



- (51) 국제특허분류: 미분류
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/007395
- (22) 국제출원일: 2016년 7월 7일 (07.07.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2015-0106051 2015년 7월 27일 (27.07.2015) KR
- (71) 출원인: 대한민국(농촌진흥청장) (REPUBLIC OF KOREA(MANAGEMENT : RURAL DEVELOPMENT ADMINISTRATION)) [KR/KR]; 54875 전라북도 전주시 완산구 농생명로 300 (중동), Jeollabuk-do (KR). 버지니아 커먼웰스 유니버시티 (VIRGINIA COMMONWEALTH UNIVERSITY) [US/US]; 23219 버지니아주 리치몬드 슈트 3000, 이스티 리 스트리트 800, Virginia (US).
- (72) 발명자: 한신희 (HAN, Sin Hee); 42115 대구시 수성구 들안로 60길 7, 203동 2302호 (수성동 3가, 수성 3가 화성파크드림 2단지), Daegu (KR). 박춘근 (PARK, Chun Geun); 16395 경기도 수원시 권선구 매실로 61, 202동 2007호 (호매실동, 삼익 2차아파트), Gyeonggi-do (KR). 최애진 (CHOI, Ae Jin); 17084 경기도 용인시 기흥구 고매로 43번길 32-2, 104동 1405호 (공세동, 불곡마을벽산블루밍아파트), Gyeonggi-do (KR). 차선우

(CHA, Seon Woo); 16398 경기도 수원시 권선구 금호로 15번길 15, 104동 1501호 (금곡동, 신미주아파트), Gyeonggi-do (KR). 박충범 (PARK, Chung Berm); 28317 충청북도 청주시 청원구 율령로 135, 608동 302 (주성동, 대원칸다빌 3차아파트), Chungcheongbuk-do (KR). 산알에이런 제이 (SANYAL, Arun J); 23111 버지니아주 메카닉스빌 올드 마일스톤 드라이브 6998, Virginia (US). 민해기 (MIN, Hae Ki); 23233 버지니아주 리치몬드 우드바론 웨이 10053, Virginia (US).

(74) 대리인: 특허법인 이룸리온 (ERUUM & LEEON INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06575 서울시 서초구 사평대로 108, 3층 (반포동), Seoul (KR).

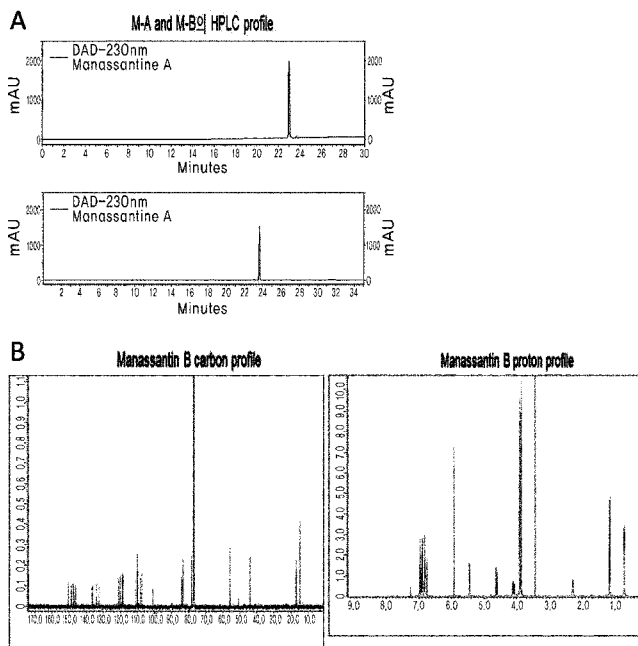
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION CONTAINING MANASSANTIN A OR MANASSANTIN B FOR NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE PREVENTION OR TREATMENT

(54) 발명의 명칭 : 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 포함하는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition containing manassantin A or manassantin B for non-alcoholic fatty liver disease prevention or treatment. Since the composition containing manassantin A or manassantin B for non-alcoholic fatty liver disease prevention or treatment of the present invention does not have various side effects such as cardiovascular effects, central effects, hepatic damage, and kidney disease induced by conventional synthetic drug compositions but has the effects of reducing infections induced by non-alcoholic fatty liver disease, suppressing the progression and metastasis of non-alcoholic fatty liver disease, suppressing lipid storage in the liver, anti-apoptosis, and autophagy activation promotion, the composition containing manassantin A or manassantin B for non-alcoholic fatty liver disease prevention or treatment of the present invention can be usefully used as a pharmaceutical composition for non-alcoholic fatty liver prevention and/or treatment or a health functional food composition for non-alcoholic fatty liver prevention and/or improvement.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 마나산틴 A(manassantin A) 또는 마나산틴 B(manassantin B)을 포함하는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 마나산틴 A(manassantin A) 또는 마나산틴 B(manassantin B)을 포함하는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 치료용 조성물은 종래 합성 약제 조성물이 유발하는 심혈관작용, 중추작용, 간장장애 및 신장장애 등 여러 부작용이 없으며, 비알코올성 지방간 질환에 의한 염증 감소, 비알코올성 지방간 진행 및 전이 억제, 간 내 지질축적 억제, 항 세포사멸효과 및 세포의 자식작용(autophagy) 활성촉진 효과를 가지고 있으므로, 비알코올성 지방간 예방 및/또는 치료용 약학적 조성물 또는 비알코올성 지방간 및/또는 개선용 건강기능성 식품 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 포함하는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 마나산틴 A(manassantin A) 또는 마나산틴 B(manassantin B)를 포함하는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 비알코올성 지방간 질환에 의한 염증 감소, 비알코올성 지방간 진행 및 전이 억제, 간 내 지질축적 억제, 항 세포사멸효과 및 지방 축적된 간세포의 자식작용(autophagy) 활성촉진 효과를 가지는 마나산틴 A 및/또는 마나산틴 B를 유효성분으로 포함하는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 비 알코올성 지방간 질환(nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD)은 만성질환 중에서 가장 흔한 질환으로 제2형 당뇨병, 비만 및 대사증후군과 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다. 지역마다 다소 빈도의 차이는 있으나 전 세계적으로 적게는 6.3%, 많게는 33%, 평균 약 20%의 환자가 이 질환에 발병된 것으로 보고되어 있으며, 이 중 일부에서는 지방간염(Nonalcoholic steatohepatitis, NASH)의 단계를 거쳐 간경변 또는 간암으로 진행하는 것으로 밝혀져 있다.
- [3] 비알코올성 지방간 질환은 인슐린 저항성, 자식 작용, 세포사멸, 염증, 대사성 증후군{비만, 지질독성(lipotoxicity), 혼합 고지혈증, 제 2형 당뇨병} 등 여러 요인과 연관되어 있으며, 비 알코올성 지방간 질환 (단순 지방간에서 비알코올성 지방 간염)의 발병 기전은 여러 경로로 발병되고 있어 아직 완전히 규명되지 않았지만, 최근에 이러한 질환의 치료를 위한 발명 기전들이 보고 되고 있다 (Min, H.K. *et al*, *Cell Metab.*, 15:665, 2012; Puri, P. *et al.*, *Gastroenterology*, 134:568, 2008).
- [4] 다량의 유리지방산(free fatty acid)에 의한 지질독성(lipotoxicity)은 간 내 인슐린 저항성, 산화 스트레스, 간세포 손상 및 염증을 유발하여 비알코올성 지방간 질환의 발병을 유도하는 것으로 알려지고 있으며(Fuchs, M., and Sanyal, A.J., *Journal of hepatology*, 56:291, 2012), 특히 포화지방산, 예를 들면 팔미테이트(palmitate)는 직접적으로 세포에 독성을 주고 종양괴사인자(tumor necrosis factor- α : TNF- α) 및 인터루킨-6(interlukin-6: IL-6)와 같은 사이토카인 생성을 촉진시켜 염증을 유발하고 인슐린 저항성을 유도하는 것으로 보고되었다 (Ajuwon, K.M. and Spurlock, M.E., *The Journal of nutrition*, 135:1841, 2005).
- [5] 또한, 유리지방산은 간에서 JNK(c-Jun N-terminal kinase 3), NF-kB(Nuclear factor-kappa B), ERK(Extracellular signal-regulated kinases)의 인산화를 통해

- 소포체 (ER)와 미토콘드리아의 기능 장애, 지질 축적, 염증 증가로 인해 NAFLD이 발병하는 것으로 보고되었으며(Wei, Y. *et al.*, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 291:E275, 2006), 비 알코올성 지방간 질환 그리고 인슐린 저항성은 gp130 대사 경로를 통해 JAK(Janus activated kinase)-신호 전달, JAK-STAT3 전사 활성화, Src-Ras 그리고 PI3 kinase-Akt 활성화를 유도하는 것으로 알려져 있다 (Steinberg, G.R. *et al.*, *Diabetes*, 58:829, 2009; Yamauchi-Takahara, K. and Kishimoto, T., *Int J Exp Pathol.*, 81:1, 2000).
- [6] 상기와 같이 비알코올성 지방간 질환에 대한 치료약과 발생기전에 대해 많은 연구가 이루어지고 있지만, 아직까지 치료약이 없는 실정이며 단지 식사요법이나 운동요법 등이 권장되고 있다. 이러한 이유로 인해 보다 적극적인 약물 치료가 필요하다.
- [7] 현재까지, 지방간의 약물치료제로는 메타독신(metadoxine), 베타인 글루쿠론산(betaine glucuronate), 메티오닌(methionine), 콜린(choline), 리포트로픽(lipotropic) 제제가 보조적으로 사용되기도 하지만, 이러한 제제의 효과가 의학적으로 확실히 증명된 것은 아니며, 피브레이트계 약제는 일반적으로 간 기능 장애 등의 부작용이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 부작용이 없고 저렴하면서도 치료 효과가 우수한 새로운 비알콜성 지방간의 예방 및 치료를 위한 치료제의 개발이 요구되고 있으며, 비알코올성 지방간 치료제 개발을 위해 다양한 약리학적 및 생물학적 특성을 가지고 있는 식물유래 화합물들이 연구되고 있다.
- [8] 한편, 마나산틴 A(manassantin A) 또는 마나산틴 B(manassantin B)는 삼백초(*Saururus chinensis* (Lour.) Baill) 유래 리그난(lignan)의 일종으로 마나산틴 A 및 마나산틴 B는 항염증(Chang, J.S. *et al.*, *Journal of pharmacological sciences*, 115:84, 2011), 항-인간 면역결핍 바이러스 효과(Lee, J. *et al.*, *Antiviral research*, 85:425, 2010), 과색소 침착 질환 개선효과(Seo, C.S. *et al.*, *Phytotherapy research* : PTR, 23:1531, 2009) 등 다양한 생물학적 활성이 보고되고 있다.
- [9] 또한, 마나산틴 B는 LPS 처리된 RAW 264.7 세포내 IL-1 β 생성을 억제하였고, ERK1/2 및 p38 MAPK의 인산화를 억제하였으나 JNK의 인산화에는 변화가 없다고 보고되었으며(Park, H.C. *et al.*, *Korean journal of anesthesiology*, 62:161, 2012), 골수 유래 mast 세포내 Fyn 매개 NF-kB(Nuclear factor-kappa B) 그리고 MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) 경로를 차단하여 의존성 시클로 옥시게나제-2-프로스타글란딘 D2 (cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin D2) 생성을 억제한다고 보고되었다 (Lu, Y. *et al.*, *Biological & pharmaceutical bulletin*, 36:1370, 2013).
- [10] 하지만, 종래의 기술에는 마나산틴 A(manassantin A) 또는 마나산틴 B(manassantin B)의 비알코올성 지방간 질환의 예방 또는 치료 효과에 대해서 전혀 보고된바 없다.
- [11] 이에, 본 발명에서는 부작용이 없고 치료 효과가 우수한 비알콜성 지방간의

예방 또는 치료를 위한 천연물질을 선별하기 위해 예의 노력한 결과, 삼백초 유래의 마나산틴 A(manassantin A) 또는 마나산틴 B(manassantin B)가 비알코올성 지방간 질환에 의한 염증 감소, 비알코올성 지방간 진행 및 전이 억제, 간 내 지질축적 억제, 항 세포사멸효과 및 지방 축적된 간세포의 자식작용(autophagy) 활성촉진 효과를 가지고 있어, 비알코올성 지방간 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 활용될 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

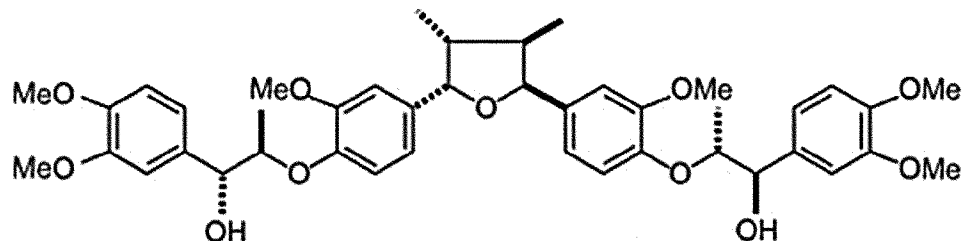
- [12] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 마나산틴 A(manassantin A) 또는 마나산틴 B(manassantin B)를 유효성분으로 포함하는 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

- [13] 상술한 본 발명의 과제를 해결하기 위하여 본 발명은, 하기 화학식 1로 표시되는 마나산틴 A(manassantin A); 하기 화학식 2로 표시되는 마나산틴 B(manassantin B); 및 이들의 염; 중에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 포함하는 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 또는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 포함한다.

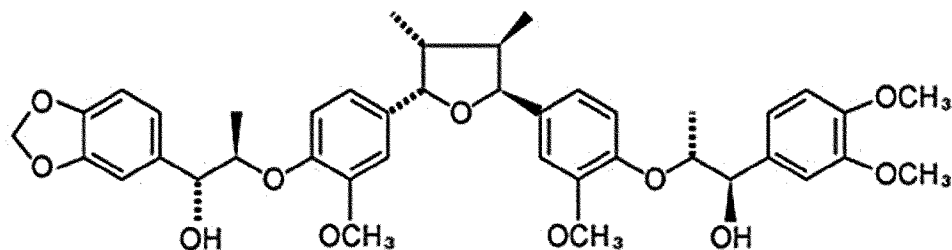
- [14] [화학식 1]

[15]



- [16] [화학식 2]

[17]



- [18] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 마나산틴 A(manassantin A) 또는 마나산틴 B(manassantin B)는 삼백초(*Saururus chinensis* (Lour.) Baill) 유래일 수 있다.

- [19] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 인터루킨-6(IL-6: interleukin-6) 및 인터루킨-8(IL-8: interleukin-8)로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 염증성 사이토카인 생성 억제; JNK(c-Jun

N-terminal kinases) 활성 억제; 및 NF- κ B(nuclear factor-kappaB) 활성 억제; 로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 기작을 통해 비알코올성 지방간질환에 의한 염증을 억제할 수 있다.

- [20] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 폴리(ADP-리보오스)중합효소(Poly ADP ribose polymerase: PARP) 절단(cleave) 억제; 및 카스파제-3(caspase-3) 절단(cleave) 억제; 로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 기작을 통해 비알코올성 지방간에 의한 세포사멸을 억제할 수 있다.
- [21] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 gp130(Glycoprotein 130) 생성 억제; 및 STAT3(signal transducer and activator of transcription 3) 활성 억제; 로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 기작을 통해 비알코올성 지방간질환의 진행 및 전이를 억제할 수 있다.
- [22] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 AMPK(AMP-activated protein kinase) 활성 촉진; 및 ACC(acetyl-CoA carboxylase) 활성 억제; 로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 기작을 통해 간 내의 중성지방 함량 또는 지질 축적을 감소시킬 수 있다.
- [23] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 조성물은 자식작용억제(autophagy blockages)에 관여하는 LC3(Microtubule-associated protein light chain 3)-II 또는 p62 단백질 생성 억제; AMPK(AMP-activated protein kinase) 활성 촉진; 및 ACC(acetyl-CoA carboxylase) 활성 억제; 로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 기작을 통해 비알코올성 지방간의 자식작용을 유도할 수 있다.

발명의 효과

- [24] 본 발명의 마나산틴 A(manassantin A) 또는 마나산틴 B(manassantin B)를 포함하는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 치료용 조성물은 종래 합성 약제 조성물이 유발하는 심혈관작용, 중추작용, 간장장애 및 신장장애 등 여러 부작용이 없으며, 비알코올성 지방간 질환에 의한 염증 감소, 비알코올성 지방간 진행 및 전이 억제, 간 내 지질축적 억제, 항 세포사멸효과 및 지방 축적된 간세포의 자식작용(autophagy) 활성촉진 효과를 가지고 있으므로, 비알코올성 지방간 예방 및/또는 치료용 약학적 조성물 또는 비알코올성 지방간 및/또는 개선용 건강기능성 식품 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [25] 도 1은 삼백초에서 분리한 마나산틴 A 또는 마나산틴 B의 HPLC(A) 및 마나산틴 B의 NMR 분석결과를 나타낸 데이터이다.
- [26] 도 2는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B의 농도에 따른 세포 생존율을 확인한 데이터이다 (MNS-A: 마나산틴 A, MNS-B: 마나산틴 B).
- [27] 도 3은 마나산틴 B의 세포독성 및 유전 돌연변이를 분석하기 위해 HC 어세이를 수행한 것으로, 상대적 세포 밀도(A) 및 형광 유도 값(B)를 나타낸

데이터이다.

- [28] 도 4는 포화지방산인 팔미테이트(palmitate) 및/또는 인터루킨-6(IL-6) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하였을 때, JNK(c-Jun N-terminal kinases) 및 NF- κ B(nuclear factor-kappaB)의 인산화 정도를 웨스턴 블랏(A)으로 확인하고 이를 수치화(B)한 데이터 및 인터루킨-8(IL-8) mRNA 발현정도(C) 및 인터루킨-6(IL-6) mRNA 발현정도(D)를 나타낸 데이터이다.
- [29] 도 5는 종양괴사 인자- α (TNF- α : tumor necrosis factor-alpha) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하였을 때, JNK(c-Jun N-terminal kinases) 및 NF- κ B(nuclear factor-kappaB)의 인산화 정도를 웨스턴 블랏(A)으로 확인하고 이를 수치화(B)한 데이터이다.
- [30] 도 6은 팔미테이트(palmitate) 및/또는 인터루킨-6(IL-6) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 처리에 의한 세포사멸 정도를 확인하기 위해, 폴리(ADP-리보오스)중합효소(Poly ADP ribose polymerase: PARP) 및 카스파제-3(caspase-3) 절단에 의한 활성 정도를 웨스턴 블랏(A)으로 확인하고 이를 수치화(B)한 데이터이다.
- [31] 도 7은 팔미테이트(palmitate) 또는 인터루킨-6(IL-6) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하였을 때, gp130(Glycoprotein 130) 생성 정도 및 STAT3(signal transducer and activator of transcription 3) 인산화 정도를 웨스턴 블랏(A)으로 확인하고 이를 수치화(B 및 C)한 데이터이다.
- [32] 도 8은 팔미테이트(palmitate) 및 인터루킨-6(IL-6) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하였을 때, gp130 생성 정도, STAT3 및 Tyk 인산화 정도를 웨스턴블랏(A)으로 확인하고 이를 수치화(B)한 데이터이다.
- [33] 도 9는 팔미테이트(palmitate) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하였을 때, AMPK 인산화 정도를 웨스턴 블랏(A)으로 확인하고 이를 수치화(B)한 데이터이다.
- [34] 도 10은 팔미테이트(palmitate) 및/또는 인터루킨-6(IL-6) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하였을 때, AMPK 및 ACC 인산화 정도를 웨스턴 블랏(A)으로 확인하고 이를 수치화(B)한 데이터이다.
- [35] 도 11은 팔미테이트(palmitate) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하였을 때, 간 세포 내 중성지방 함량(A), 오일-레드-오(oil-red-O)를 이용한 및 지질축적 정도(B) 및 전자현미경(electron microscope)을 이용한 지질축적 정도 (C)를 확인한 데이터이다.
- [36] 도 12는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의한 SIRT 1의 활성 및 단백질 발현 정도를 확인한 데이터이다.
- [37] 도 13는 팔미테이트(palmitate) 처리된 간 세포에서 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의한 자식작용(autophagy) 유도효과를 확인하기 위해, p62 및 LC3-II 생성 정도를 웨스턴 블랏(A)으로 확인하고 이를 수치화(B)한 데이터이다.
- [38] 도 14는 팔미테이트(palmitate) 또는 암모늄 클로라이드(ammonium

chloride)/류펩틴(leupeptin) 처리된 간 세포에서 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의한 자식작용(autophagy) 유도효과를 확인하기 위해, p62 단백질 및 LC3-II 생성 정도를 웨스턴 블랏(A)으로 확인하고 이를 수치화(B: LC3-II, C: p62)한 데이터이다.

