



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0051144
(43) 공개일자 2015년05월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/22 (2006.01) A61K 31/20 (2006.01)
A61K 31/225 (2006.01) A61P 1/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0143563

(22) 출원일자 2014년10월22일

심사청구일자 2014년10월22일

(30) 우선권주장

1020130129213 2013년10월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93

(72) 발명자

이기업

경기 양평군 양서면 중동길 313-8

고은희

서울 송파구 올림픽로 435, 229동 2203호 (신천동, 파크리오)

강정은

서울 송파구 한가람로 468, 101동 1107호 (풍납동, 신성노바빌아파트)

(74) 대리인

특허법인태백

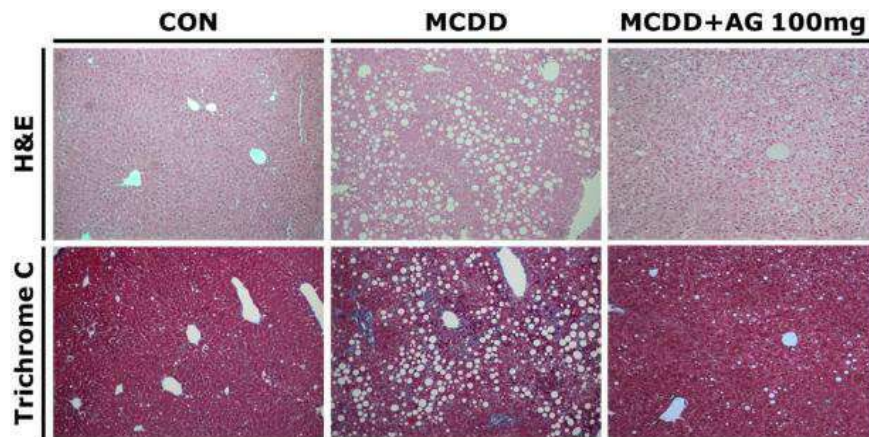
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **플라스마로젠 전구체, 플라스마로젠 또는 플라스마로젠 유사체를 유효성분으로 함유하는 간질환 예방 또는 치료용 약학조성물**

(57) 요약

본 발명은 플라스마로젠 전구체, 플라스마로젠 또는 플라스마로젠 유사체를 유효성분으로 함유하는 간질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 플라스마로젠 전구체, 또는 상기 플라스마로젠 전구체가 대사되어 생성된 플라스마로젠 또는 플라스마로젠 유사체는 간의 중성지방 축적을 감소시키고 염증성 사이토카인 유전자 발현을 억제하며 피옥시좀의 지방산 산화능 증가를 통하여 지방간, 간염 및 간경화 등과 같은 간질환을 예방하거나 치료할 수 있다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 M10642140004-06N4214-00410

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오의료기술개발사업

연구과제명 당뇨병 노화합병증의 제어기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

플라스마로젠 전구체, 플라스마로젠 및 플라스마로젠 유사체로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상을 유효성분으로 함유하는 간질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 플라스마로젠 전구체는 글리세롤 백본(backbone)에 C16 내지 C18 지방족 알콜(fatty alcohol)이 에테르(ether) 결합을 통해 연결된 알콕시 글리세롤(alkoxy glycerol)인 것을 특징으로 하는 간질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 알콕시 글리세롤(alkoxy glycerol)은 베틸알콜(Baty1 Alcohol), 키밀알콜(Chimyl Alcohol), 세라킬알콜(Selachyl Alcohol) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 간질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 알콕시 글리세롤은 상어간유인 것을 특징으로 하는 간질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 플라스마로젠 전구체, 플라스마로젠 또는 플라스마로젠 유사체는 중성지방의 축적을 감소시키며, 염증성 사이토카인 유전자 발현을 억제하고 퍼옥시좀의 지방산 산화를 증가시키는 것을 특징으로 하는 간질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 플라스마로젠 전구체, 플라스마로젠 또는 플라스마로젠 유사체는 약학조성물 총 100 중량부에 대하여 0.01 내지 90 중량부로 함유되는 것을 특징으로 하는 간질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 간질환은 지방간, 간염 및 간경화로 이루어진 군에서 선택된 간질환인 것을 특징으로 하는 간질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 8

플라스마로젠 전구체, 플라스마로젠 및 플라스마로젠 유사체로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상을 유효성분으로 함유하는 간질환 개선 또는 예방용 건강식품 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 플라스마로젠 전구체, 플라스마로젠 또는 이의 유사체를 유효성분으로 함유하여 지방간, 간염 및 간경화와 같은 간질환의 예방 또는 치료에 제공되는 약학조성물 및 건강식품조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

간은 영양소 대사의 중심 역할을 하는 장기로 정상적인 사람의 간은 약 1,500g의 무게를 가지며 간 기능이상이 초래되면 생체의 영양소 대사에 문제를 유발하여, 포도당을 글리코젠으로 만들거나 또는 단백질을 알부민으로

전환하거나 불필요한 것을 분해하여 쓸개즙으로 전달하는 등의 간 기능의 이상이 생긴다.

