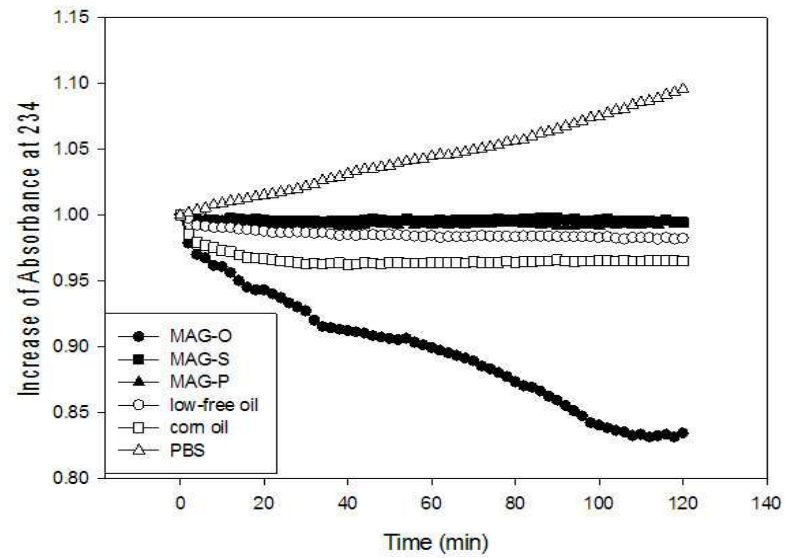
도면2



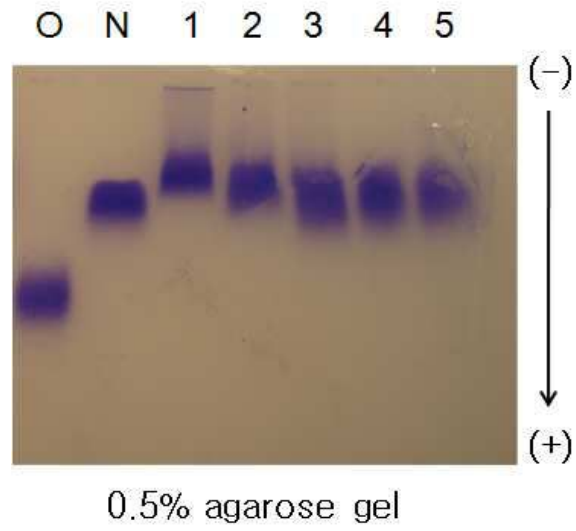
도면3



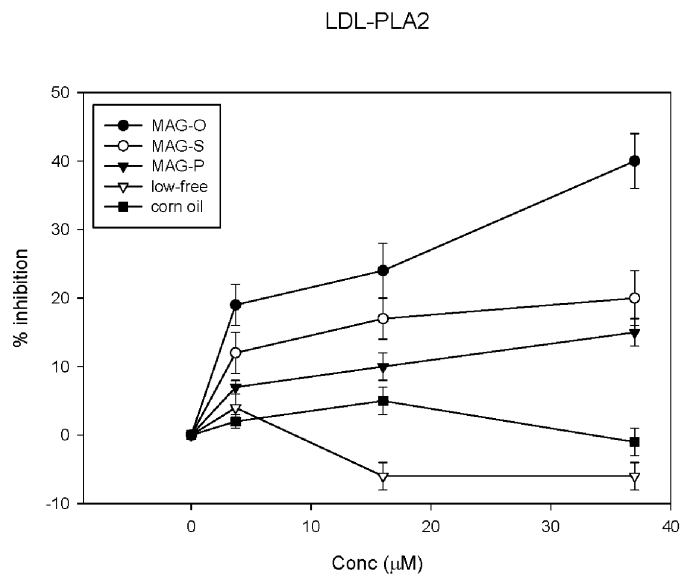
도면4



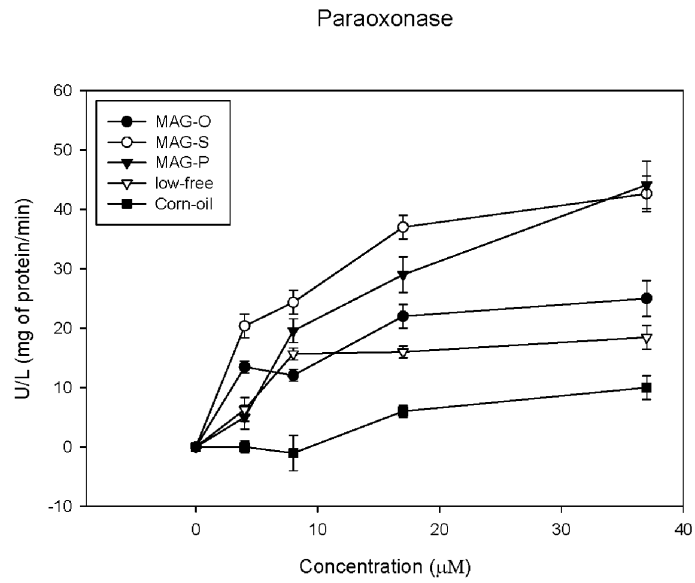
도면5