- [39] 도 15는 팔미테이트(palmitate) 또는 암모늄 클로라이드(ammonium chloride)/류펩틴(leupeptin) 처리된 간 세포에서 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의한 자식작용(autophagy) 유도효과를 확인하기 위해, AMPK 및 ACC 인산화 정도를 웨스턴 블랏(A)으로 확인하고 이를 수치화(B)한 데이터이다.
- [40] 도 16은 팔미테이트(palmitate) 처리된 간세포에서 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의한 단백질인산화효소 C(protein kinase C; PKC θ) 및 탈인산화효소-2(phosphatase-2; PP2A) 발현 정도를 웨스턴 블랏(A)으로 확인하고, 이를 수치화(B 및 C)한 데이터이다.
- [41] 도 17은 팔미테이트(palmitate) 처리된 간세포에서 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의한 신호조절인산화효소 1/2(Extracellular signal-regulated kinases 1/2) 및 AMPK의 인산화 정도를 웨스턴 블랏(A)으로 확인하고 이를 수치화(B)한 데이터이다.
- [42] 도 18은 팔미테이트(palmitate) 처리된 간세포에서 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의한 세포 내 AMP/ATP 비율을 확인한 데이터이다.
- [43] 도 19는 비알코올성 지방간에 대한 마나산틴 A 또는 마나산틴 B의 효과를 요약한 모식도이다.

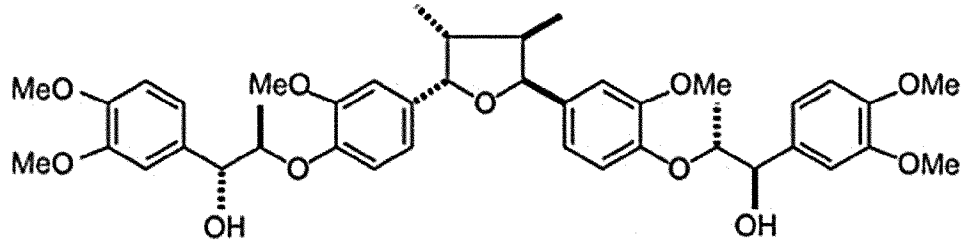
발명의 실시를 위한 형태

- [44] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [45] 상술한 바와 같이, 비알콜성 지방간 질환은 대부분 비만, 당뇨병, 인슐린 저항성 및 고지혈증 등의 합병증을 동반하게 되며, 이를 치료하기 위해서는 식요법이나 운동요법 등이 권장되고 있지만, 실행하기 어려운 단점이 있어 부작용이 없고 저렴하면서도 치료 효과가 우수한 새로운 비알콜성 지방간의 예방 및 치료를 위한 치료제의 개발이 필요한 실정이다.
- [46] 본 발명은 마나산틴 A(manassantin A) 또는 마나산틴 B(manassantin B)를 포함하는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공함으로써 상술한 문제의 해결을 모색하였다. 이를 통해 종래 약학적 조성물에서 나타났던 부작용인 심혈관작용, 중추작용, 간장장애 및 신장장애 등 여러 부작용이 없으면서, 비알코올성 지방간 질환에 의한 염증 감소, 비알코올성 지방간 진행 및 전이 억제, 간 내 지질축적 억제, 항 세포사멸효과 및 지방 축적된 간세포의 자식작용(autophagy) 활성촉진 효과가 있는 비알콜성 지방간 예방 및 치료용 약학적 조성물 및 비알콜성 지방간 예방 및 개선용 건강기능성 식품을 제공하는 효과가 있다.
- [47] 따라서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 마나산틴 A(manassantin A); 하기

화학식 2로 표시되는 마나산틴 B(manassantin B); 및 이들의 염; 중에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 포함하는 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 또는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 포함한다.

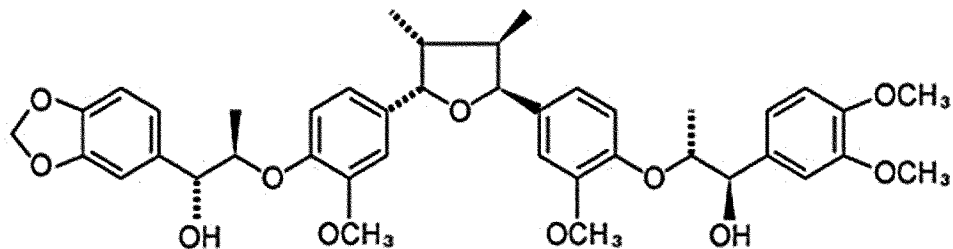
[48] [화학식 1]

[49]



[50] [화학식 2]

[51]



[52] 본 발명의 '비알코올성 지방간 질환(nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD)'이란, 비알코올성 간지방증 (nonalcoholic fatty liver; NAFL)과 비알코올성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis; NASH)으로 분류된다. 비알코올성 지방성 간질환(NAFLD)은, 예를 들면, 분명한 음주력이 없음에도 불구하고, 간조직 소견은 알코올성 간장애와 유사한 주로 대적성의 간지방 침착을 특징으로 하는 간 장애로, 예후 양호한 단순성 지방간과 진행성의 NASH를 포함하는 질환 개념으로 정의된다.

[53] 상기 마나산틴 A(manassantin A: MNS-A) 또는 마나산틴 B(manassantin B: MNS-B)는 삼백초(*Saururus chinensis* (Lour.) Baill) 유래인 것을 특징으로 할 수 있으며, 삼백초에 물, 알코올, 에틸아세테이트, 클로로포름, 부탄올 또는 헥산 등의 단독 또는 혼합 형태인 용매를 가하여 추출할 수 있으나, 통상적으로 제조 및/또는 구매할 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않는다.

[54] 상기 용매를 이용한 일반적인 용매 추출법을 적용하여 추출할 수 있으며, 또한 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 정제한 분획물 일 수도 있다. 본 발명에 따른 추출물의 제조방법은 본 기술분야에 속하는 통상의 지식을 가진 자에게 알려진 식물 추출방법을 모두 적용할 수 있으며, 바람직하게 본 발명의 일양태에서는 삼백초를 메탄올을 이용하여 추출한 다음, 순차 분획하여 최종적으로 F1 분획물 및 F4 분획물을 수득하였으며, 도 1에 나타난 바와 같이, HPLC 및 NMR 스펙트럼 데이터를 분석한 결과, F1 분획물에서 수득한 화합물 1은 마나산틴 A(manassantin A), F4 분획물에서 수득한 화합물 2는 마나산틴 B(manassantin B)로 판명되었다.

- [55] 본 발명에서, 마나산틴 A(manassantin A); 마나산틴 B(manassantin B); 및 이들의 염; 중에서 선택되는 1종 이상의 화합물은 상기 조성물에 5 내지 150 nM, 바람직하게는 10 내지 80 nM, 더 바람직하게는 10 내지 40 nM로 포함될 수 있다. 상기 조성물의 용매로는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B의 비알코올성 지방간 예방, 개선 또는 치료 효과를 방해하지 않는 것이라면 특별히 제한되지 않으나, 보다 바람직하게는 물, 에탄올, 프로필 알코올, DMSO 등일 수 있다. 5 nM 보다 낮은 농도의 마나산틴 A 또는 마나산틴 B가 포함되는 경우, 비알코올성 지방간의 예방 또는 치료 효능이 감소할 수 있으며, 150 nM 농도 이상의 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 사용할 수 있지만, 농도 증가에 따른 효능이 월등하게 증가하지 않으며, 오히려, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의한 세포 독성이 발생할 수도 있다.
- [56] 본 발명의 일양태에서는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B의 세포 독성 여부를 확인하였으며, 인간 간 세포(Human primary hepatocytes)에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 농도별로 각각 처리하여 48시간 동안 배양한 후 세포 사멸정도를 측정한 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B는 0 내지 80 nM 농도에서는 세포 독성이 관찰되지 않았으나, 160nM 농도에서는 세포 사멸에 영향을 주는 것을 확인하였다.
- [57] 또한, 마나산틴 B의 세포독성 및 유전독성 효과를 확인하기 위해 S9 대사 비활성화를 이용한 그린 스크린 HC 분석(GreenScreen HC assay)을 수행한 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 0 내지 80 nM 농도에서 세포 독성을 보이지 않았으며, 160 nM 농도 이상에서의 상대적인 세포 밀도는 대조군에 비해 임계값으로 설정한 80% 이하로 감소한 것을 확인하였다. 하지만, HC 분석에서 형광유도 값은 마나산틴 B 0 내지 640 nM에서 음성값(임계값이 1.5배 보다 이하)을 나타내는 것을 확인하였으며, 이는 마나산틴 B는 160 nM 농도에서는 약간의 세포독성이 있는 반면 유전 독성은 640 nM에서도 없다는 것을 의미한다.
- [58] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 인터루킨-6(IL-6: interleukin-6) 및 인터루킨-8(IL-8: interleukin-8)로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 염증성 사이토카인 생성 억제; JNK(c-Jun N-terminal kinases) 활성 억제; 및 NF-κB(nuclear factor-kappa B) 활성 억제; 로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 기작을 통해 비알코올성 지방간질환에 의한 염증을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [59] 비알코올성 지방간은 비알코올성 지방간염으로 전이될 수 있으며, 비알코올성 지방간염은 간세포와 관련된 염증, 간세포 손상, 간세포 괴사 및 손상에 의한 신체의 반응의 일부로 발생할 수 있다. 인터루킨-8 (IL-8), 인터루킨-6 (IL-6), 인터루킨 1-b(IL1-b) 및 종양괴사 인자-α(TNF-α: tumor necrosis factor-alpha)는 간 세포에서 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)들로 알려져 있으며, 이러한 사이토카인들은 간세포에서 JNK(c-Jun N-terminal kinases) 및 NF-κB(nuclear factor-kappa B) 활성화 뿐만 아니라, TNF-α를 유도하는 것으로

알려져 있다.

- [60] 포화지방산은 간세포 손상 및 염증을 유발하여 비알코올성 지방간 질환의 발병을 유도하는 것으로 알려져 있으며, 특히 팔미테이트는 직접적으로 세포에 독성을 주는 TNF- α , IL-8 및 IL-6와 같은 사이토카인의 생성을 촉진시켜 염증을 유발하고 인슐린 저항성을 유도하는 것으로 보고되었으며, IL-6도 발현이 증가할 경우 다양한 염증성 사이토카인의 발현을 촉진하는 것으로 알려져 있다.
- [61] 본 발명에서는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의한 비알코올성 지방간의 염증 예방 및 치료효과가 있는지 확인하기 위해, 포화지방산인 팔미테이트(palmitate) 및/또는 인터루킨-6(IL-6) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 각각 처리하였다.
- [62] 도 4A 및 도 4B에 나타난 바와 같이, 팔미테이트 또는 IL-6에 의해 염증이 유도된 간 세포는 JNK 및 NF- κ B의 인산화 정도가 급격히 증가한 반면, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 그룹에서는 JNK 및 NF- κ B의 인산화 정도가 현저하게 감소한 것을 확인하였다.
- [63] JNK 및 NF- κ B의 인산화가 감소한 것은 JNK 및 NF- κ B의 활성이 감소하여 염증 반응이 감소한다는 것을 의미하는 것으로, 본 발명의 마나산틴 A 또는 마나산틴 B는 간 세포에서 염증 유발을 현저하게 감소시키는 것을 확인하였다.
- [64] 또한 도 4C 및 도 4D는 IL-8 및 IL-6 mRNA의 상대적 발현량을 확인한 것으로, 팔미테이트 또는 IL-6 처리에 의해 염증이 유발된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 그룹에서는 IL-8 및 IL-6 mRNA 발현량이 현저하게 감소하는 것을 확인하였으며, 본 발명의 마나산틴 A 또는 마나산틴 B는 간 세포에서 염증성 사이토카인의 발현을 현저하게 감소시키는 것을 확인하였다.
- [65] 도 5는 종양괴사 인자- α (TNF- α : tumor necrosis factor- α) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하였을 때, JNK(c-Jun N-terminal kinases) 및 NF- κ B(nuclear factor-kappaB)의 인산화 정도를 웨스턴 블랏으로 확인한 데이터로, 도 4의 결과와 마찬가지로 TNF- α 에 의해 염증이 유발된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 그룹에서는 JNK 및 NF- κ B의 인산화 정도가 현저하게 감소한 것을 확인하였다.
- [66] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 폴리(ADP-리보오스)중합효소(Poly ADP ribose polymerase: PARP) 절단(cleave) 억제; 및 카스파제-3(caspase-3) 절단(cleave) 억제; 로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 기작을 통해 비알코올성 지방간에 의한 세포사멸을 억제하였다.
- [67] 비알코올성 지방간 질환에서 세포사멸 경로는 사멸 리간드-활성 유도된 수용체(death ligand-induced activation of receptors) 및 JNK, PARP 및 caspase-3 등을 포함하는 세포 내 단백질이 관련되어 있다. 간 세포와 쿠퍼 세포(kupffer cell)의 세포 사멸 효과는 정상세포(stellate cell)의 활성화 및 사이토카인의 방출을 통해 간 섬유화 및 염증을 촉진하며, 세포사멸을 비알코올성 지방간 질환의 발생 및 진행에 중요한 역할을 한다. 또한, caspase-3는 세포 사멸에 관여하는 중요한

유도인자이며, 절단된 핵 효소 폴리(ADP-리보오스) 중합 효소(PARP) 단백질은 세포의 생존에 관여하고 세포 사멸(apoptosis)의 바이오 마커 역할을 한다.

- [68] 본 발명의 일양태에서는, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B의 항 세포사멸 효과를 확인하기 위해, 팔미테이트(palmitate) 및/또는 인터루킨-6(IL-6) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 각각 처리한 다음,

폴리(ADP-리보오스)중합효소(Poly ADP ribose polymerase: PARP) 및 카스파제-3(caspase-3) 절단에 의한 활성 정도를 웨스턴블랏으로 확인하였다.

- [69] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의해 절단된 PARP(cleaved-PARP) 및 caspase-3(cleaved-caspase-3) 생성이 현저하게 감소하는 것을 확인하였으며, 이는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B가 PARP 또는 caspase-3의 절단을 억제하여 비알코올성 지방간질환에 의한 세포사멸을 억제할 수 있는 것을 의미한다.

- [70] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 gp130(Glycoprotein 130) 생성 억제; 및 STAT3(signal transducer and activator of transcription 3) 활성 억제; 로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 기작을 통해 비알코올성 지방간질환의 진행 및 전이를 억제할 수 있다.

- [71] Gp130 세포 표면 수용체는 글루코프로테인 130(Glycoprotein 130)으로 gp130, IL6ST, IL6-beta 및 CD130으로 알려져 있으며, 대사성 그리고 기타 스트레스성 세포 반응의 핵심 요소로, Gp130 매개 신호 전달 경로는 조혈, 면역 조절, 염증과 암에 있어서 중요한 역할을 한다. IL-6와 STAT3는 난소암의 진행뿐만 아니라 비알코올성 지방간 질환의 기전에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, Gp130/STAT3는 유리 지방산과 IL-6에 의해 JAK(Janus activated kinase)-신호전달 및 전사를 통해 활성화된다.

- [72] 본 발명의 일양태에서는, 팔미테이트(palmitate) 또는 인터루킨-6(IL-6) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하였을 때, gp130(Glycoprotein 130) 생성 정도 및 STAT3(signal transducer and activator of transcription 3) 인산화 정도를 웨스턴블랏으로 확인하고 이를 gp130/ β -actin 및 p-STAT3/STAT3로 수치화하였다. 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 IL-6에 의해 염증이 유도된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하면 STAT3 인산화가 현저하게 감소되는 것을 확인하였으며, gp130 단백질 발현량은 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 처리농도에 의존적으로 발현이 감소하는 것을 확인하였다.

- [73] 또한, 도 8은 팔미테이트 및/또는 IL-6 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하였을 때, gp130 생성 정도, STAT3 및 Tyk 인산화 정도를 웨스턴블랏으로 확인하고 이를 수치화한 데이터로, 팔미테이트 및 IL-6를 각각 단독 또는 동시처리하여 염증을 유도한 간세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하면, gp130 발현량, STAT3 및 티로신키나아제(tyrosine kinase: tyk) 인산화가 현저하게 감소하는 것을 확인하였다.

- [74] 이는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B가 gp130 생성 및 STAT3 활성을 억제하여

- 비알코올성 지방간질환의 진행 및 전이를 억제할 수 있다는 것을 의미한다.
- [75] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 AMPK(AMP-activated protein kinase) 활성화 촉진; 및 ACC(acetyl-CoA carboxylase) 활성화 억제; 로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 기작을 통해 간 내의 중성지방 함량 또는 지질 축적을 감소시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [76] 간내 지질축적은 지질 이용성(지질 흡수 또는 새로운 지방 생성) 및 배출의 감소(지방산 산화 또는 중성지방-풍부 지단백 분비)의 불균형에 의해 발생하며, 이로 인해 간의 지질독성(lipotoxicity) 및 손상을 포함하는 지방간을 초래한다.
- [77] AMPK(AMP-activated protein kinase: 5'AMP - 활성화 단백질 키나아제 또는 5' 아데노신 모노 포스페이트 - 활성화 단백질 키나제)는 세포의 분자 조절 및 에너지 항상성에 중요한 역할뿐만 아니라 비알코올성 지방간 질환(NAFLD)의 발병기전에 매우 중요한 효소로, 간에서 간 자식 작용, 콜레스테롤 합성, 지방산 합성, 지방 생성, 중성 지방 합성, 지방 세포의 지방 분해, 지방산 산화 및 케톤 생성을 조절하는 것으로 알려져 있다. AMPK는 췌장의 베타 세포에 의한 골격근 지방산 산화, 근육 포도당 흡수, 인슐린 분비의 조절을 조절하며, 거의 모든 조직에서 발현되고 있으며 NAFLD의 예방 및 치료뿐만 아니라, 다른 인체 질환들을 조절하는 단백질이다.
- [78] 또한, ACC(아세틸 CoA 카르복실라아제: Acetyl-CoA carboxylase)는 지방합성에 관여된 효소로, AMPK에 의해 ACC가 인산화되면 ACC가 불활성화되어 지방산 생합성을 저해하고, 지방산 산화과정을 촉진한다. 즉, AMPK의 활성이 증가함에 따라 ACC의 활성이 감소하게 되어 지방 생성을 억제하게 된다.
- [79] 본 발명의 일양태에서는, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의한 간 내 지질축적 또는 지방 생성 억제 효과를 확인하기 위해, 팔미테이트(palmitate) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 다음, AMPK 인산화 정도를 웨스턴블랏으로 확인하고 이를 수치화하였다.
- [80] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 팔미테이트(palmitate)만 처리한 그룹은 AMPK의 인산화가 감소한 반면, 팔미테이트를 처리하거나 처리하지 않은 그룹에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하면 AMPK 인산화(활성화)가 증가한 것을 확인하였다.
- [81] 도 10은 팔미테이트 및/또는 IL-6 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하였을 때, AMPK 및 ACC 인산화 정도를 웨스턴블랏으로 확인하고 이를 수치화한 데이터로, 팔미테이트 단독, 팔미테이트 및 IL-6를 동시에 처리한 그룹은 대조군에 비해 AMPK 인산화가 감소하여 결과적으로 ACC의 인산화도 감소하였으며, 이는 ACC 활성이 증가한 것으로, 지방합성이 촉진되는 것을 의미한다.
- [82] 반면, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 그룹은 AMPK 인산화가 증가함에 따라, ACC의 인산화가 증가하였으며, 이는 ACC이 불활성화된 것으로,

지방합성을 저해한 반면에 지방 산화 과정이 촉진되는 것을 의미한다.