- [0003] 일반적으로 간에 염증이 생기는 간염이 간질환의 대부분을 차지하며, 항상에 따라 급성 간염과 만성 간염, 원인에 따라 바이러스성 간염, 알콜성 간염, 약물성 간염 등으로 나눌 수 있다. 또한, 이런 이상으로 유발되는 간질환에는 지방간, 간염, 간경변증, 간암 등이 있다. 간질환의 진행 과정의 기전은 완전히 밝혀지지는 않았으나 일차적으로 지방간이 발생된 후 이차적인 세포 손상이 수반되어 지방간염 및 간경화등의 진행성 간질환으로 발전하는 것으로 생각되며, 따라서 지방간의 발생 자체를 효과적으로 제어할 수 있다면 보다 심각한 간질환의 발생을 예방할 수 있을 것으로 생각된다. 간질환의 치료에는 운동이나 금주, 식이요법 등과 약물 치료를 병행하여 치료하고 있지만, 현재까지 확립된 치료방법이 없으며 근본적으로 완전한 치유가 어렵다.
- [0004] 시중에 처방되는 간장약은 대개 동물 또는 임상 실험에서 급성 간손상에 대한 예방 및 치료 효과를 보이는 것으로 실리마린(레갈론), UDCA(우르사), PMC(니셀)등이 그러한 약들이나 아직까지 확실한 치료효과를 보이는 약은 없는 실정이다.
- [0005] 최근 미토콘드리아 뿐만 아니라 세포소기관인 퍼옥시좀(peroxisome)이 지방산의 산화에 중요한 역할을 담당한다는 것이 알려졌으며 퍼옥시좀 기능 이상은 지방간을 유발할 수 있다고 보고되어졌다. 또한 퍼옥시좀은 반응성 산소종을 분해하며 담즙산 및 플라스마로젠(plasmalogen)이라는 물질의 합성에도 필수적이다.
- [0006] 한편, 플라스마로젠은 비닐 에테르 결합을 포함하는 특수한 인지질의 한 종류로 세포막의 주요 구성성분임과 동시에 신호전달 물질로 작용하며 항산화 효과를 보이는 등 세포 기능 유지에 중요한 역할을 하는 물질로 알려져 있다.
- [0007] 한국공개특허 제 10-2011-7015617호에서는 플라스마로젠 화합물을 함유하는 약제조성물이 퇴행성 신경질환, 인식장애, 골다공증, 조울증 및 혈관 질병과 같은 증가된 막 콜레스테롤과 관련된 노화 질병의 치료 또는 예방하는 기술을 개시하고 있으나 본 발명과 같은 플라스마로젠의 간질환 치료 또는 예방에 대해서는 언급하고 있지 않다.
- [0008] 이에 본 발명자는 플라스마로젠 전구체, 플라스마로젠 또는 플라스마로젠 유사체가 간의 지방축적과 염증성 유전자의 발현을 억제하는 효과가 있는 것을 발견하여 플라스마로젠 전구체, 플라스마로젠 또는 이의 유사체가 함유된 간질환 예방 또는 치료용 약학조성물 및 건강식품조성물을 제공하고자 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 플라스마로젠 전구체, 플라스마로젠 및 플라스마로젠 유사체를 함유하는 조성물로서, 간의 지방 축적 감소와 간 조직에서 염증을 일으키는 유전자의 발현을 억제함으로써 간질환을 예방 또는 치료하는 약학조성물 및 건강식품조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 플라스마로젠 전구체, 플라스마로젠 및 플라스마로젠 유사체로 이루어진 군에서 하나 또는 둘 이상을 유효성분으로 함유하는 간질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.
- [0011] 상기 플라스마로젠 전구체는 글리세롤 백본(backbone)에 C16 내지 C18 지방족 알콜(fatty alcohol)이 에테르(ether) 결합을 통해 연결된 알콕시 글리세롤(alkoxy glycerol)일 수 있다. 특히, 상기 알콕시 글리세롤은 베틸알콜(Batyl Alcohol), 키밀알콜(Chimyl Alcohol), 세라킬알콜(Selachyl Alcohol) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0012] 보다 바람직하게는, 상기 알콕시 글리세롤은 상어간유일 수 있으며, 상어간유는 베틸알콜(Batyl Alcohol), 키밀알콜(Chimyl Alcohol) 및 세라킬알콜(Selachyl Alcohol)로 이루어진 알콕시 글리세롤 외 스칼렌(squalene)도 포함한다.
- [0013] 상기 플라스마로젠 전구체, 플라스마로젠 또는 플라스마로젠 유사체는 중성지방의 축적을 감소시키며, 염증성 사이토카인 유전자 발현을 억제하고 퍼옥시좀의 지방산 산화를 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0014] 또한 상기 간질환은 지방간, 간염 및 간경화로 이루어진 간질환 군에서 선택되어 질 수 있다.
- [0015] 상기 플라스마로젠 전구체, 플라스마로젠 또는 플라스마로젠 유사체는 약학조성물 총 100 중량부에 대하여 0.01