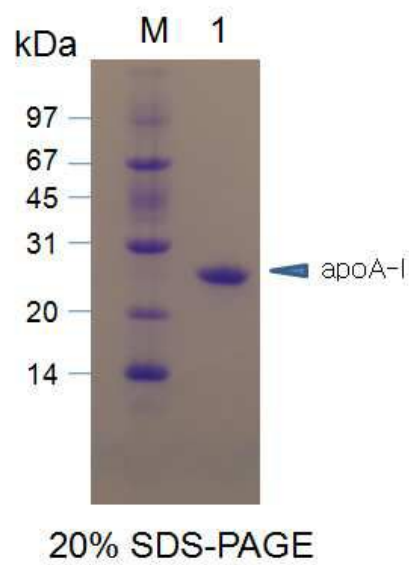
도면6



도면7

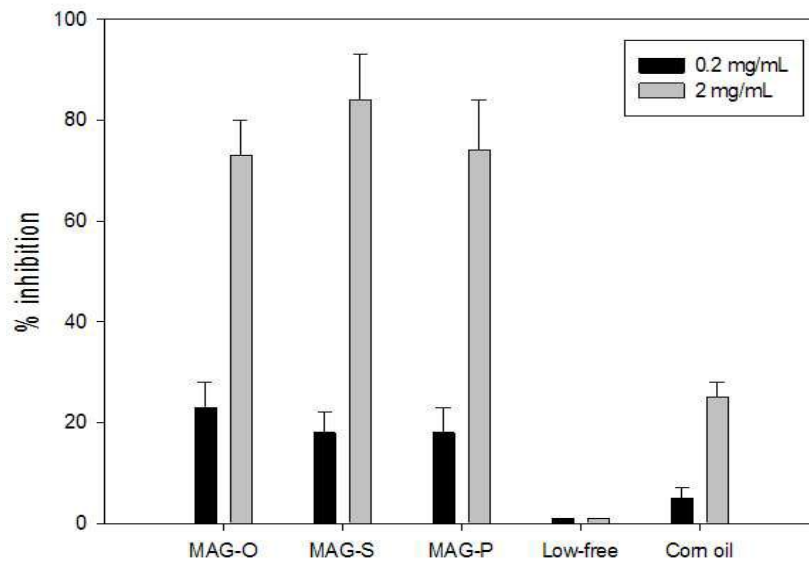


도면8

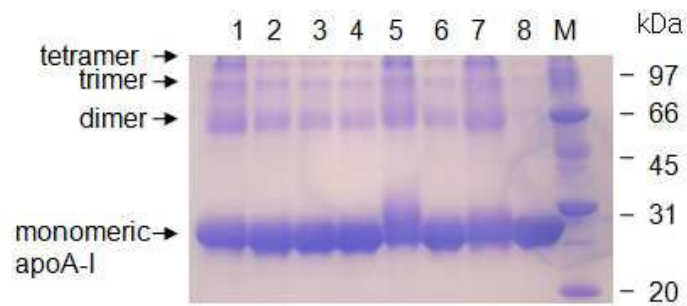




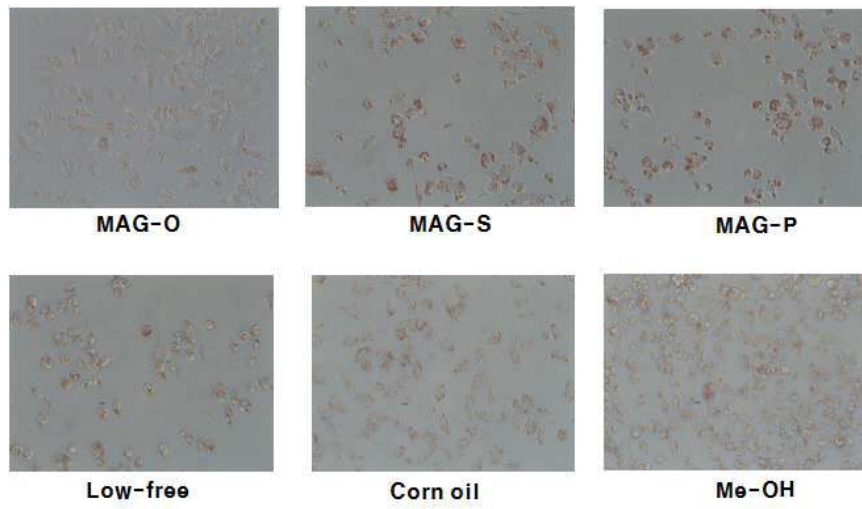
도면9



도면10



도면11



도면12