- [83] 또한, 본 발명의 다른 일양태에서는, 팔미테이트(*palmitate*) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하였을 때, 간 세포 내 중성지방(*Triglyceride*: TG) 함량 및 지질축적 정도를 오일-레드-오(*oil-red-O*) 방법으로 확인하였으며, 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이 팔미테이트만 처리한 그룹은 간 세포 내 중성지방의 함량 및 지질축적이 대조군에 비해 급격히 증가한 반면, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 그룹은 간 세포 내 중성지방의 함량 및 지질축적이 현저하게 감소한 것을 확인하였다.
- [84] 도 12는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의한 SIRT 1의 활성화(지방대사, 글루코스 대사, 및 간세포 증식 관련) 및 단백질 발현 정도를 확인한 데이터로, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 처리에 의한 SIRT1 활성화 증가는 관찰되지 않았다. 또한, 팔미테이트에 의해 SIRT1 단백질 발현이 감소하는 것을 확인하였으나, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 처리에 의한 SIRT1 단백질 발현 증가는 관찰되지 않았다.
- [85] 즉, 마나산틴 A 및 마나산틴 B에 의한 지방대사, 간세포 증식, 중성지방의 함량 및 지질축적 감소 효과는 SIRT1 단백질 발현 촉진 또는 활성화 촉진에 의한 효과가 아닌 것을 확인하였다.
- [86] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 자식작용억제(*autophagy blockages*)에 관여하는 LC3(*Microtubule-associated protein light chain 3*)-II 또는 p62 단백질 생성 억제; AMPK(*AMP-activated protein kinase*) 활성화 촉진; 및 ACC(*acetyl-CoA carboxylase*) 활성화 억제; 로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 기작을 통해 비알코올성 지방간의 자식작용을 유도하는 것을 특징으로 한다.
- [87] 자식 작용(*autophagy* 또는 자가소화작용)은 리소좀을 통해 단백질, 지질, 세포기관 등의 불필요한 성분을 제거하는 하나의 기본적인 세포 내 메커니즘으로, 간 지질 대사, 인슐린 감수성 및 간조직 손상에 있어서 매우 중요한 역할을 가지고 있다. 인간에서 지방간은 자식 작용의 불균형을 유도하여 간 지질 축적 및 비 알코올성 지방 간염 (*NASH*)의 발생 및 진행에 관여하는 자식 작용 기능을 감소시키는 것으로 알려져 있다.
- [88] LC3(*Microtubule-associated protein light chain 3*)-II 또는 p62 단백질은 자식작용 억제(*autophagy blockages*)에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 포화지방산, 암모늄 클로라이드(*ammonium chloride*) 및 류펩틴(*leupeptin*)은 LC3-II 및 p62 단백질 발현을 조절하여 자식작용 정지를 유도하고, 이에 따른 자가식포(*autophagosomes*: APs)의 수 및 축적을 증가시키게 된다.
- [89] 본 발명의 일양태에서는, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의한 자식작용(*autophagy*) 유도효과를 확인하기 위해, 팔미테이트(*palmitate*) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 다음, LC3-II 및 p62 단백질 발현 정도를 웨스턴블랏으로 확인하고 이를 수치화 하였다. 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이 팔미테이트 처리된 간 세포는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 농도에

따라 LC3-II 및 p62 단백질 발현을 감소시키는 것을 확인하였으며, 특히 p62는 마나산틴 A 및 마나산틴 B 모두 20nM 농도에서 대조군과 비슷한 LC3-II 및 p62 단백질 발현정도를 보이는 것을 확인하였다.

- [90] 본 발명의 다른 일양태에서, 팔미테이트(palmitate) 또는 암모늄 클로라이드(ammonium chloride)/류펩틴(leupeptin) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 다음, LC3-II 및 p62 단백질 발현 정도를 웨스턴블랏으로 확인하고 이를 수치화하였다. 그 결과, 도 14에 나타난 바와 같이 팔미테이트 단독 처리, 팔미테이트/암모늄클로라이드/류펩틴을 동시에 처리한 군은 대조군에 비해 LC3-II 단백질 발현량이 급격히 증가한 반면, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 그룹은 LC3-II 단백질 발현량이 감소한 것을 확인하였으며, p62 단백질 역시 LC3-II 단백질과 마찬가지로 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 그룹에서는 p62 단백질 발현량이 감소한 것을 확인하였다.
- [91] 또한, AMPK가 인산화되어 활성화되면 자식작용을 유도하는 것으로 알려져 있으며, 본 발명의 또 다른 일양태에서 팔미테이트(palmitate) 또는 암모늄 클로라이드(ammonium chloride)/류펩틴(leupeptin) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 다음, AMPK 및 ACC 인산화 정도를 웨스턴블랏으로 확인하고 이를 수치화하였다. 그 결과, 도 15에 나타난 바와 같이 팔미테이트 단독 처리, 팔미테이트/암모늄클로라이드/류펩틴을 동시에 처리한 그룹은 대조군에 비해 AMPK 인산화(활성화)가 급격하게 감소한 반면, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 그룹은 AMPK 인산화가 현저하게 증가한 것을 확인하였으며, 마나산틴 A 및 마나산틴 B 모두 대조군에 비해 AMPK 인산화가 증가된 것을 확인하였다.
- [92] ACC의 경우, 팔미테이트 단독 처리, 팔미테이트/암모늄클로라이드/류펩틴을 동시에 처리한 그룹은 대조군에 비해 ACC 인산화(불활성화)가 감소 또는 증가하였으나, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 그룹에서는 ACC 인산화가 증가한 것을 확인하였다.
- [93] 본 발명의 다른 양태에서는, 팔미테이트(palmitate) 처리된 간세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의한 세포 기능 효과 여부를 확인하기 위해 단백질인산화효소 C(protein kinase C; PKC θ), 탈인산화효소-2(protein phosphatase-2A; PP2A) 및 세포외 신호조절인산화효소 1/2(Extracellular signal-regulated kinases 1/2; pERK1/2)의 발현정도를 확인하였다.
- [94] 팔미테이트(palmitate) 처리된 간세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 처리에 의해 PP2A 단백질 활성 및 발현 증가는 관찰되지 않은 반면, PKC θ 인산화(도 16)는 감소하였다.
- [95] 또한 ERK 1/2 인산화를 확인한 결과, 팔미테이트(palmitate) 처리된 간세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 처리에 의해 ERK1/2 인산화가 현저히 감소(도 17A 및 17B) 하였으며, 이것은 팔미테이트(palmitate)에 의해 ERK1/2 인산화가

증가되나, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B의 첨가로 ERK1/2 인산화가 현저히 감소되며, 감소된 ERK1/2 인산화로 인해 AMPK 활성이 증가한 것으로 확인되었다. 양성대조군으로는 U0126 및 PD184352를 사용하였으며 모두 ERK 1/2 활성을 저해하는 물질로 알려져 있다.

[96] 즉, 본 발명의 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의해 PP2A 발현이 조절되지는 않지만 PKC θ 및 ERK1/2의 인산화를 억제하여 c-Raf/MEK/ERK 경로 활성을 억제할 수 있으며, 이로 인해 AMPK 활성이 증가하는 것을 확인하였다.

[97] 또한, AMPK는 AMP(adenosine monophosphate)를 인식하여 활성이 증가하는 것으로 알려져 있어, 본 발명에서는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의한 AMPK 활성 증가 효과가 AMP 농도와 관련이 있는지 확인하기 위해 세포 내 AMP 및 ATP 비율을 측정했다. 그 결과, 도 18에 나타난 바와 같이, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 처리군의 경우 AMP/ATP 비율이 대조군과 비슷한 수준으로 증가하는 것을 확인하였다. 이는, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 처리에 의해 세포 내 AMP 농도가 증가함에 따라 AMPK 활성이 증가하는 것을 의미한다.

[98] 본 발명에서는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의한 비알코올성 지방간 질환의 예방 또는 치료효과를 확인하기 위해 인간 간 세포에 팔미테이트(palmitate)를 처리한 다음, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하여 본 발명의 도 4 내지 도 18과 같은 비알코올성 지방간 질환의 치료효과를 확인하였다. 또한, 본 발명에서는 상기 방법과 달리 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 다음, 팔미테이트를 처리하여 비알코올성 지방간 질환의 예방 효과를 확인하였으며, 예방 효과의 결과들은 모두 치료효과를 확인한 데이터와 동일한 결과를 보이는 것을 확인하였다.

[99] 즉, 본 발명의 마나산틴 A(manassantin A) 또는 마나산틴 B(manassantin B)를 포함하는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 치료용 조성물은 세포독성 및 유전독성이 없는 것을 확인하였으며, 도 19에 나타난 바와 같이, 마나산틴 A(manassantin A) 또는 마나산틴 B(manassantin B)는 1) 인터루킨-6(IL-6: interleukin-6) 및 인터루킨-8(IL-8: interleukin-8)로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 염증성 사이토카인 생성 억제; JNK(c-Jun N-terminal kinases) 활성 억제; 및 NF- κ B(nuclear factor-kappaB)의 활성 억제를 통해 비알코올성 지방간질환에 의한 염증억제; 2) 폴리(ADP-리보오스)중합효소(Poly ADP ribose polymerase: PARP) 또는 카스파제-3(caspase-3)의 생성을 억제하여 비알코올성 지방간질환에 의한 세포사멸 억제; 3) gp130(Glycoprotein 130) 생성 억제 또는 STAT3(signal transducer and activator of transcription 3) 활성을 억제하여 비알코올성 지방간질환의 진행 및 전이 억제; 4) AMPK(AMP-activated protein kinase) 활성을 촉진하거나, ACC(acetyl-CoA carboxylase) 활성을 억제하여 간 세포 또는 간 내의 중성지방 함량 또는 지질 축적 감소; 5) 자식작용억제(autophagy blockages)에 관여하는 LC3(Microtubule-associated protein light chain 3)-II 또는 p62 단백질 생성을 억제하거나, AMPK(AMP-activated

protein kinase) 활성 촉진을 통한 비알코올성 지방간의 자식작용 유도; 및 6) 비알코올성 지방간질환등에 관련이 있는 PKC θ (protein kinase C theta) 또는 ERK1/2(Extracellular signal-regulated kinases 1/2) 활성 억제; 로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 기작(효과)를 가지고 있으므로, 비알코올성 지방간 예방 및/또는 치료용 약학적 조성물 또는 비알코올성 지방간 및/또는 개선용 건강기능성 식품 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

[100] 본 발명에 따른 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 유효성분으로 포함하는 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 비알코올성 지방간을 예방 및/또는 치료 효능을 가진 다른 천연물질 또는 화합물이 추가로 포함될 수 있으며, 본 발명의 약학적 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 유효성분으로 포함하는 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 여러 가지 제형으로 제제화할 수 있다. 제제화할 경우에는 통상적으로 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제제화할 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 적어도 하나 이상의 부형제(예를 들면, 전분, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴) 등이 섞여 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등을 들 수 있는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween)61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[101] 본 발명에 따른 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 포함하는 비알코올성 지방간 예방 및 치료용 약학적 조성물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[102] 본 발명의 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 유효성분으로 포함하는 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 인체에 투여하는 경우, 천연 추출물인 관계로 다른 합성 의약품에 비하여 부작용의 우려가 적어 안심하고 사용할 수 있다.

[103] 또한, 본 발명은 상기 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 유효성분으로 포함하는 비알코올성 지방간 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다. 본

발명의 비알코올성 지방간 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 상기에 기재된 비알코올성 지방간 예방 또는 개선 효과를 가진다. 본 발명의 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 유효성분으로 포함하는 비알코올성 지방간 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 포함하는 건강기능식품의 종류는 특별히 한정되지 않으며, 예를 들어 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등일 수 있다.

- [104] 상기 건강식품은 상기 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 유효성분으로 포함하는 비알코올성 지방간 예방용 음료는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B가 유효성분으로 포함되는 것 이외에 칼슘, 가시오가피 농축액, 액상과당, 정제수 등을 첨가 혼합하여 드링크용 병에 충전하여 살균한 후 실온으로 냉각하여 음료를 제조할 수 있다. 또한, 상기 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 유효성분으로 포함하는 비알코올성 지방간 예방용 건강보조제는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 영양보조성분(비타민 B1, B2, B5, B6, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아미드), 올리고당, 50% 에탄올, 정제수를 첨가 혼합하여 과립상으로 성형하여 진공건조기에서 건조시킨 후, 12~14 메쉬(mesh)를 통과시켜 균일하게 과립을 제조하여 적당량으로 압출 성형하여 정제 또는 분말로 하거나 경질캡슐에 충전하여 경질캡슐제품으로 제조할 수 있다.

- [105] 상기 건강식품에 함유된 상기 마나산틴 A 또는 마나산틴 B의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으며, 유효성분의 혼합량은 예방 또는 치료적 처치 등의 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있다.

- [106] 이하 본 발명을 바람직한 실시예를 참고로 하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되는 것은 아니다.

- [107] [실시예 1]:마나산틴 A(manassantin A) 또는 마나산틴 B(manassantin B) 분리 및 정제

- [108] 본 발명에서는 삼백초로부터 마나산틴 A 및 마나산틴 B를 분리 및 정제하여 사용하였다. 먼저, 삼백초 2kg을 50°C 이하에서 건조 및 분쇄한 후 메탄올 2,000 ml을 이용하여 추출한 다음, 농축하여 건조시켜 326 g의 분말을 수득하였다. 그 다음 메탄올성 추출물은 증류수에 현탁시킨 후 n-헥산으로 순차적으로 분획하였다. 물 분획물은 에틸아세테이트(Ethyl Acetate: EtOAc)로 연속적으로 분획하였으며, EtOAc 분획물은 수분을 제거하기 위해서 황산 마그네슘으로 일곱번 여과하였다. 그 후, EtOAc 추출물은 플래쉬 실리카 겔 컬럼(6.5 × 45 cm;

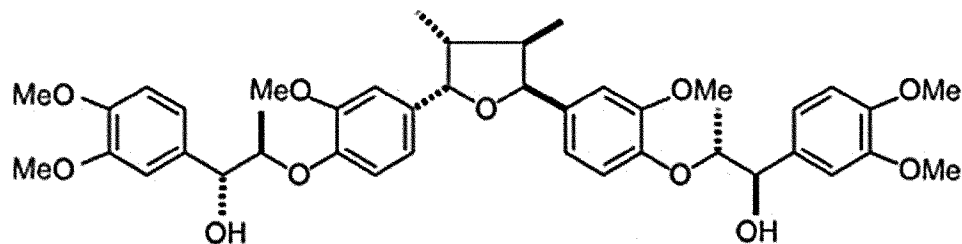
1.07734.9025, Merck, 독일)에 넣은 후, 4 종류의 n-헥산-아세톤(헥산 : 아세트산 에틸, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4) 용매를 이용하여 F1 내지 F4로 분획하였다.

[109] 상기 분획물 중 F1 분획물 및 F4 분획물을 세파텍스 LH-20 컬럼 크로마토그래피(17-0090-02, GE Healthcare Biosciences AB, 스웨덴) 및 ODS Sepak 카트리지(5122487, Grace Davison Discovery Sciences, 인도)에 적용(loading)한 후, 메탄올로 용출하여 화합물 1 및 화합물 2를 수득하였다.

[110] 상기 화합물 1 및 화합물 2는 HPLC(High Performance Liquid Chromatograph System; L-2455, Hitachi, 일본) 및 ¹H/¹³C-NMR 스펙트럼(nuclear magnetic resonance spectra; nuclear magnetic resonance spectra (JNM ECA-600, Jeol, 일본)을 이용하여 분석하였으며, 그 결과 도 1에 나타난 바와 같이 화합물은 1은 하기 화학식 1로 표시되는 마나산틴 A(manassantin A), 화합물 2는 하기 화학식 2로 표시되는 마나산틴 B(manassantin B)로 판명되었다.

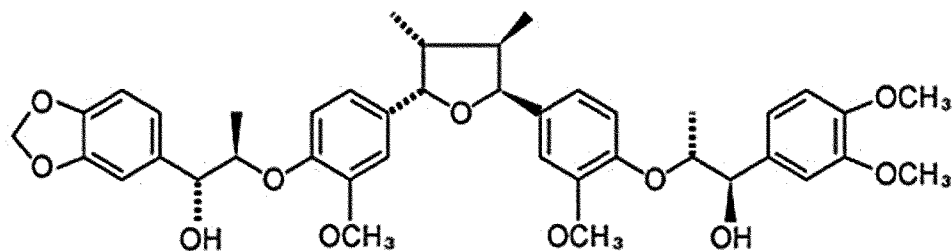
[111] [화학식 1]

[112]



[113] [화학식 2]

[114]



[115]

[116] [실시예 2]: 마나산틴 A 및 마나산틴 B의 독성 측정

[117] 본 발명에서는 실시예 1에서 수득한 마나산틴 A 또는 마나산틴 B의 세포 독성 및 유전독성 여부를 확인하기 위해, 인간 간 세포(Human primary hepatocytes, Hu4248, Invitrogen, 미국)에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 농도별로 처리한 다음, 세포 생존율을 측정하였다.

[118] 먼저, 인간 간 세포는 3×10^4 개의 세포가 되도록 6웰에 접종한 다음, plating 배지(cat.no, A1217601 및 CM3000, invitrogen, 미국)를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 24시간 동안 배양하였다. 그 다음, 실시예 1에서 수득한 마나산틴 A 또는 마나산틴 B의 농도가 0, 10, 40, 80, 160 nM이 되도록 1 μl 씩 첨가하고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였으며, 세포 생존율은 당업계에 공지된 트리판 블루 배제 분석 방법(trypsin blue exclusion assay)을 사용하여 측정하였다.

- [119] 그 결과, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B는 0 내지 80 nM 농도에서는 세포 독성이 관찰되지 않았으나, 160 nM 농도에서는 대조구에 비해 임계값인 85% 이하로 세포 생존율이 감소하여, 세포 사멸에 영향을 주는 것을 확인하였다.
- [120] 또한, 마나산틴 B의 세포독성 및 유전독성 효과를 확인하기 위해 S9 대사활성이 없는 그린 스크린 HC 분석(GreenScreen HC assay, Gentronix Limited, BioHub at Alderley Park, Alderley Edge, Cheshire SK10 4TG, 영국)을 의뢰하였다.
- [121] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 0 내지 80 nM 농도에서 세포 독성을 보이지 않았으며, 160 nM 농도 이상에서의 상대적인 세포 밀도는 대조군에 비해 임계값으로 설정한 80% 이하로 감소한 것을 확인하였다.
- [122] 하지만, HC 분석에서 형광유도 값은 0 내지 640 nM의 마나산틴 B에서 음성값(임계값이 1.5배(50%) 보다 이하)을 나타나는 것을 확인하였으며, 이는 마나산틴 B는 상기 범위 이내에서는 세포독성 및 유전 독성이 없다는 것을 의미한다.
- [123]
- [124] [실시예 3]:마나산틴 A 및 마나산틴 B의 비알코올성 지방간에 의한 염증 억제 활성확인
- [125] **3-1 : JNK 및 NF- κ B 인산화 정도 확인**
- [126] 본 발명에서는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의한 비알코올성 지방간의 염증 예방 및 치료효과가 있는지 확인하기 위해, 포화지방산인 팔미테이트(palmitate) 및/또는 인터루킨-6(IL-6) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 각각 처리하였다.
- [127] 간 세포 내 염증 유도를 위해서 팔미테이트 및 IL-6를 이용하였으며, 팔미테이트는 TNF- α , IL-6와 같은 사이토카인의 생성을 촉진시켜 염증을 유발하고 인슐린 저항성을 유도하며, IL-6는 다양한 염증성 사이토카인의 발현을 촉진하는 것으로 알려져 있다.
- [128] 먼저, 인간 간 세포(Huh-7, hepato cellular carcinoma)는 8×10^5 개의 세포가 되도록 6-웰에 접종한 다음, DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 24시간 동안 배양하였다. 실시예 1에서 수득한 마나산틴 A 또는 마나산틴 B의 농도가 20 nM이 되도록 1 μ l씩 첨가하고 1시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양한 다음, 팔미테이트(palmitate; 0.5 mM, P9767, Sigma-Aldrich, 미국)를 처리한 후, 10-12 시간 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양한 다음, 인터루킨-6(IL-6; 20 ng/ml, 9954, Cell signaling technology, 미국)을 각각 처리한 후 15분간 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.
- [129] 아무것도 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였으며, IL-6 처리군, 팔미테이트 처리군, 팔미테이트/IL-6/마나산틴 A 처리군, 팔미테이트/IL-6/마나산틴 B 처리군 및 팔미테이트/IL-6 처리군으로 나누어 처리하였다.
- [130] 상기에서 배양된 세포는 RIPA (R0278, Sigma-Aldrich, 미국) 버퍼에 단백질을 분해억제제 (P8340, Sigma-Aldrich, 미국) 및 인산화 탈억제제 (P0044,

Sigma-Aldrich, 미국)가 첨가된 공지된 방법을 사용하여 단백질을 분리하였으며, 분리된 단백질 농도는 BCA 단백질 어세이 키트(BCA protein assay kit; Thermo Scientific, 미국)을 이용하여 측정하였다.