내지 90 중량부를 포함할 수 있다.

- [0016] 다른 구체예로 플라스마로젠 전구체, 플라스마로젠 및 플라스마로젠 유사체로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상을 유효성분으로 함유하는 간질환 개선 또는 예방용 건강식품조성물로 제공될 수 있다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명에 따르면, 플라스마로젠 전구체 또는 상기 플라스마로젠 전구체가 대사되어 생성된 플라스마로젠 또는 플라스마로젠 유사체는 간 조직 내 중성지방의 축적을 감소시키고 염증성 사이토카인 유전자의 발현을 억제하며 퍼옥시좀에 의한 지방산 산화능을 증가시킴으로써 지방간, 간염 및 간경화와 같은 간질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 비알콜성 지방간염 발생모델인 MCDD(methionine-choline deficient diet)처리 실험쥐 군과 MCDD 및 플라스마로젠 전구체 알콕시 글리세롤 100 mg/kg/day를 함께 섭취한 실험쥐 군의 혈장의 알라닌 아미노트랜스퍼레이즈(ALT) 수치 변화를 나타낸 그래프이다. $P^{***} < 0.001$ vs 대조군(CON); $P\# < 0.05$ vs MCDD.

도 2는 MCDD 처리 실험쥐 군과 MCDD 및 플라스마로젠 전구체 알콕시 글리세롤 100 mg/kg/day를 함께 섭취한 실험쥐 군의 간 내 중성지방 양의 변화를 나타낸 그래프이다. $P^* < 0.05$ vs 대조군; $P\# < 0.05$ vs MCDD.

도 3은 MCDD 처리 실험쥐 군과 MCDD 및 플라스마로젠 전구체 알콕시 글리세롤 100 mg/kg/day를 함께 섭취한 실험쥐 군의 염증성 사이토카인의 유전자 발현 변화를 나타낸 그래프이다. $P^* < 0.05$ vs 대조군; $P\# < 0.05$ vs MCDD.

도 4는 MCDD 처리 실험쥐 군과 MCDD 및 플라스마로젠 전구체 알콕시 글리세롤 100 mg/kg/day를 함께 섭취한 실험쥐 군의 간 조직학적 변화를 나타낸 결과이다.

도 5는 MCDD 처리 실험쥐 군과 MCDD 및 플라스마로젠 전구체 알콕시 글리세롤 100 mg/kg/day를 함께 섭취한 실험쥐 군의 간 조직 지방산 산화능의 변화를 나타낸 결과로 왼쪽은 미토콘드리아 지방산 산화를 오른쪽은 퍼옥시좀 지방산 산화를 나타내는 그래프이다. $P^* < 0.05$ vs 대조군; $P\# < 0.05$ vs MCDD.

도 6은 MCDD 처리 실험쥐 군과 MCDD 및 플라스마로젠 전구체 알콕시 글리세롤 200 mg/kg/day를 함께 섭취한 투여군(AG-200)의 간 조직학적 변화를 나타낸 결과와 간 중성지방 및 혈장 ALT 수준을 확인한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명은 플라스마로젠 전구체, 플라스마로젠 또는 플라스마로젠 유사체로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상을 유효성분으로 함유하는 간질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.

- [0020] 상기 플라스마로젠 전구체는 글리세롤 백본(backbone)에 C16 내지 C18 지방족 알콜(fatty alcohol)이 에테르(ether) 결합을 통해 연결된 알콕시 글리세롤(alkoxy glycerol)일 수 있다. 특히, 상기 알콕시 글리세롤은 베틸알콜(Batyl Alcohol), 키밀알콜(Chimyl Alcohol), 세라킬알콜(Selachyl Alcohol) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0021] 보다 바람직하게는, 상기 알콕시 글리세롤은 상어간유일 수 있으며, 상어간유는 베틸알콜(Batyl Alcohol), 키밀알콜(Chimyl Alcohol) 및 세라킬알콜(Selachyl Alcohol)로 이루어진 알콕시 글리세롤 외 스칼렌(squalene)도 포함한다.