- [131] 그 다음, 웰당 10~20 μ g의 단백질을 로딩하여 SDS-PAGE를 수행하였으며, 단백질은 당업계에 공지된 방법으로 PVDF 막(polyvinylidene fluoride membrane; Millipore, 미국)으로 전기이동(electrotransfer) 한 다음, PVDF 막을 5% 탈지분유가 포함된 TBST(tris buffered saline-0.1% Tween 20) 버퍼를 처리하여 1시간 동안 상온에서 블로킹하였다. 그 다음, 1차 항체(anti-pJNK, 9251; anti-tJNK, 9258; anti-pNF κ B, 3033; anti-NF κ B, 8242; β -actin, 4970; Cell signaling technology, 미국)를 처리하여 하룻밤 동안(대략적인 시간; 8~12시간) 반응시킨 다음 TBST로 세척하였다.
- [132] 그 후 겨자무과산화효소가 결합된 이차항체(horseradish peroxidase conjugated secondary antibody)를 포함하는 블로킹 용액을 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 다음, TBST로 세척하였다. 세척한 막을 화학발광 키트(enhanced chemiluminescence kit; Thermo Scientific, 미국)을 사용하여 매뉴얼에 따라 분석하였으며, 웨스턴블랏 결과중 pJNK 및 pNF- κ B 발현량을 수치화하기 위해 FlurChem M(Proteinsimple, 미국)을 이용하여 스캐닝 한 후, imageJ (National Institutes of Health Government Agency, 미국) 프로그램을 이용하여 정량하였다.
- [133] 그 결과, 도 4A 및 도 4B에 나타난 바와 같이, 팔미테이트 또는/및 IL-6에 의해 염증이 유도된 간 세포는 JNK 및 NF- κ B의 인산화 정도가 급격히 증가한 반면, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 그룹에서는 JNK 및 NF- κ B의 인산화 정도가 현저하게 감소한 것을 확인하였다.
- [134] JNK 및 NF- κ B의 인산화가 감소한 것은 JNK 및 NF- κ B의 활성이 감소하여 염증 반응이 감소한다는 것을 의미하는 것으로, 본 발명의 마나산틴 A 또는 마나산틴 B는 간 세포에서 염증 유발을 현저하게 감소시키는 것을 확인하였다.
- [135]
- [136] **3-2 : IL-8 및 IL-6 mRNA 발현 변화 확인**
- [137] 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의한 IL-8 및 IL-6 mRNA 발현량을 확인하기 위해, 실시예 3-1과 동일한 방법으로 실험을 수행한 다음, 배양된 세포를 수득하여 트라이졸 (Trizol, 15596-026, Invitrogen, 미국)를 이용하여 총 RNA(total RNA)를 수득하였다. 그 다음, 시디엔에이 합성키트 (cDNA 합성키트, 11146024, Invitrogen, 미국)를 이용하여 cDNA를 합성한 다음 하기 표 1의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.

[138] [표1]

Name		sequence(5' -> 3')	서열번호
IL-6	Forward	ACC TCA GAT TGT TGT TGT	서열번호 1
	Reverse	GTC CTA ACG CTC ATA CTT	서열번호 2
IL-8	Forward	CTA GGA CAA GAG CCA GGA AG	서열번호 3
	Reverse	GGT GGA AAG GTT TGG AGT ATG	서열번호 4
GAPDH	Forward	ACA GTC AGC CGC ATC TTC	서열번호 5
	Reverse	CTC CGA CCT TCA CCT TCC	서열번호 6

[139] 실시한 PCR은 하기의 조건으로 수행하였다; 95°C에서 10분 반응시킨 다음, 94°C에서 15초, 60°C에서 30초, 80°C에서 30초를 1 사이클(cycle)로 하여 40 사이클을 반복하였으며, 데이터 분석은 CFX96 Real-Time system (Bio-Rad, 미국)의 software를 이용하여 수행하였다.

[140] 상대적인 mRNA의 발현량은 ΔCT 방법을 사용하여 계산하였으며, 각 유전자의 mRNA 레벨은 GAPDH를 이용하여 노멀라이제이션(normalization) 하였다.

[141] 그 결과, 도 4C 및 도 4D에 나타난 바와 같이, 팔미테이트 또는 IL-6 처리에 의해 염증이 유발된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 그룹에서는 IL-8 및 IL-6 mRNA 발현량이 현저하게 감소하는 것을 확인하였으며, 본 발명의 마나산틴 A 또는 마나산틴 B는 간 세포에서 염증성 사이토카인의 발현을 현저하게 감소시키는 것을 확인하였다.

[142]

[143] **3-3 : TNF- α 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 처리에 따른 JNK 및 NF- κ B 인산화 정도 확인**

[144] 팔미테이트 또는 IL-6 이외에 종양괴사 인자- α (TNF- α : tumor necrosis factor- α)를 처리한 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하였을 때, JNK 및 NF- κ B 인산화를 확인하기 위해, 실시예 3-1과 동일한 방법으로 세포를 배양한 다음, 팔미테이트 또는 IL-6 대신 50 ng/ml의 TNF- α (8902, Cell signaling technology, 미국)를 처리한 다음, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 20 nM로 처리하였으며, 웨스턴블랏 수행을 위한 모든 실험은 실시예 3-1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[145] 아무것도 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였으며, TNF- α 처리군, TNF- α /마나산틴 A 처리군, TNF- α /마나산틴 B 처리군으로 나누어 처리하였다.

[146] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 도 4의 결과와 마찬가지로 TNF- α 에 의해 염증이 유발된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 그룹에서는 JNK 및 NF- κ B의 인산화 정도가 현저하게 감소한 것을 확인하였다.

[147]

[148] [실시예 4]:마나산틴 A 및 마나산틴 B의 비알코올성 지방간에 의한 세포사멸 억제 확인

[149] 본 발명에서는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B의 항 세포사멸 효과를 확인하기 위해, 팔미테이트(palmitate) 및/또는 인터루킨-6(IL-6) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 각각 처리한 다음, 폴리(ADP-리보오스)중합효소(Poly ADP ribose polymerase: PARP) 및 카스파제-3(caspase-3) 절단에 의한 활성 정도를 웨스턴블랏으로 확인하였다.

[150] 먼저, 실시예 3-1과 동일한 방법으로 세포를 배양한 다음, 팔미테이트 또는/및 IL-6를 처리한 후, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 10nM로 처리하였으며, 단백질을 분리하여 웨스턴블랏을 수행하였다. 웨스턴블랏 수행시 1차 항체는 항-PARP(anti-PARP; 9532, Cell signaling technology, 미국), 항-cPARP(anti-cPARP; 5625, Cell signaling technology, 미국), 항-CASP3(anti-CASP3; 9665 Cell signaling technology, 미국), 항-cCASP3(anti-cCASP3; 9665, Cell signaling technology, 미국) 및 항- β -actin(anti- β -actin; 4970, Cell signaling technology, 미국)를 사용하였다.

[151] 아무것도 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였으며, IL-6 처리군, 팔미테이트 처리군, 팔미테이트/IL-6/마나산틴 A 처리군, 팔미테이트/IL-6/마나산틴 B 처리군 및 팔미테이트/IL-6 처리군으로 나누어 처리하였다.

[152] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의해 절단된 PARP(cleaved-PARP) 및 절단된 caspase-3(cleaved-caspase-3) 생성이 현저하게 감소하는 것을 확인하였으며, 이는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B가 PARP 또는 caspase-3의 절단을 억제하여 비알코올성 지방간질환에 의한 세포사멸을 억제할 수 있는 것을 의미한다.

[153]

[154] [실시예 5]:마나산틴 A 및 마나산틴 B에 의한 비알코올성 지방간의 진행 및 전이 억제 확인

[155] **5-1: 팔미테이트 단독 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 처리에 따른 gp130 생성 및 STAT3 인산화 정도 확인**

[156] 본 발명에서는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하였을 때, 비알코올성 지방간의 진행 및 전이에 관련이 있는 gp130(Glycoprotein 130) 생성 정도 및 STAT3(signal transducer and activator of transcription 3) 인산화 정도를 확인하였다.

[157] 먼저, 실시예 3-1과 동일한 방법으로 세포를 배양한 다음, 팔미테이트를 처리한 후, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 각각 10nM, 20 nM로 처리하였으며, 단백질을 분리하여 웨스턴블랏을 수행하였다. 웨스턴블랏 수행시 1차 항체는 항-gp130(anti-gp130; 3732, Cell signaling technology, 미국), 항-pStat3(anti-pStat3; 9145, Cell signaling technology, 미국), 항-Stat3(anti-Stat3; 4904, Cell signaling technology, 미국) 및 항- β -actin(anti- β -actin; 4970, Cell signaling technology,

- 미국)를 사용하였다.
- [158] gp130 발현정도를 확인하는 실험에서는 아무것도 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였으며, 마나산틴 A 10 nM 처리군, 마나산틴 A 20 nM 처리군, 팔미테이트 처리군, 팔미테이트/마나산틴 A 10 nM 처리군, 팔미테이트/마나산틴 A 20 nM 처리군, 마나산틴 B 10 nM 처리군, 마나산틴 B 20 nM 처리군, 팔미테이트/마나산틴 B 10 nM 처리군, 팔미테이트 마나산틴 B 20 nM 처리군으로 나누어 실험을 수행하였다.
- [159] STAT3 인산화 정도를 확인하는 실험에서는 아무것도 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였으며, IL-6 처리군, IL-6/마나산틴 A 10 nM 처리군, IL-6/마나산틴 A 20 nM 처리군, IL-6/마나산틴 B 10 nM 처리군, IL-6/마나산틴 B 20 nM 처리군으로 나누어 실험을 수행하였다.
- [160] gp130 상대적 발현량은 β -actin 발현량과 비교하여 계산하였으며, STAT3 인산화정도는 인산화되지 않은 일반 STAT3 발현량과 비교하여 계산하였다.
- [161] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 IL-6에 의해 염증이 유도된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하면 STAT3 인산화가 현저하게 감소되는 것을 확인하였으며, gp130 단백질 발현량은 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 처리농도에 의존적으로 발현이 감소하는 것을 확인하였다.
- [162]
- [163] **5-2: 팔미테이트/IL-6 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 처리에 따른 gp130 생성, STAT3 및 Tyk 인산화 정도 확인**
- [164] 팔미테이트 및/또는 IL-6 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하였을 때, gp130 생성 정도, STAT3 및 Tyk 인산화 정도를 웨스턴블랏으로 확인하였다.
- [165] 먼저, 실시예 3-1과 동일한 방법으로 세포를 배양한 다음, 팔미테이트 및/또는 IL-6를 처리한 후, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하였으며, gp130 생성 확인을 위한 그룹에는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 각각 20 nM로 처리하였으며, STAT3 및 Tyk 인산화 정도 확인을 위한 그룹에는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 각각 10nM로 처리하였으며, 단백질을 분리하여 웨스턴블랏을 수행하였다. 웨스턴블랏 수행시 1차 항체는 실시예 5-1과 동일한 항체를 사용하였으며, 추가로 항-tyk2(anti-tyk2; 14193, Cell signaling technology, 미국) 및 항-ptyk2(anti-ptyk2; 9321, Cell signaling technology, 미국)를 사용하였다.
- [166] 아무것도 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였으며, IL-6 처리군, 팔미테이트 처리군, 팔미테이트/IL-6/마나산틴 A 처리군, 팔미테이트/IL-6/마나산틴 B 처리군 및 팔미테이트/IL-6 처리군으로 나누어 처리하였다.
- [167] gp130 상대적 발현량은 β -actin 발현량과 비교하여 계산하였으며, STAT3 및 tyk2 인산화정도는 인산화되지 않은 일반 STAT3 및 tyk2 발현량과 비교하여 계산하였다.
- [168] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 팔미테이트 및 IL-6를 각각 단독 또는

동시처리하여 염증을 유도한 간세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하면, gp130 발현량, STAT3 및 티로신키나아제(tyrosine kinase: tyk) 인산화가 현저하게 감소하는 것을 확인하였다.

[169] 이는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B가 gp130 생성 및 STAT3 활성을 억제하여 비알코올성 지방간질환의 진행 및 전이를 억제할 수 있다는 것을 의미한다.

[170] [실시예 6]:마나산틴 A 및 마나산틴 B에 의한 간 세포 내의 지질 축적 감소 확인

[171] **6-1: 팔미테이트 단독 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 처리에 따른 AMPK 인산화(활성화) 정도 확인**

[172] 본 발명에서는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의한 간 내 지질축적 또는 지방 생성 억제 효과를 확인하기 위해, 팔미테이트(palmitate) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 다음, AMPK 인산화 정도를 웨스턴블랏을 수행하였다.

[173] 먼저, 실시예 3-1과 동일한 방법으로 세포를 배양한 다음, 팔미테이트를 처리한 후, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 각각 10nM로 처리하였으며, 단백질을 분리하여 웨스턴블랏을 수행하였다. 웨스턴블랏 수행시 1차 항체는 항-AMPK(anti-AMPK; 2603, Cell signaling technology, 미국), 항-pAMPK(anti-pAMPK; 2531, Cell signaling technology, 미국) 및 항-β-actin(anti-β-actin; 4970, Cell signaling technology, 미국)를 사용하였다. AMPK 인산화정도는 인산화되지 않은 일반 AMPK 발현량과 비교하여 계산하였다.

[174] 아무것도 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였으며, 팔미테이트 처리군, 마나산틴 A 처리군, 마나산틴 B 처리군, 팔미테이트 처리군, 팔미테이트/마나산틴 A 처리군, 팔미테이트/마나산틴 B 처리군으로 나누어 처리하였다.

[175] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 팔미테이트(palmitate)만 처리한 그룹은 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 AMPK의 인산화가 감소한 반면, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 그룹은 대조군 및 팔미테이트 처리군에 비해 AMPK 인산화(활성화)가 현저히 증가한 것을 확인하였다.

[176]

[177] **6-2: 팔미테이트/IL-6 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 처리에 따른 AMPK 인산화(활성화) 및 ACC 인산화(불활성화) 정도 확인**

[178] 팔미테이트 및/또는 IL-6 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하였을 때, AMPK 및 ACC(아세틸 CoA 카르복실라아제; Acetyl-CoA carboxylase) 인산화 정도를 웨스턴블랏으로 확인하고자 하였다.

[179] 먼저, 실시예 3-1과 동일한 방법으로 세포를 배양한 다음, 팔미테이트 및/또는 IL-6를 처리한 후, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 각각 20nM로 처리하였으며, 단백질을 분리하여 웨스턴블랏을 수행하였다. 웨스턴블랏 수행시 1차 항체는 실시예 6-1과 동일한 항체를 사용하였으며, 추가로 항-ACC(anti-ACC; 3676, Cell signaling technology, 미국), 항-pACC(anti-pACC; 11818, Cell signaling technology,

미국) 및 항-FASN(anti-FASN; 3189, Cell signaling technology, 미국)을 사용하였다.

- [180] 아무것도 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였으며, IL-6 처리군, 팔미테이트 처리군, 팔미테이트/IL-6/마나산틴 A 처리군, 팔미테이트/IL-6/마나산틴 B 처리군 및 팔미테이트/IL-6 처리군으로 나누어 처리하였다.
- [181] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이 팔미테이트 단독, 팔미테이트 및 IL-6를 동시에 처리한 그룹은 대조군에 비해 AMPK 인산화가 감소하여 결과적으로 ACC의 인산화도 감소하였으며, 이는 ACC 활성이 증가한 것으로, 지방합성이 촉진되는 것을 의미한다.
- [182] 반면, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 그룹은 AMPK 인산화가 증가함에 따라, ACC의 인산화가 증가하는 것을 확인하였다. 이는 ACC가 불활성화된 것으로, 지방합성을 저해하고 지방 산화를 촉진하는 것을 의미한다.
- [183]
- [184] [실시예 7]:마나산틴 A 및 마나산틴 B에 의한 간 세포 내의 중성지방 함량 및 지질축적 확인
- [185] **7-1: 중성지방 및 지질축적 확인**
- [186] 팔미테이트(palmitate) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리하였을 때, 간 세포 내 중성지방(Triglyceride: TG) 함량 및 지질축적 정도를 오일-레드-오(oil-red-O) 방법에 의한 광학 현미경 및 간 세포내 직접 전자 현미경으로 측정하였다. 먼저, 실시예 3-1과 동일한 방법으로 세포를 배양한 다음, 팔미테이트를 처리한 후, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 각각 20 nM로 처리하였으며, L-Type TG M kit(Wako chemicals Co., 일본)을 사용하여 중성지방을 정량하였다. 각 처리구에 대한 중성지방 축적 정도는 단백질 양을 측정(BCA 측정방법)하여 노멀라이제이션 (normalization) 하였다.
- [187] 또한, 간 세포내 지방 염색 방법(오일-레드-오, Oil-red-O)은 지방 염색 키트{Lipid (Oil Red O) Staining kit, K580-24, BioVision, 미국}를 이용하여 관찰하였다. 모든 방법은 제조회사의 매뉴얼에 따라 하였으며, 염색한 다음 간 세포 내 지질 축적정도를 파악하기 위해 광학 현미경(Nikon microscope, Nikon, 일본)를 사용하였다.
- [188] 간 세포내 지방 축적을 조사하기 위해서 전자 현미경을 관찰하였다. 팔미테이트를 처리한 후, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 각각 20 nM로 처리하였으며, 트립신-이디티에 (trypsin-EDTA; T4049, Sigma-Aldrich, 미국)를 처리한 후, 원심분리를 하여 세포를 수급한 다음, 주립 버어지아 의대 (VCU Medical center, Richmond, VA, 미국), 현미경 분석실에 의뢰하였다.
- [189] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이 팔미테이트만 처리한 그룹은 간 세포 내 중성지방의 함량 및 지질축적이 대조군에 비해 급격히 증가한 반면, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 그룹은 간 세포 내 중성지방의 함량 및 지질축적이 현저하게 감소한 것을 확인하였다.

[190]

[191] 7-2 : 지방대사, 글루코스 대사, 및 간세포 증식 관련 단백질인 SIRT1 발현정도 확인

[192] 본 발명에서는 마나산틴 A 및 마나산틴 B에 의한 비알코올성 지방간 예방/치료 효과가 지방대사, 글루코스 대사, 및 간세포 증식 관련 단백질인 SIRT 1 발현 조절과 관련이 있는지 확인하기 위해, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 SIRT1 기질과 직접반응시켜 SIRT 1 활성을 측정하였다. 양성대조군으로는 레스베라트롤(resveratrol)을 사용하였으며, 레스베라트롤은 식물에서 발견되는 항산화물질로 SIRT 1의 발현을 증가시켜 지방분해 등 여러 대사과정에 관여하는 것으로 알려져있다.

[193] SIRT 1 활성은 SIRT1 직접 형광 스크린 에세이 키트(SIRT1 Direct Fluorescent Screening Assay Kit, Cat no. 10010401, 미국)를 이용하여 측정하였으며, 도 12A에 나타난 바와 같이, 레스베라트롤 처리에 의해 SIRT 1 활성이 급격히 증가하는 것을 확인하였으나, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의해서는 활성이 증가하지 않는 것을 관찰하였다.

[194] 다음으로는, SIRT 1 단백질 발현 정도를 웨스턴블랏으로 확인하였다.

[195] 먼저, 실시예 3-1과 동일한 방법으로 세포를 배양한 다음, 팔미테이트를 처리한 후, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 각각 20, 40 nM로 처리하였으며, 단백질을 분리하여 웨스턴블랏을 수행하였다. 웨스턴블랏 수행시 1차 항체는 항-SIRT1(anti-SIRT 1; cat. no, 2496, Cell signaling technology, 미국) 및 항-β-actin(anti-β-actin; 4970, Cell signaling technology, 미국)를 사용하였다.

[196] 아무것도 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였으며, 마나산틴 A 20 nM 처리군, 마나산틴 B 20 nM 처리군, 팔미테이트 처리군, 팔미테이트/마나산틴 A 20 nM 처리군, 팔미테이트/마나산틴 B 20 nM 처리군으로 나누어 실험을 수행하였다.

[197] 그 결과 도 12B 및 도 12C에 나타난 바와 같이, 팔미테이트에 의해 SIRT 1 단백질 발현이 감소하는 것을 확인하였으나, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 처리에 의한 SIRT 1 단백질 발현 증가는 관찰되지 않았다.

[198] 즉, 마나산틴 A 및 마나산틴 B에 의한 지방대사, 글루코스 대사, 및 간세포 증식 효과는 SIRT 1 단백질 발현 또는 활성 촉진에 의한 효과가 아닌 것을 확인하였다.

[199]

[200] [실시예 8]:마나산틴 A 및 마나산틴 B에 의한 비알코올성 지방간에서 자식 작용(autophagy) 유도

[201] 8-1 : 팔미테이트 단독 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 처리에 따른 LC3-II 및 p62 단백질 발현 정도 확인

[202] 본 발명에서는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의한 자식작용(autophagy) 유도효과를 확인하기 위해, 팔미테이트(palmitate) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 다음, LC3-II 및 p62 단백질 발현 정도를 웨스턴블랏으로 확인하였다.

- [203] 먼저, 실시예 3-1과 동일한 방법으로 세포를 배양한 다음, 팔미테이트를 처리한 후, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 각각 10, 20, 40 nM로 처리하였으며, 단백질을 분리하여 웨스턴블랏을 수행하였다. 웨스턴블랏 수행시 1차 항체는 항-LC3-II(anti-LC3-I,II; 4108, Cell signaling technology, 미국), 항-p62(anti-p62; 8025, Cell signaling technology, 미국) 및 항- β -actin(anti- β -actin; 4970, Cell signaling technology, 미국)를 사용하였다.
- [204] 아무것도 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였으며, 팔미테이트 처리군, 팔미테이트/마나산틴 A 10 nM 처리군, 팔미테이트/마나산틴 A 20 nM 처리군, 팔미테이트/마나산틴 A 40 nM 처리군, 팔미테이트/마나산틴 B 10 nM 처리군, 팔미테이트/마나산틴 B 20 nM 처리군, 팔미테이트/마나산틴 B 40 nM 처리군으로 나누어 실험을 수행하였다.
- [205] 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이 팔미테이트 처리된 간 세포는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 농도 의존적으로 LC3-II 및 p62 단백질 발현을 감소시키는 것을 확인하였으며, 특히 p62는 마나산틴 A 및 마나산틴 B 모두 20nM 농도에서 대조군과 비슷한 LC3-II 및 p62 단백질 발현정도를 보이는 것을 확인하였다.
- [206]
- [207] **8-2 : 팔미테이트(palmitate) 또는 암모늄 클로라이드(ammonium chloride)/류펩틴(leupeptin) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 처리에 따른 LC3-II 및 p62 단백질 발현 정도 확인**
- [208] 본 발명에서는 팔미테이트(palmitate) 또는 암모늄 클로라이드(ammonium chloride: NH_4Cl)/류펩틴(leupeptin: Leup) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 다음, LC3-II 및 p62 단백질 발현 정도를 웨스턴블랏으로 확인하였다.
- [209] 먼저, 실시예 3-1과 동일한 방법으로 세포를 배양한 다음, 팔미테이트 또는 암모늄 클로라이드(20mM, ammonium chloride, A9434, Sigma-Aldrich, 미국)/류펩틴 (100uM, leupeptin, Sigma-Aldrich, 미국)를 처리한 후, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 각각 20 nM로 처리하였으며, 단백질을 분리하여 웨스턴블랏을 수행하였다.
- [210] 웨스턴블랏 수행시 1차 항체는 실시예 8-1과 동일한 항체를 사용하였으며, LC3-II 및 p62 상대적 발현량은 β -actin 발현량과 비교하여 계산하였다.
- [211] 아무것도 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였으며, 마나산틴 A 처리군, 마나산틴 B 처리군, 팔미테이트 처리군, 팔미테이트/마나산틴 A 처리군, 팔미테이트/마나산틴 B 처리군, 팔미테이트/ NH_4Cl /Leup 처리군, 팔미테이트/ NH_4Cl /Leup/마나산틴 A 처리군, 팔미테이트/ NH_4Cl /Leup/마나산틴 B 처리군으로 나누어 실험을 수행하였다.
- [212] 그 결과, 도 14에 나타난 바와 같이 팔미테이트 단독 처리, 팔미테이트/암모늄클로라이드/류펩틴을 동시에 처리한 군은 대조군에 비해 LC3-II 단백질 발현량이 급격히 증가한 반면, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를

처리한 군은 LC3-II 단백질 발현량이 감소한 것을 확인하였다.

- [213] p63 단백질 또한 LC3-II 단백질과 마찬가지로, 팔미테이트/암모늄클로라이드/류펩틴을 동시에 처리한 군에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 군은 대조군에 비해 p63 단백질 발현량이 감소한 것을 확인하였다.

[214]

- [215] **8-3 : 팔미테이트(palmitate) 또는 암모늄 클로라이드(ammonium chloride)/류펩틴(leupeptin) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 처리에 따른 AMPK 인산화(활성화) 및 ACC 인산화(불활성화) 정도 확인**

- [216] 본 발명에서는 팔미테이트(palmitate) 또는 암모늄 클로라이드(ammonium chloride)/류펩틴(leupeptin) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 다음, AMPK 및 ACC 인산화 정도를 웨스턴블랏으로 확인하였다.

- [217] 먼저, 실시예 8-2와 동일한 방법으로 세포를 배양한 다음, 단백질을 분리하여 웨스턴블랏을 수행하였다.

- [218] 웨스턴블랏 수행시 1차 항체는 실시예 6-2와 동일한 항체를 사용하였으며, AMPK 및 ACC 인산화 정도는 일반적인 AMPK 및 ACC의 발현량과 각각 비교하여 계산하였다. 그 결과, 도 15에 나타난 바와 같이 팔미테이트 단독 처리, 팔미테이트/암모늄클로라이드/류펩틴 처리군은 대조군에 비해 AMPK 인산화(활성화)가 급격하게 감소한 반면, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 같이 처리한 군은 AMPK 인산화가 현저하게 증가한 것을 확인하였으며, 마나산틴 A 및 마나산틴 B 모두 대조군에 비해 AMPK 인산화가 증가된 것을 확인하였다.

- [219] ACC의 경우, 팔미테이트 처리군, 팔미테이트/암모늄클로라이드/류펩틴 처리군은 대조군에 비해 ACC 인산화(불활성화)가 감소 또는 증가하였으나, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 그룹에서는 ACC 인산화가 증가한 것을 확인하였다.

[220]

- [221] [실시예 9]:비알코올성 지방간에서 마나산틴 A 및 마나산틴 B에 의한 세포 기능 저하 억제(cell dysfunction) 효과 확인

- [222] 본 발명에서는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의한 세포 기능 저하 억제 효과 여부를 확인하기 위해 단백질인산화효소 C(protein kinase C; PKC θ), 탈인산화효소-2(phosphatase-2; PP2A) 및 세포외 신호조절인산화효소 1/2(Extracellular signal-regulated kinases 1/2; pERK)의 발현정도를 확인하였다.

- [223] **9-1 : PKC θ 및 PP2A 발현 확인**

- [224] 본 발명에서는 팔미테이트(palmitate) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 다음, PKC θ 및 PP2A의 발현 정도를 웨스턴블랏으로 확인하였다.

- [225] 먼저, 실시예 3-1과 동일한 방법으로 세포를 배양한 다음, 팔미테이트를 처리한 후, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 각각 20 nM로 처리하였으며, 단백질을

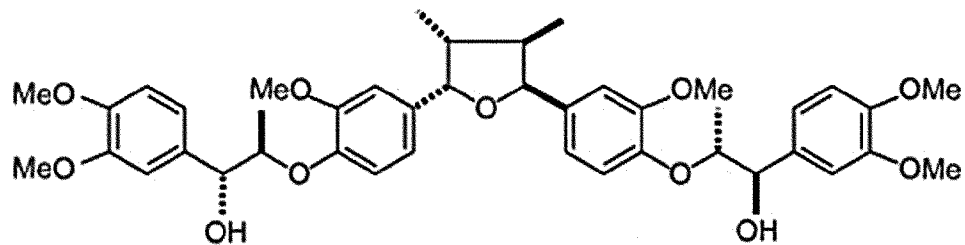
- 분리하여 웨스턴블랏을 수행하였다. 웨스턴블랏 수행시 1차 항체는 항-PP2A(anti-PP2A; cat.no 2041; Cell signaling technology, 미국), 항-PKC θ (anti-PKC θ ; cat. no 12206; Cell signaling technology, 미국), 항-pPKC θ (anti-pPKC θ ; cat. no 9377; Cell signaling technology, 미국) 및 항- β -actin(anti- β -actin; 4970, Cell signaling technology, 미국)를 사용하였다.
- [226] 아무것도 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였으며, 팔미테이트 처리군, 팔미테이트/마나산틴 A 20 nM 처리군, 팔미테이트/마나산틴 B 20 nM 처리군으로 나누어 실험을 수행하였다.
- [227] 그 결과, 도 16에 나타난 바와 같이, 팔미테이트 처리군 및 대조군은 PP2A 단백질 발현의 변화가 없었으나(도 16A), 팔미테이트 처리군에서 PP2A 단백질 활성은 증가한 것을 확인하였다(도 16B). 또한, 팔미테이트/마나산틴 A 20 nM 처리군 및 팔미테이트/마나산틴 B 20 nM 처리군의 PP2A 단백질 활성 및 발현에는 변화가 없는 것을 확인하였다(도 16A 및 도 16B).
- [228] 반면, 팔미테이트 처리군에서 PKC θ 인산화는 증가한 것을 확인하였으며, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 군은 PKC θ 인산화가 현저하게 감소한 것을 확인하였다.
- [229]
- [230] 9-2 : ERK 1/2 활성 억제 효과 확인
- [231] 본 발명에서는 팔미테이트(palmitate) 처리된 간 세포에 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 다음, ERK 1/2의 인산화 정도를 웨스턴블랏으로 확인하였다. 양성대조군으로는 U0126 및 PD184352를 사용하였으며 모두 ERK 1/2 활성을 저해하는 물질로 알려져 있다.
- [232] 먼저, 실시예 3-1과 동일한 방법으로 세포를 배양한 다음, 팔미테이트를 처리하고, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 각각 20 nM로 처리하였으며, 단백질을 분리하여 웨스턴블랏을 수행하였다. 웨스턴블랏 수행시 1차 항체는 항-ERK 1/2(anti-ERK 1/2; cat. no 9102; Cell signaling technology, 미국), 항-pERK 1/2(anti-pERK 1/2; cat. no 9101; Cell signaling technology, 미국), 항-AMPK(anti-AMPK; 2603, Cell signaling technology, 미국), 항-pAMPK(anti-pAMPK; 2531, Cell signaling technology, 미국) 및 항- β -actin(anti- β -actin; 4970, Cell signaling technology, 미국)을 사용하였다.
- [233] 아무것도 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였으며, 팔미테이트 처리군, 팔미테이트/U0126 25 μ M 처리군, 팔미테이트/PD184352 1 μ M 처리군, 팔미테이트/마나산틴 A 20 nM 처리군, 팔미테이트/마나산틴 B 20 nM 처리군으로 나누어 실험을 수행하였다.
- [234] 그 결과, 도 17에 나타난 바와 같이, 팔미테이트 단독 처리군은 대조군에 비해 ERK1/2 인산화가 증가하고, AMPK 인산화가 감소한 것을 확인한 반면, 양성대조군 처리군(U0126 및 PD184352)은 팔미테이트 단독 처리군에 비해 ERK1/2 인산화가 감소하고, AMPK 인산화가 증가한 것을 확인하였다.

- [235] 또한, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 처리한 군은 양성대조군인 U0126 처리군과 비슷한 수준으로 ERK1/2 인산화가 감소하고, AMPK 인산화가 증가한 것을 확인하였다.
- [236] 즉, 본 발명의 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의해 ERK1/2의 인산화를 억제하여 c-Raf/MEK/ERK 경로 활성을 억제할 수 있으며, 이로 인해 AMPK 활성이 증가하는 것을 확인하였다.
- [237]
- [238] 9-3 : AMP/ATP 비율 확인
- [239] AMPK는 AMP(adenosine monophosphate) 생성 수준에 의해 활성이 증가하는 것으로 알려져 있다.
- [240] 본 발명에서는 마나산틴 A 또는 마나산틴 B에 의한 AMPK 활성 증가 효과가 AMP 및 ATP 농도 비율과 관련이 있는지 확인하기 위해 세포 내 AMP 및 ATP 비율을 측정하였다.
- [241] 먼저, 실시예 3-1과 동일한 방법으로 세포를 배양한 다음, 팔미테이트를 처리한 후, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B를 각각 20 nM로 처리하였으며, 세포 내 AMP (AMP-Glo assay kit, promega, 미국) 및 ATP (The ENLITEN ATP assay kit, promega, 미국) 농도 측정은 각각의 에세이 키트를 이용하여 측정하였다.
- [242] 아무것도 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였으며, 팔미테이트 처리군, 팔미테이트/마나산틴 A 20 nM 처리군, 팔미테이트/마나산틴 B 20 nM 처리군으로 나누어 실험을 수행하였다.
- [243] 그 결과, 도 18에 나타난 바와 같이, 팔미테이트 단독 처리군은 대조군에 비해 AMP/ATP 비율이 감소한 반면, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 처리군의 경우 AMP/ATP 비율이 대조군과 비슷한 수준으로 증가하는 것을 확인하였다.
- [244] 즉, 마나산틴 A 또는 마나산틴 B 처리에 의해 세포 내 AMP 농도가 증가함에 따라 AMPK 활성이 증가하는 것을 확인하였다.
- [245]
- [246] 이상으로, 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

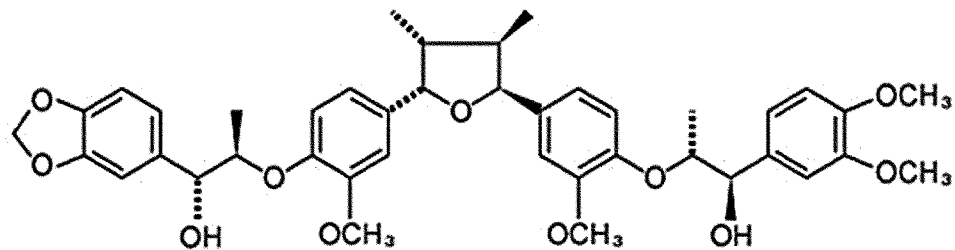
청구범위

- [청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 마나산틴 A(manassantin A); 하기 화학식 2로 표시되는 마나산틴 B(manassantin B); 및 이들의 염; 중에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 포함하는 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물;

[화학식 1]



[화학식 2]



- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 마나산틴 A(manassantin A) 또는 마나산틴 B(manassantin B)는 삼백초(*Saururus chinensis* (Lour.) Baill) 유래인 것을 특징으로 하는 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 인터루킨-6(IL-6: interleukin-6) 및 인터루킨-8(IL-8: interleukin-8)로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 염증성 사이토카인 생성 억제;

JNK(c-Jun N-terminal kinases) 활성 억제; 및

NF-κB(nuclear factor-kappaB) 활성 억제;

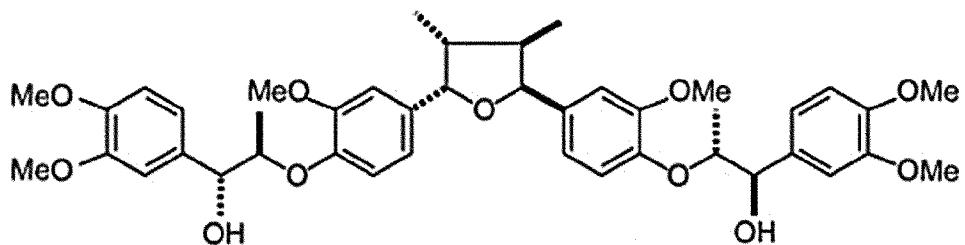
로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 기작을 통해 비알코올성 지방간질환에 의한 염증을 억제하는 것을 특징으로 하는 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 폴리(ADP-리보오스)중합효소(Poly ADP ribose polymerase: PARP) 절단(cleave) 억제; 및

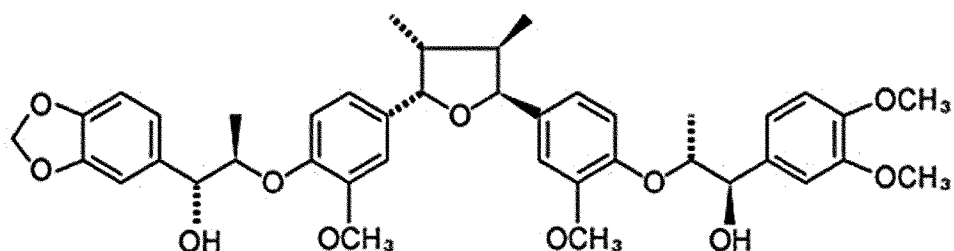
카스파제-3(caspase-3) 절단(cleave) 억제;

로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 기작을 통해 비알코올성 지방간에 의한 세포사멸을 억제하는 것을 특징으로 하는 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 조성물은
gp130(Glycoprotein 130) 생성 억제; 및
STAT3(signal transducer and activator of transcription 3) 활성 억제;
로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 기작을 통해 비알코올성
지방간질환의 진행 및 전이를 억제하는 것을 특징으로 하는 비알코올성
지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 조성물은
AMPK(AMP-activated protein kinase) 활성 촉진; 및
ACC(acetyl-CoA carboxylase) 활성 억제;
로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 기작을 통해 간 내의 중성지방
함량 또는 지질 축적을 감소시키는 것을 특징으로 하는 비알코올성
지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 조성물은
자식작용억제(autophagy blockages)에 관여하는
LC3(Microtubule-associated protein light chain 3)-II 또는 p62 단백질 생성
억제;
AMPK(AMP-activated protein kinase) 활성 촉진; 및
ACC(acetyl-CoA carboxylase) 활성 억제;
로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 기작을 통해 비알코올성
지방간의 자식작용을 유도하는 것을 특징으로 하는 비알코올성 지방간
예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 8] 하기 화학식 1로 표시되는 마나산틴 A(manassantin A); 하기 화학식 2로
표시되는 마나산틴 B(manassantin B); 및 이들의 염; 중에서 선택되는 1종
이상의 화합물을 포함하는 비알코올성 지방간 예방 또는 개선용
건강기능식품용 조성물;
[화학식 1]



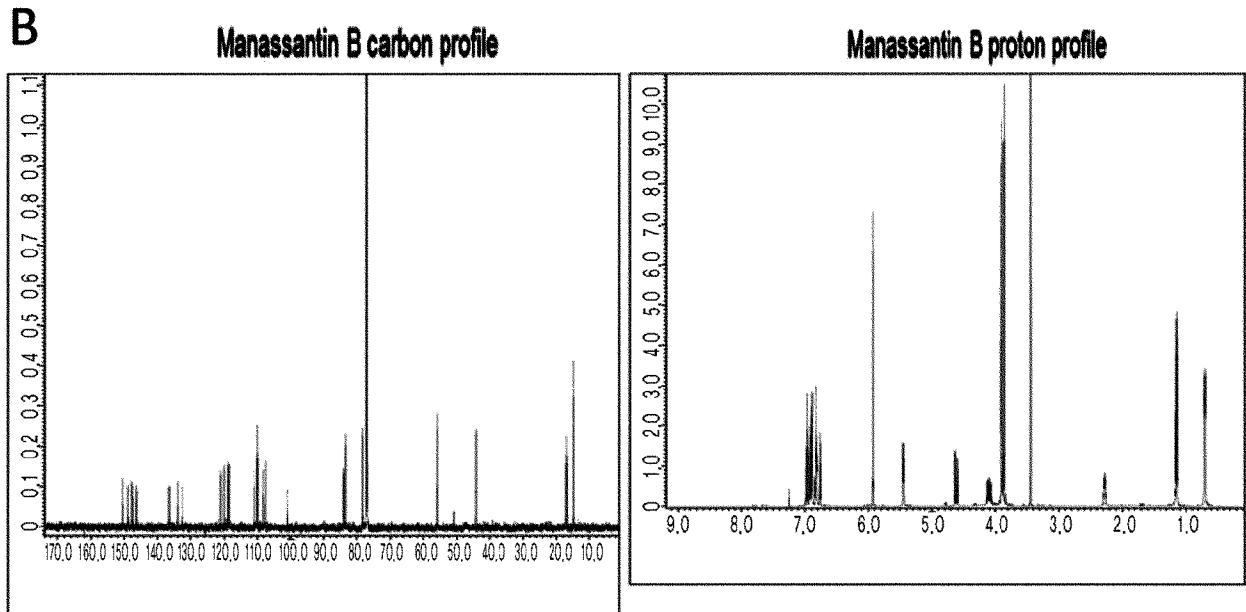
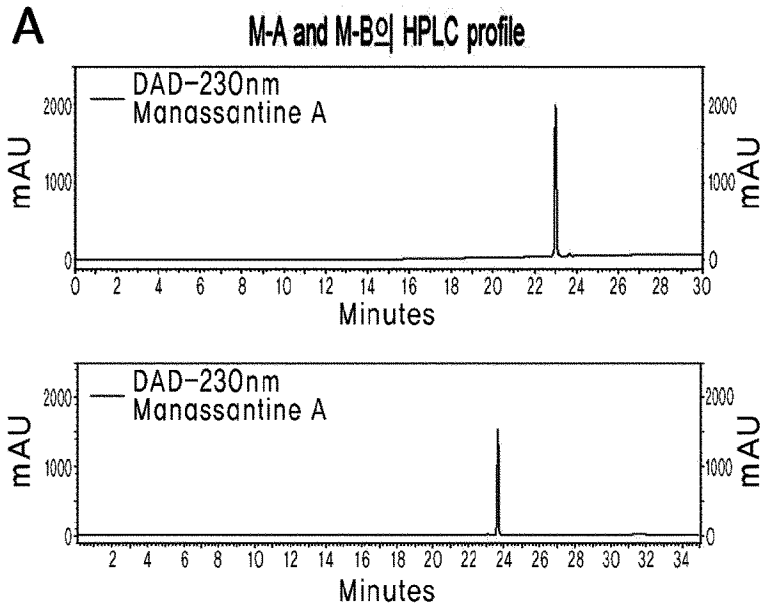
[화학식 2]



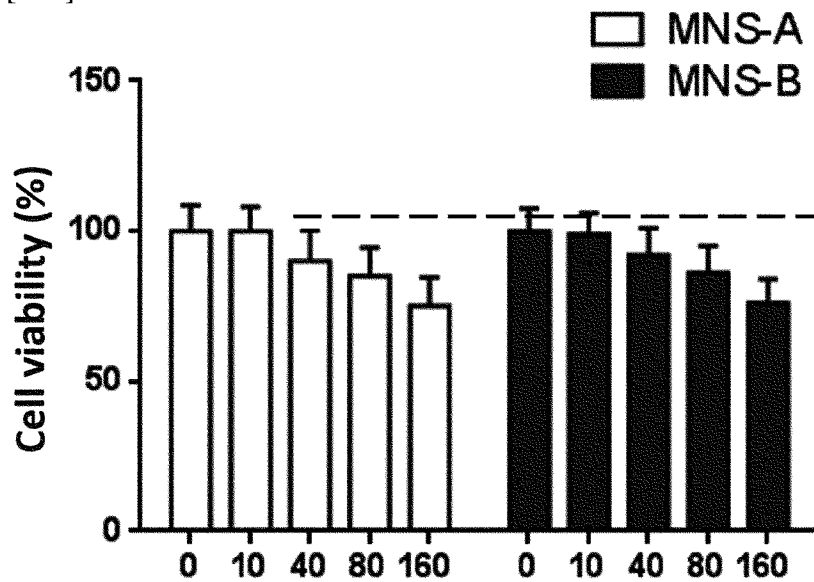
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 마나산틴 A(manassantin A) 또는 마나산틴 B(manassantin B)는 삼백초(*Saururus chinensis* (Lour.) Baill) 유래인 것을 특징으로 하는 비알코올성 지방간 예방 또는 개선용 건강기능식품용 조성물.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 조성물은 인터루킨-6(IL-6: interleukin-6) 및 인터루킨-8(IL-8: interleukin-8)로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 염증성 사이토카인 생성 억제; JNK(c-Jun N-terminal kinases) 활성 억제; 및 NF-κB(nuclear factor-kappaB) 활성 억제; 로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 기작을 통해 비알코올성 지방간질환에 의한 염증을 억제하는 것을 특징으로 하는 비알코올성 지방간 예방 또는 개선용 건강기능식품용 조성물.
- [청구항 11] 제8항에 있어서, 상기 조성물은 폴리(ADP-리보오스)중합효소(Poly ADP ribose polymerase: PARP) 절단(cleave) 억제; 및 카스파제-3(caspase-3) 절단(cleave) 억제; 로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 기작을 통해 비알코올성 지방간에 의한 세포사멸을 억제하는 것을 특징으로 하는 비알코올성 지방간 예방 또는 개선용 건강기능식품용 조성물.
- [청구항 12] 제8항에 있어서, 상기 조성물은 gp130(Glycoprotein 130) 생성 억제; 및 STAT3(signal transducer and activator of transcription 3) 활성 억제; 로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 기작을 통해 비알코올성 지방간질환의 진행 및 전이를 억제하는 것을 특징으로 하는 비알코올성 지방간 예방 또는 개선용 건강기능식품용 조성물.
- [청구항 13] 제8항에 있어서, 상기 조성물은 AMPK(AMP-activated protein kinase) 활성 촉진; 및 ACC(acetyl-CoA carboxylase) 활성 억제; 로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 기작을 통해 간 내의 중성지방 함량 또는 지질 축적을 감소시키는 것을 특징으로 하는 비알코올성 지방간 예방 또는 개선용 건강기능식품용 조성물.
- [청구항 14] 제8항에 있어서, 상기 조성물은 자식작용억제(autophagy blockages)에 관여하는 LC3(Microtubule-associated protein light chain 3)-II 또는 p62 단백질 생성 억제; AMPK(AMP-activated protein kinase) 활성 촉진; 및 ACC(acetyl-CoA carboxylase) 활성 억제;

로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상의 기작을 통해 비알코올성 지방간의 자식작용을 유도하는 것을 특징으로 하는 비알코올성 지방간 예방 또는 개선용 건강기능식품용 조성물.

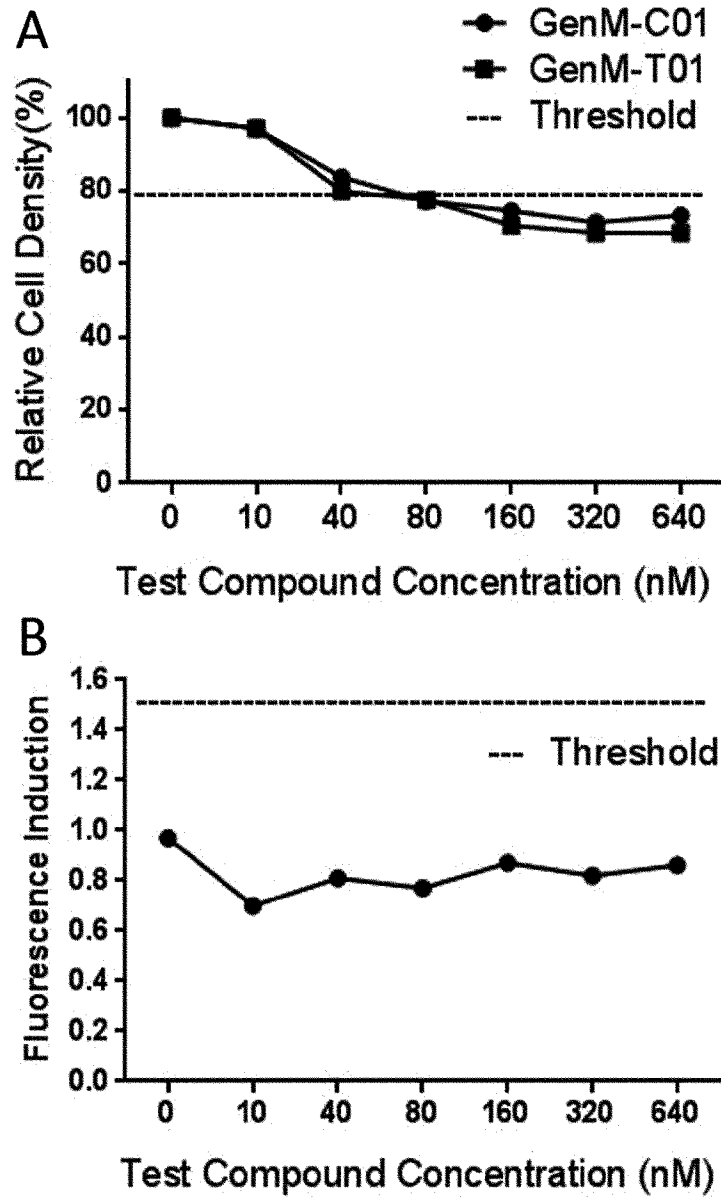
[도1]



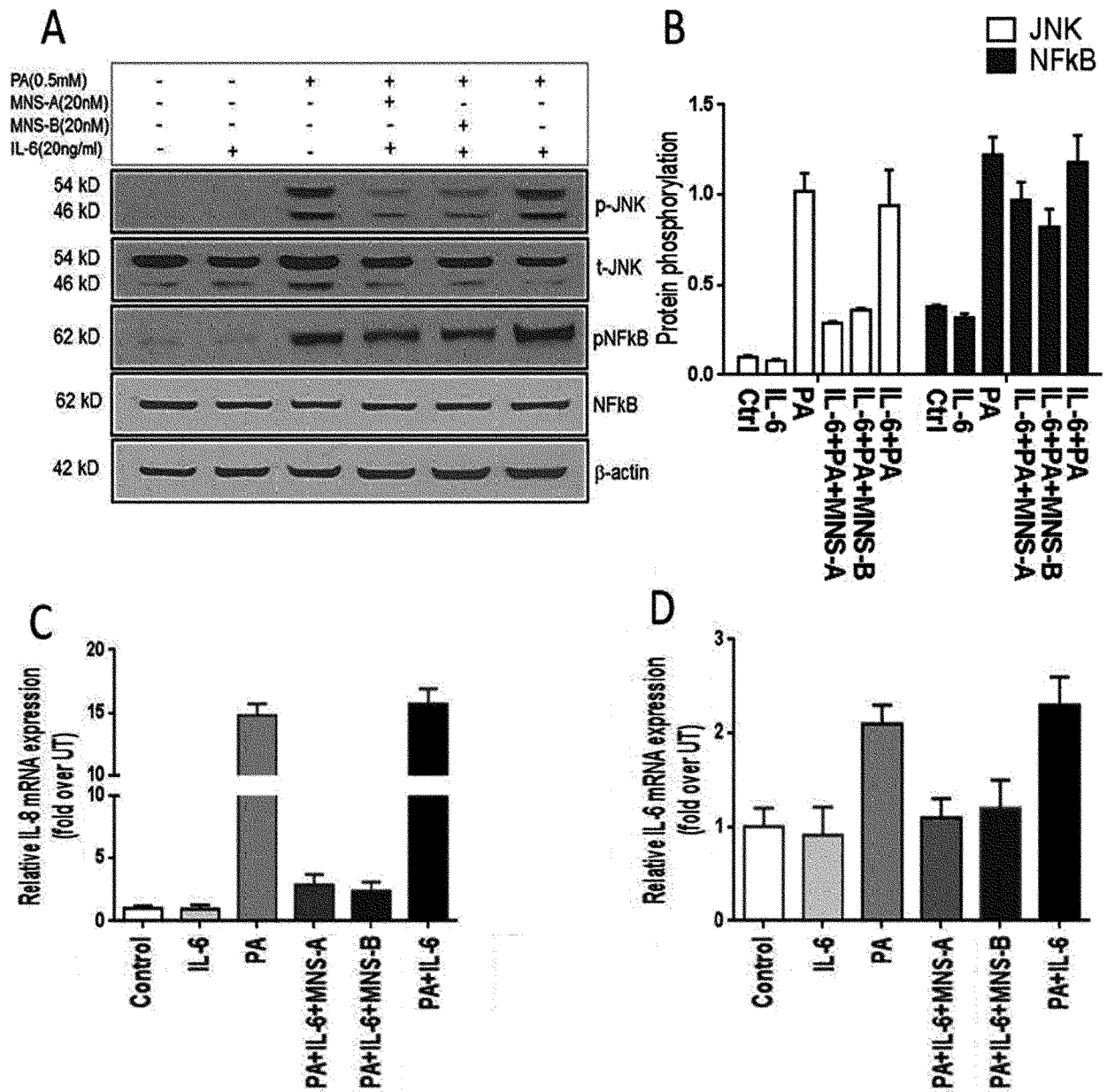
[도2]



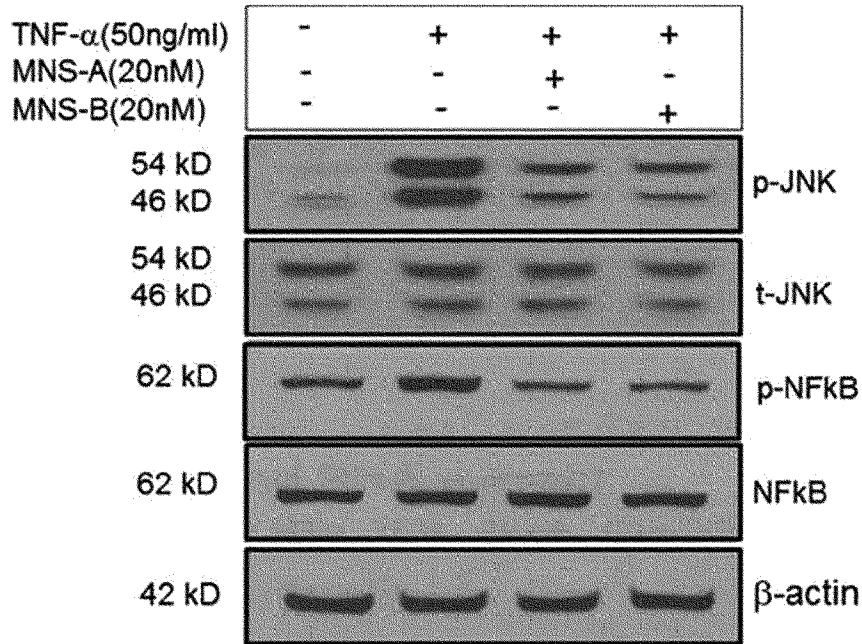
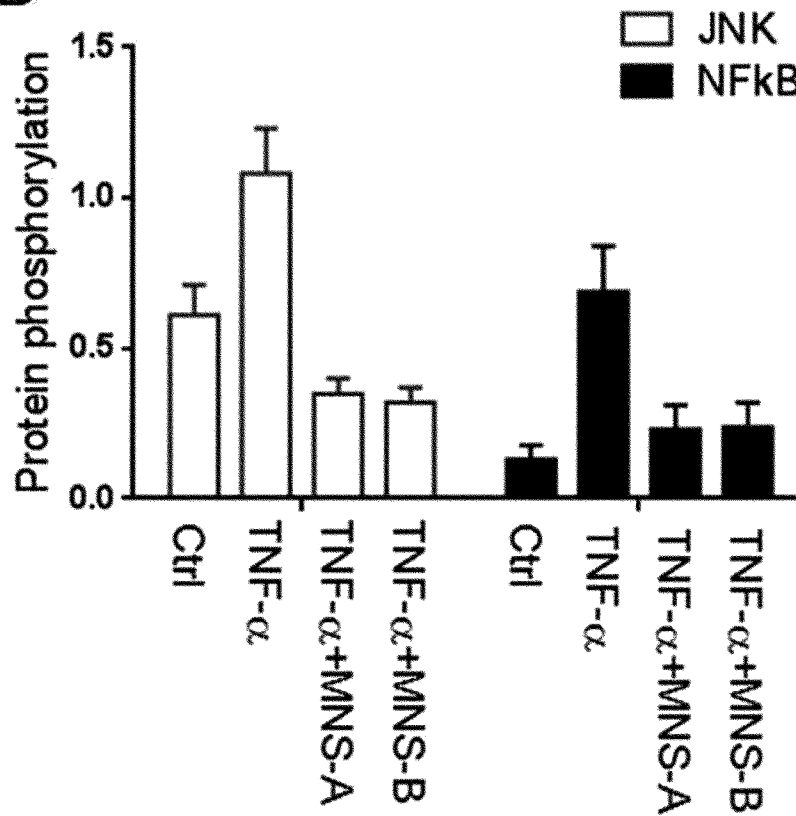
[도3]



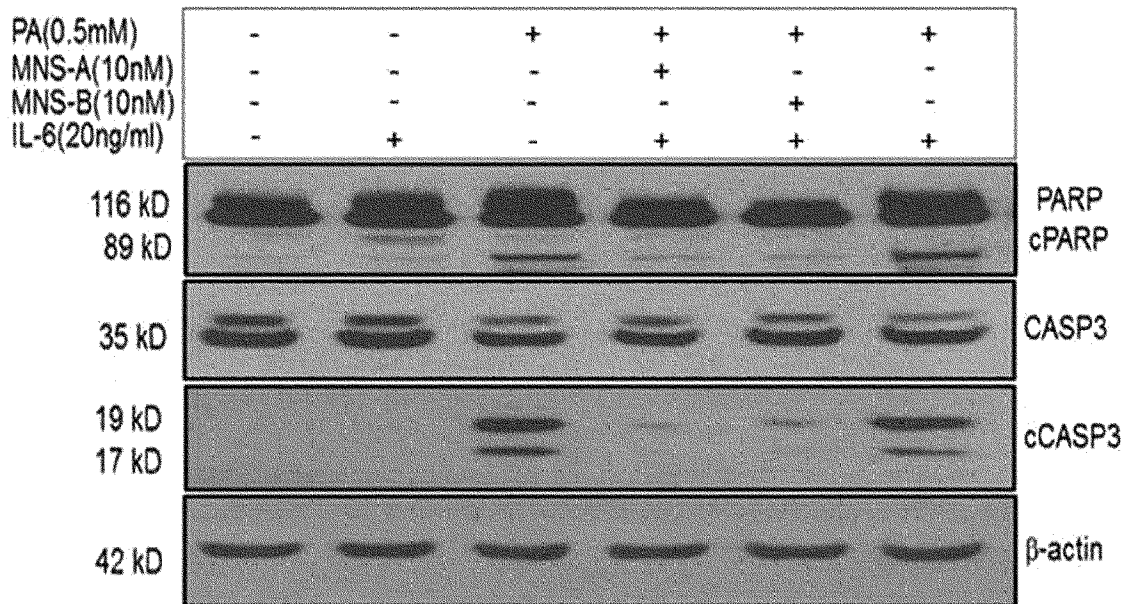
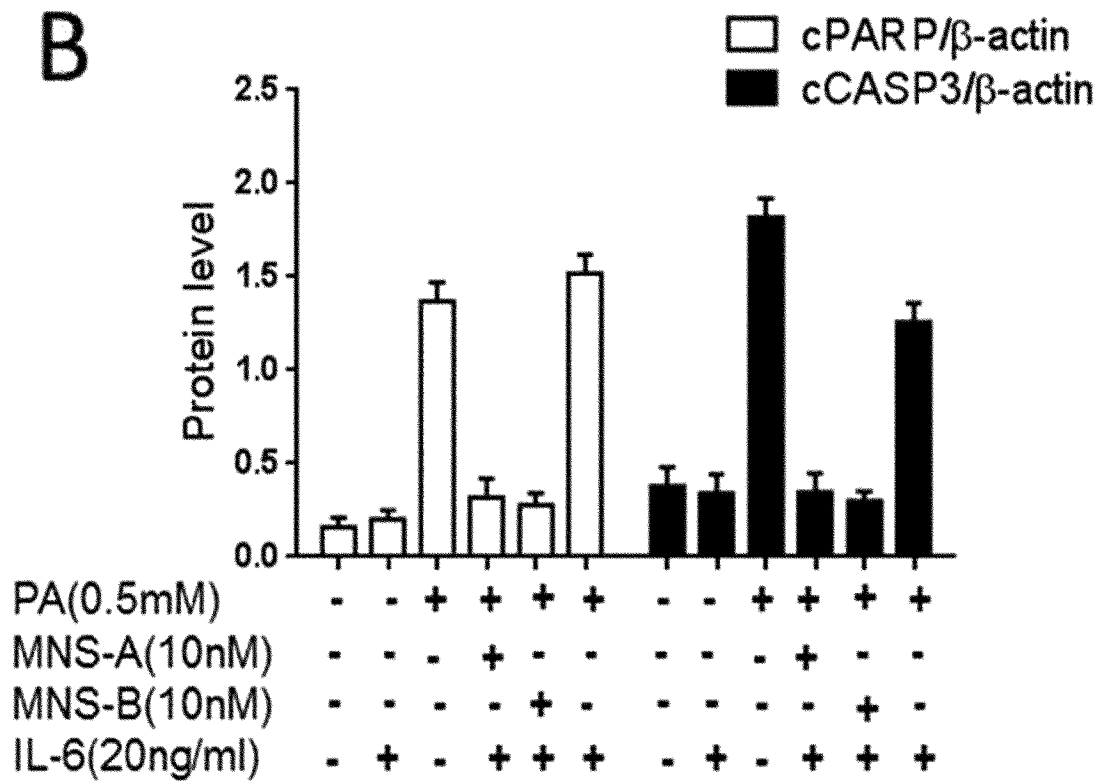
[도4]



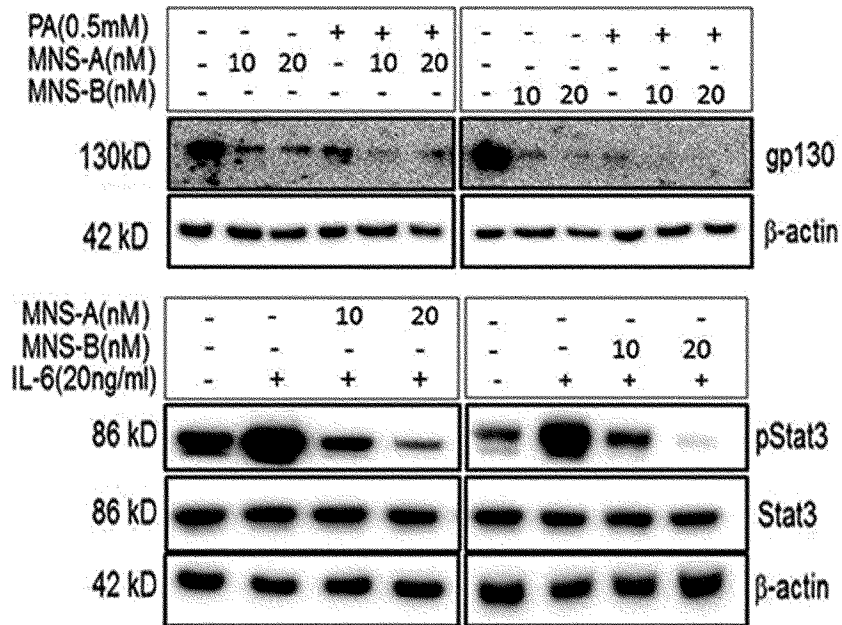
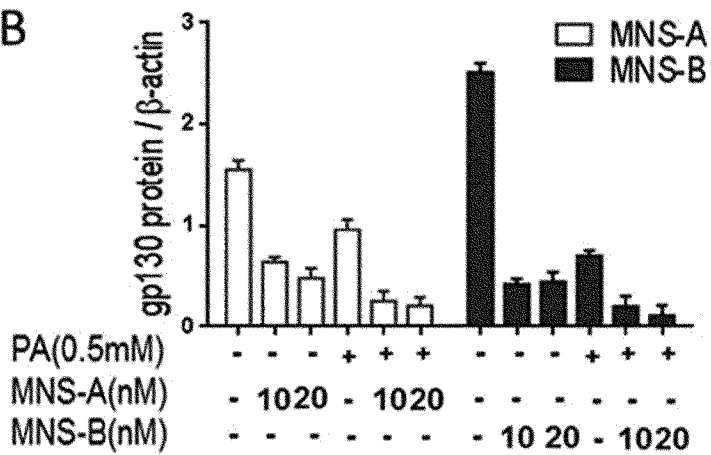
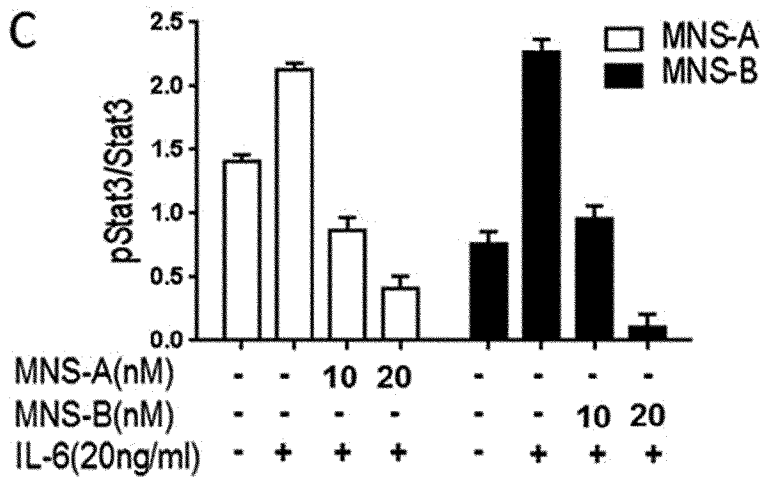
[도5]

A**B**

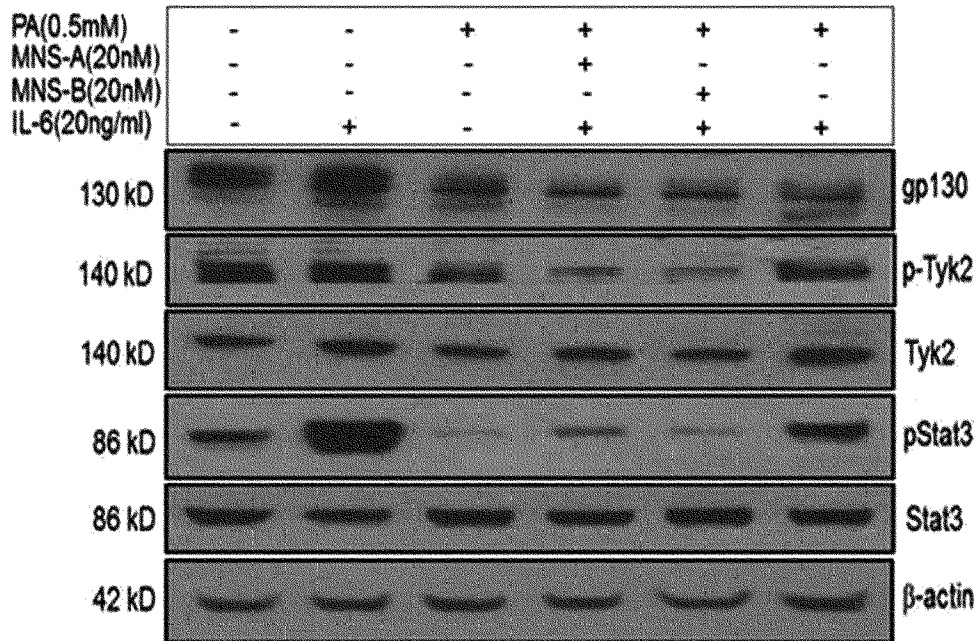
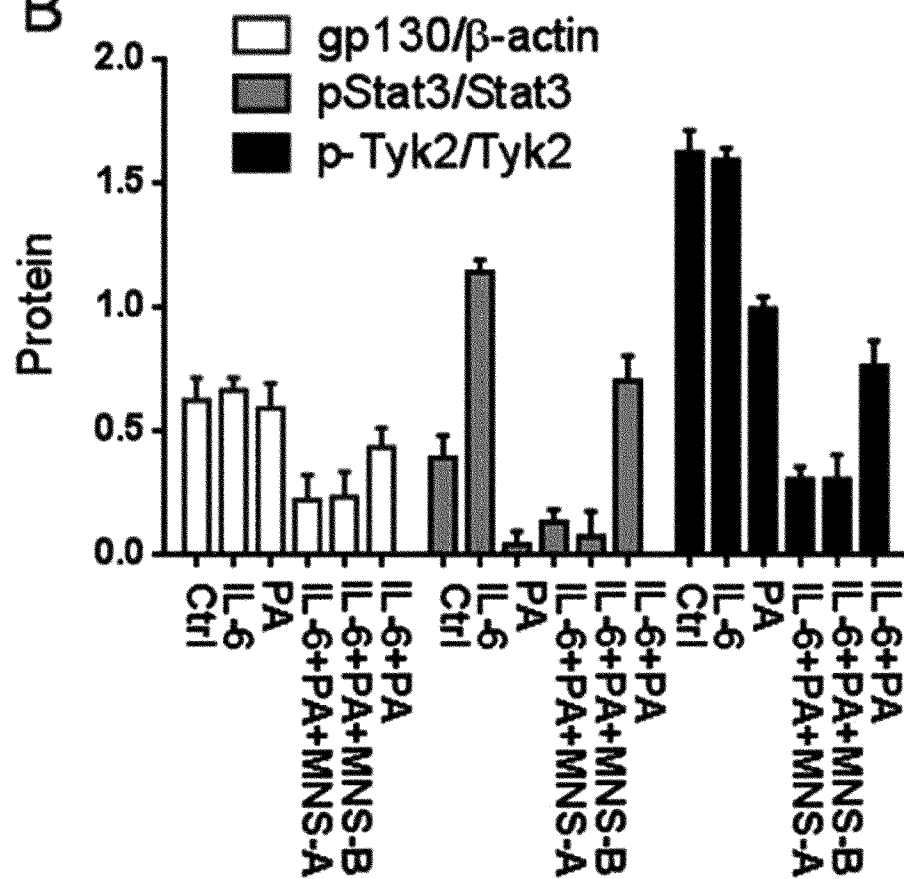
[도6]

A**B**

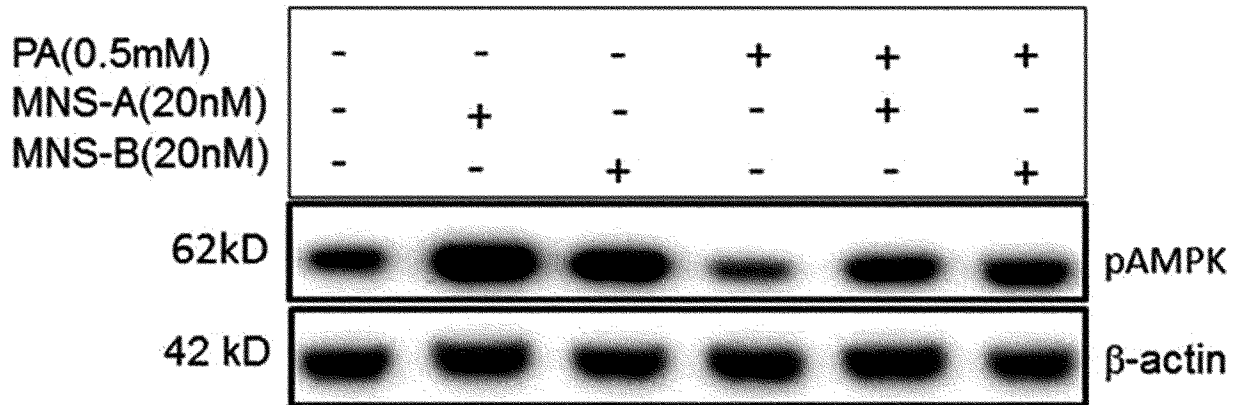
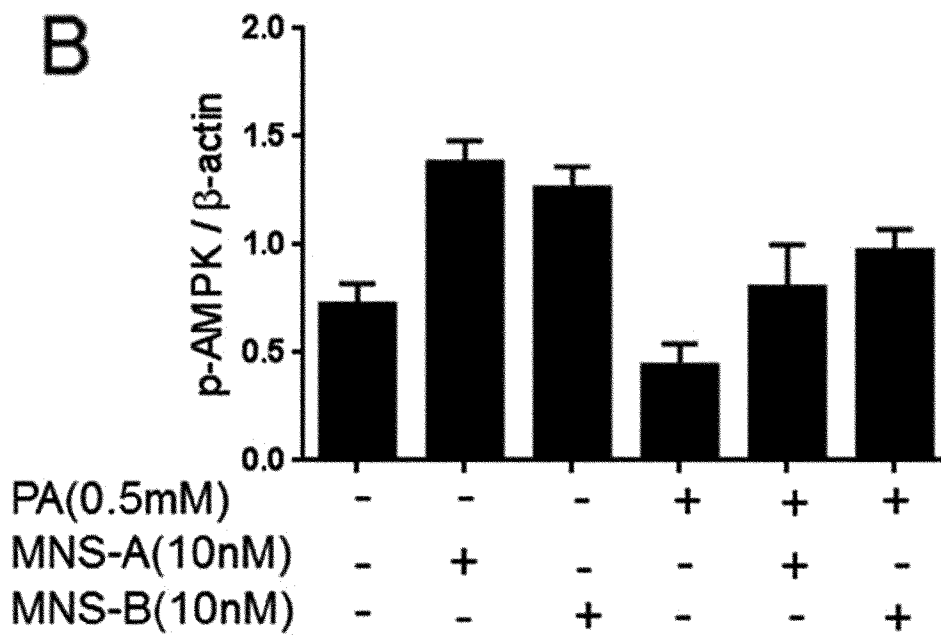
[도7]

A**B****C**

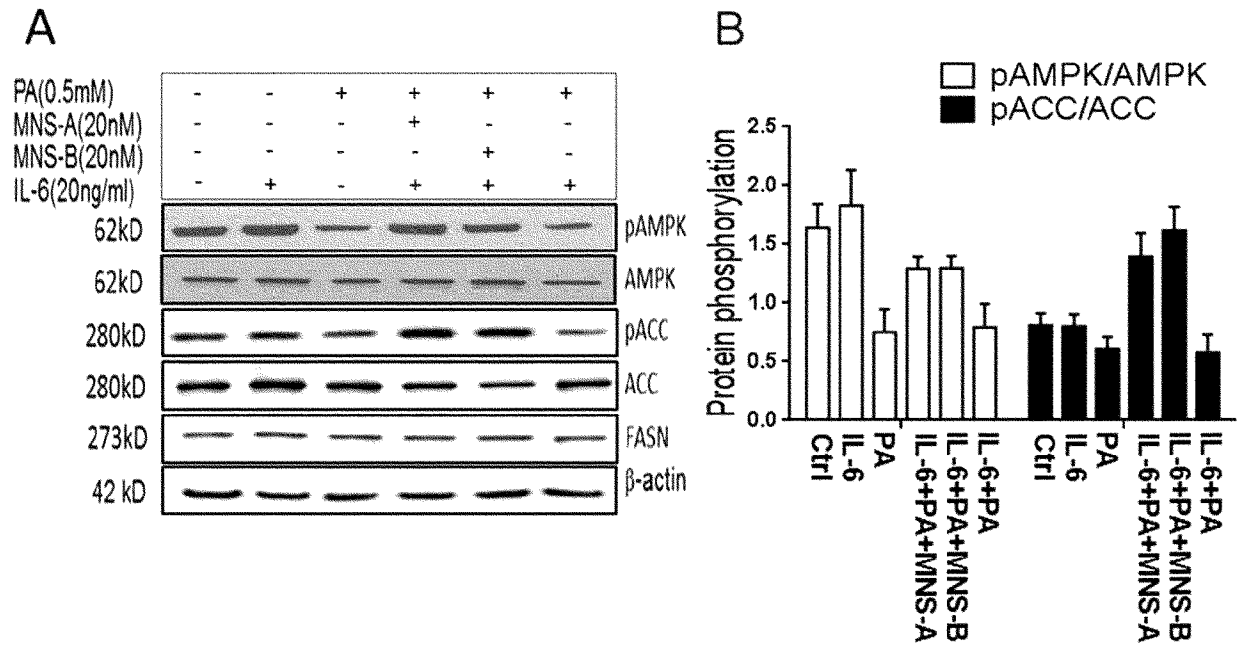
[도8]

A**B**

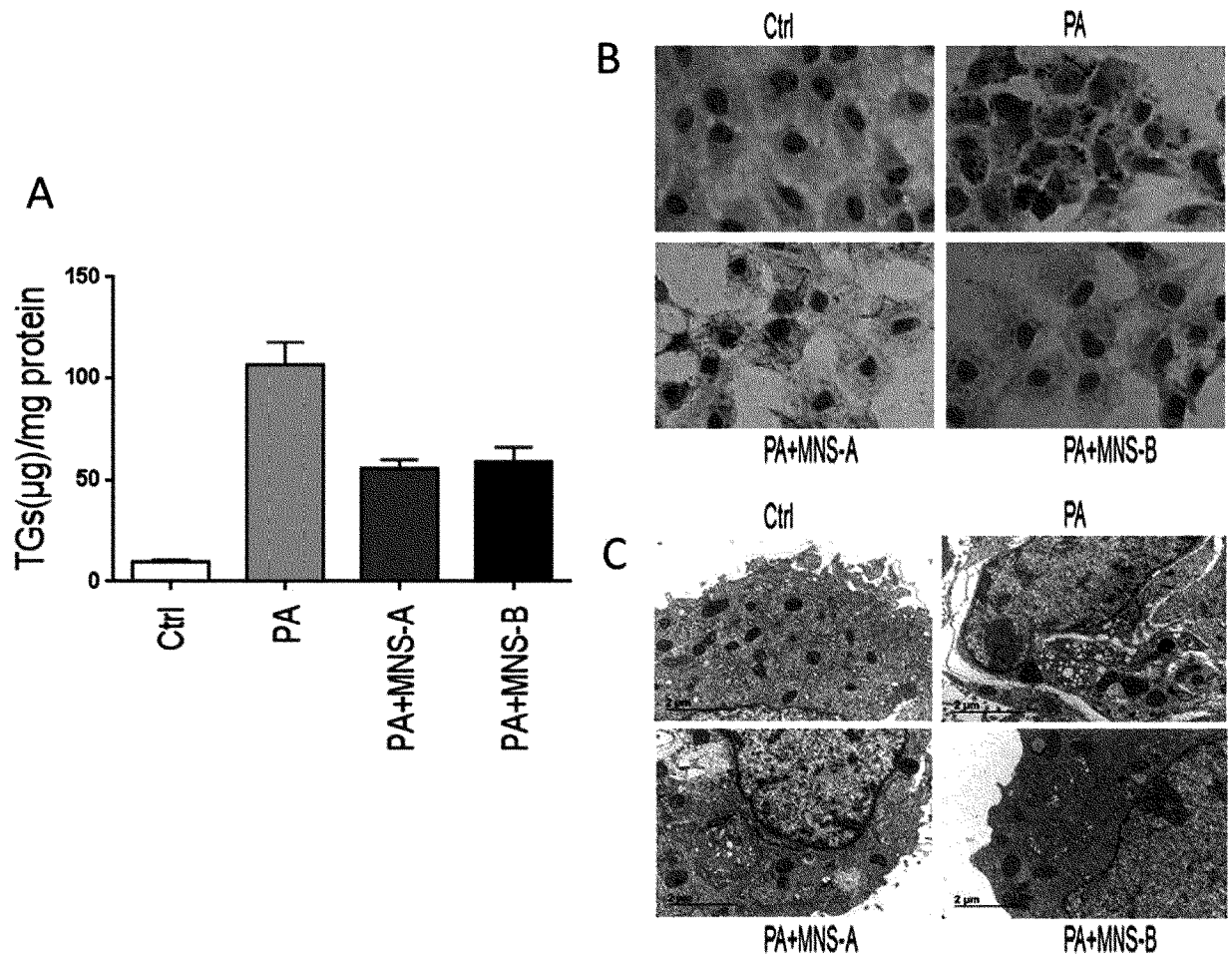
[도9]

A**B**

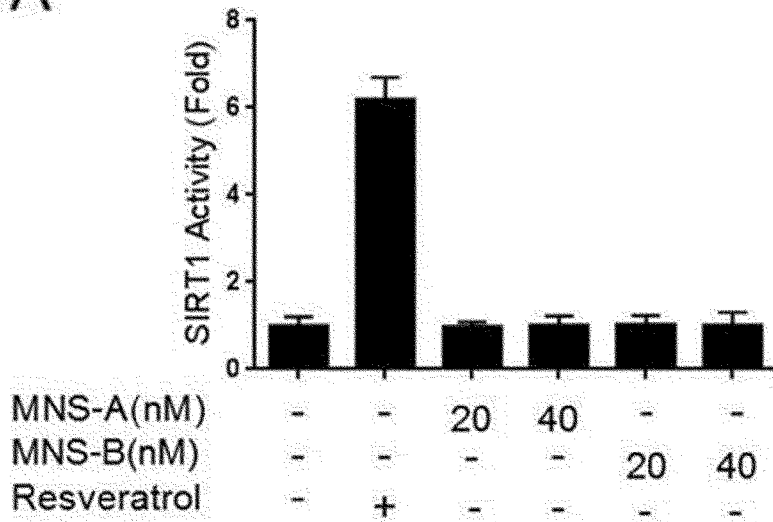
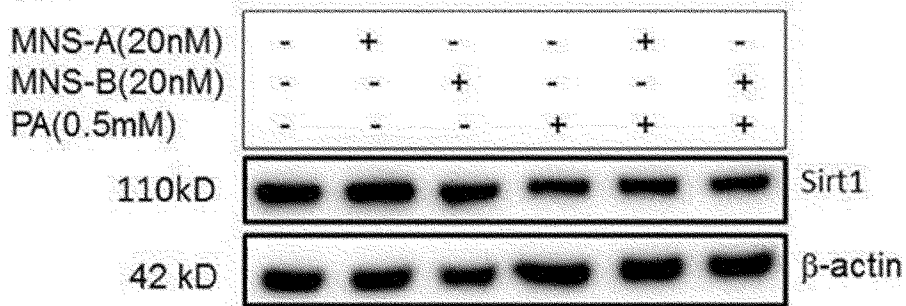
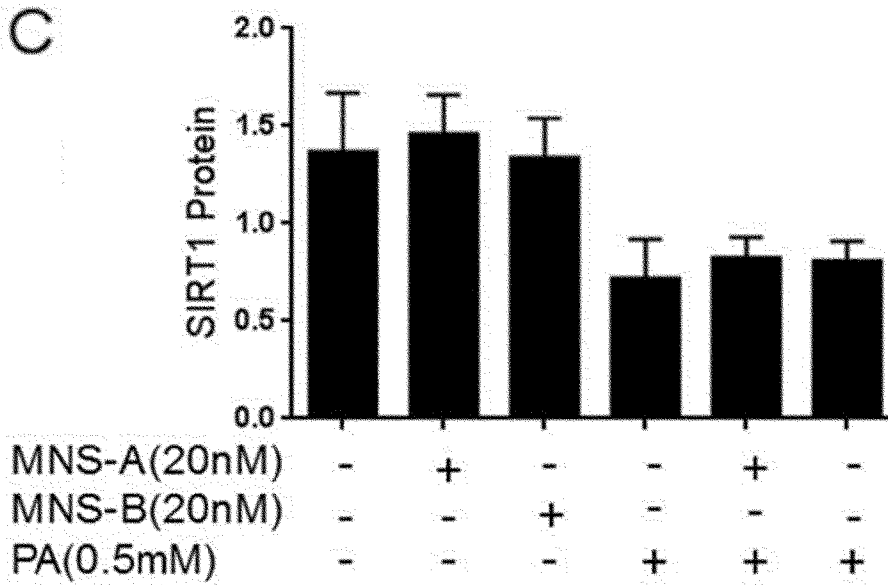
[도10]



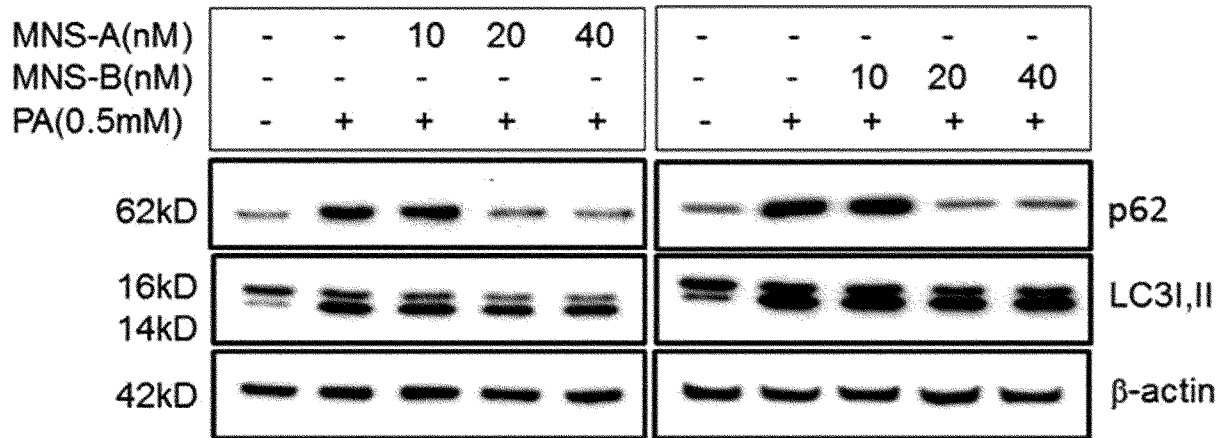
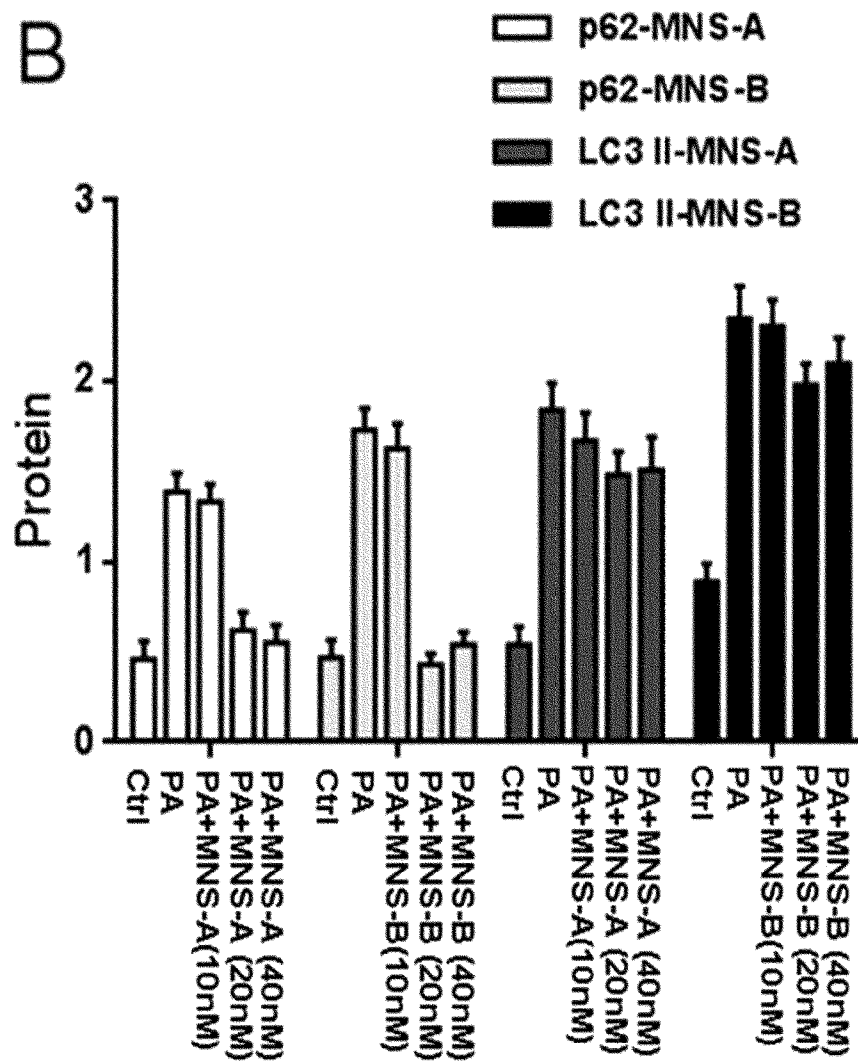
[도11]



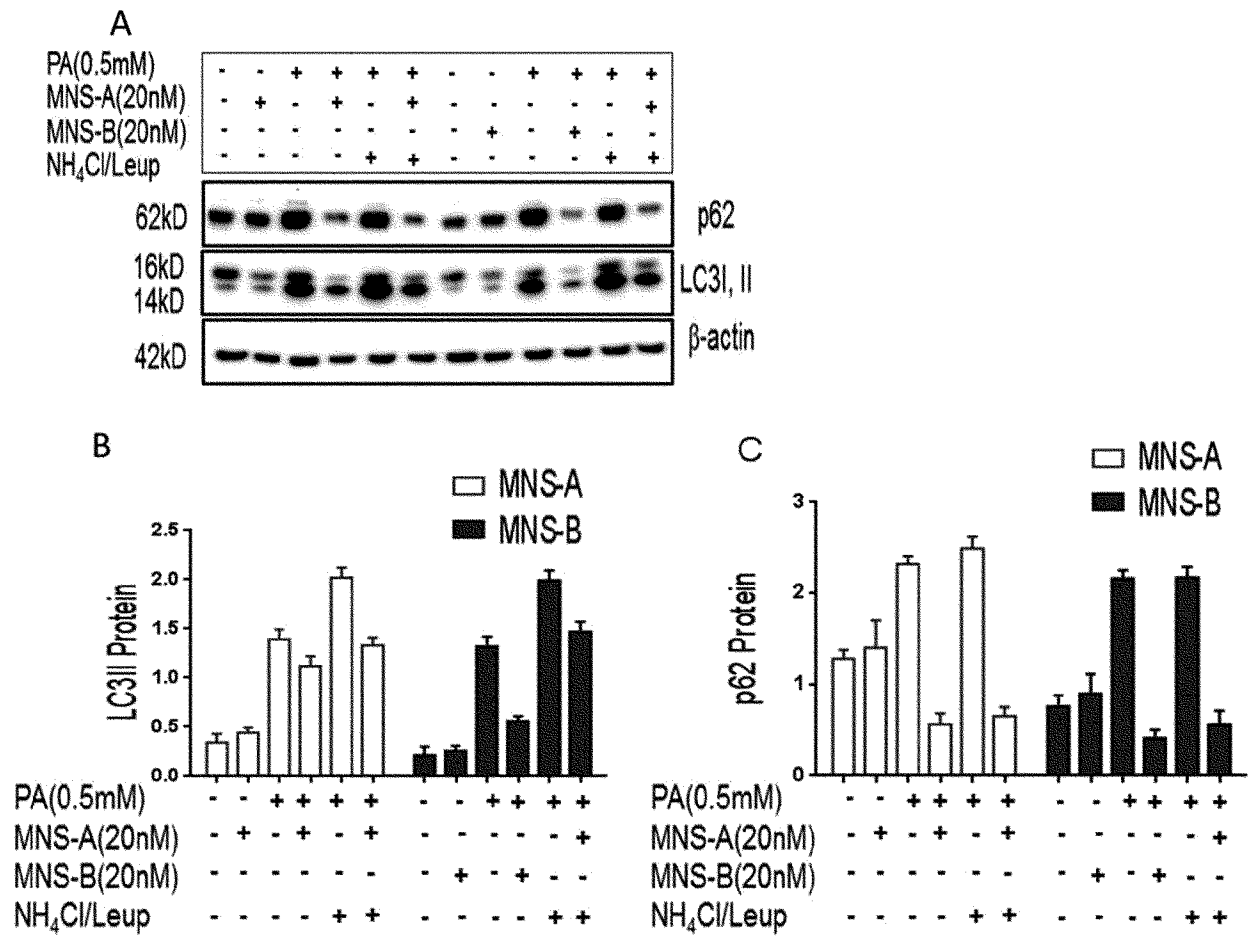
[도12]

A**B****C**

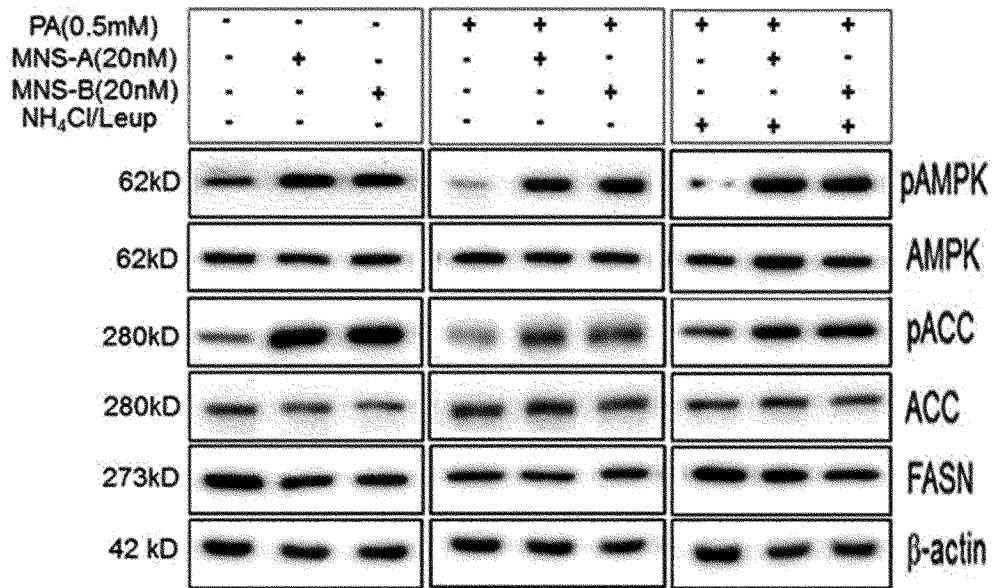
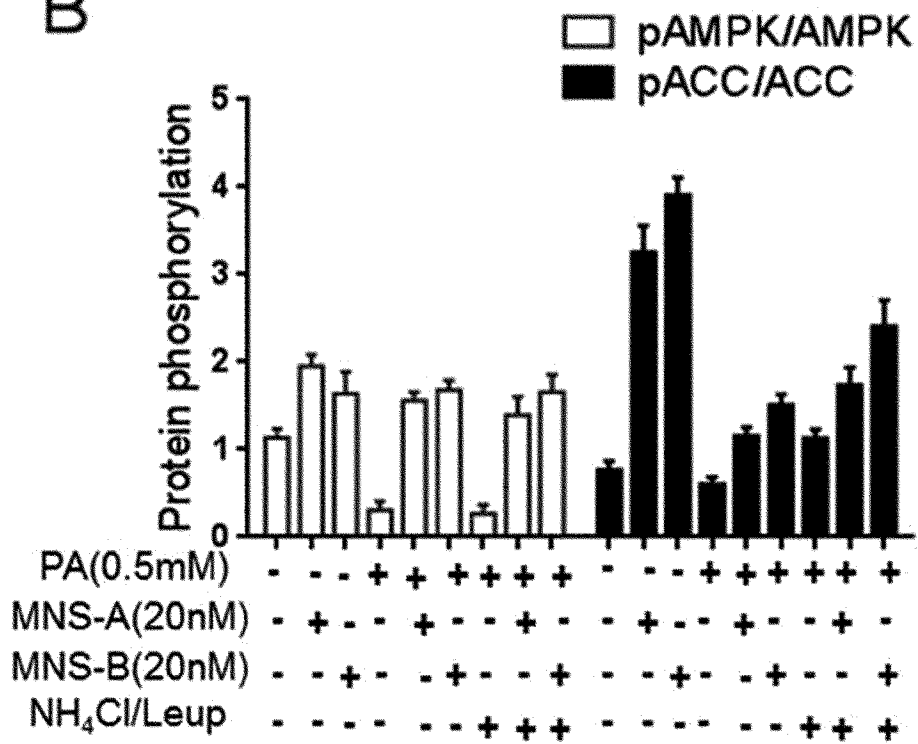
[도13]

A**B**

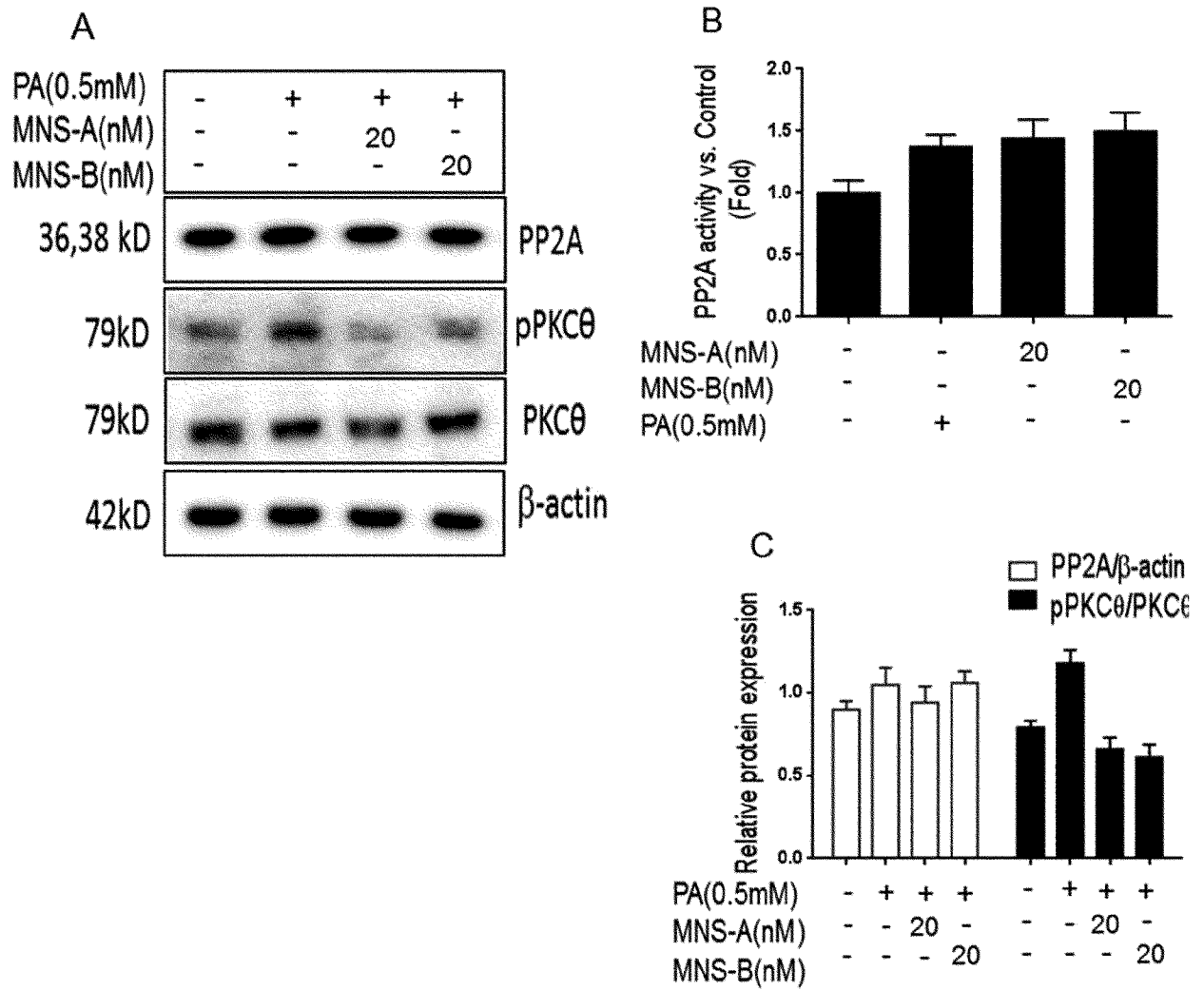
[도14]



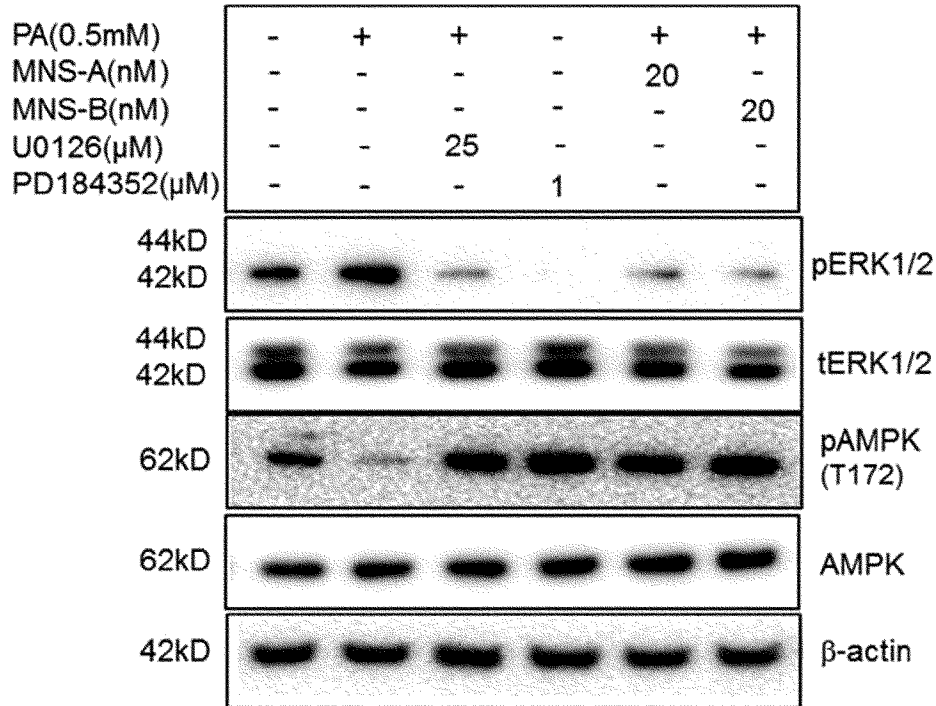
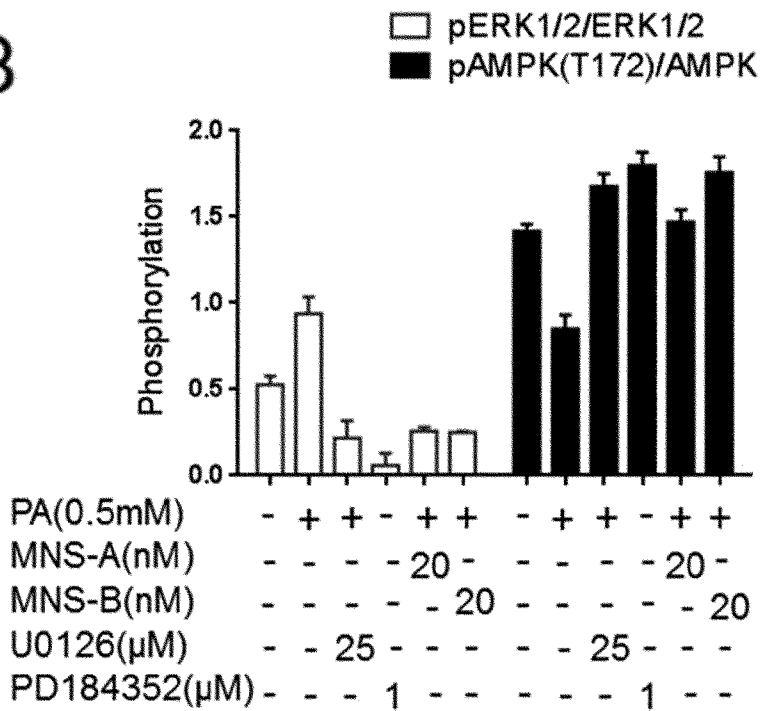
[도15]

A**B**

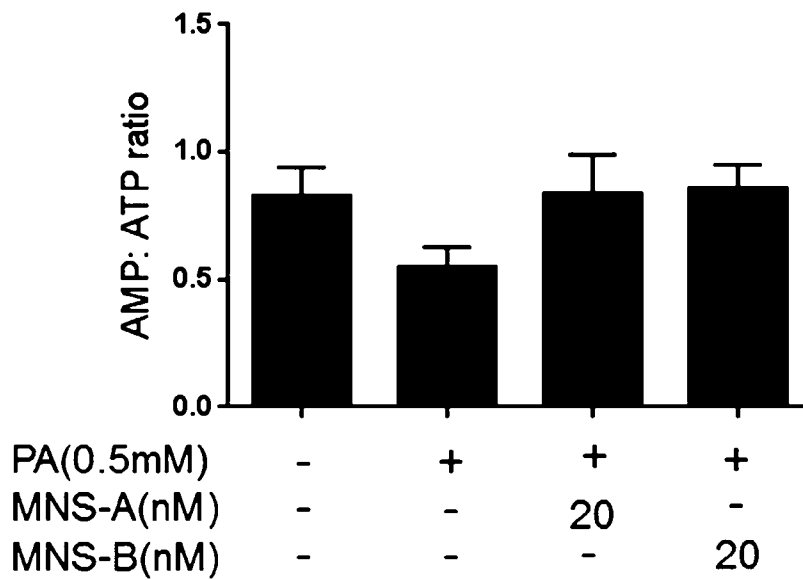
[도16]



[도17]

A**B**

[도18]



[도19]