- [0022] 일실시예로써 상기 플라스마로젠 또는 플라스마로젠 유사체는 전구체인 알킬 글리세롤 형태로 경구투여되어 플라스마로젠 또는 플라스마로젠 유사체 형태로 변화될 수 있다.

- [0023] 상기 플라스마로젠 전구체, 플라스마로젠 또는 플라스마로젠 또는 이의 유사체는 중성지방의 축적을 감소시키며, 염증성 사이토카인 유전자 발현을 억제하고 퍼옥시좀의 지방산 산화를 증가시킬 수 있다.

- [0024] 상기 간질환은 지방간, 간염 및 간경화로 이루어진 간질환 군에서 선택될 수 있다.

- [0025] 보다 상세하게는, 지방간 유발 식이만 투여한 실험군(methionine-choline deficient diet; MCDD)과, 지방간 유발 식이에 플라스마로젠 전구체인 알콕시 글리세롤을 함께 투여한 실험군의 혈장에서 간세포의 염증 및 손상 정도를 확인하는 알라닌 아미노트랜스퍼레이즈(ALT)를 각각 측정해 본 결과, 도 1과 같이 플라스마로젠 전구체인

알록시 글리세롤을 함께 투여한 실험군에서 MCDD와 비교하여 유의성 있는 호전을 보였으며, 간 조직의 실시간 유전자 증폭 결과, 도 3과 같이 염증성 사이토카인 유전자 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이로부터 플라σμα로젠 또는 이의 유사체는 간염 및 간경화를 예방 또는 치료에 좋은 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0026] 또한, 간 내 중성지방을 트리글리세리드 측정을 통하여 확인한 결과, 도 2와 같이 지방간 유발 식이에 플라σμα로젠 전구체인 알록시 글리세롤을 함께 투여한 실험군이 정상식이 대조군과 유사한 결과를 보였고, 도 4와 같이 간 조직 염색결과에서도 대조군과 유사한 수준으로 호전된 것을 확인하였다. 이로부터 플라σμα로젠 또는 이의 유사체는 지방간의 예방 또는 치료에도 탁월한 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0027] 상기 플라σμα로젠 전구체, 플라σμα로젠 또는 플라σμα로젠 유사체는 약학조성물 총 100 중량부에 대하여 0.01 내지 90 중량부를 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 플라σμα로젠 또는 이의 유사체를 유효성분으로 함유하는 간질환 예방 또는 치료용 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.

[0029] 본 발명의 다른 구체예에서, 플라σμα로젠 전구체, 플라σμα로젠 또는 플라σμα로젠 유사체를 유효성분으로 함유하는 간질환 예방 또는 치료용 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 율활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 율활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0030] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 율활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 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, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0031] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0032] 상기 플라σμα로젠 전구체, 플라σμα로젠 또는 플라σμα로젠 유사체의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 다른 구체예로 플라σμα로젠 전구체, 플라σμα로젠 및 플라σμα로젠 유사체 중 하나 또는 둘 이상을 유효성분으로 함유하는 간질환 개선 또는 예방용 건강식품조성물로 제공될 수 있다.

[0035] 상기 건강식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강식품은 유효성분인 본 발명에 따른 플라σμα로젠 전구체, 플라σμα로젠 또는 플라σμα로젠 유사체 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0036] 상기 건강식품에 함유된 플라σμα로젠 전구체, 플라σμα로젠 또는 플라σμα로젠 유사체의 유효용량은 상기 약학

조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0037] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[0038] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0039] 하기의 참조예는 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 참조예를 제공하기 위한 것이다.

[0040] <참조예>

[0041] 1. 실험동물 및 시약

[0042] 지방간염 유발을 위한 MCD 사료는 Dyets (Bethlehem, PA, USA)에서 구입하였다. 플라스마로젠 전구체인 알콕시 글리세롤(베타 알콜)은 Sigma 사 (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[0043] DMEM:F12 배지에 2% BSA를 만들어 에탄올에 녹인 플라스마로젠 전구체 알콕시 글리세롤을 첨가하여 70℃에서 20분의 인큐베이션 후 결정이 없어진 것을 확인하는 방법으로 접합시켰다. 7주령의 C57/BL6 수컷 생쥐를 실험 동물실 반입 후 7일 동안 안정화시켜 대조군인 일반 사료군과 MCD 식이군 (MCDD군), MCD 식이와 플라스마로젠 전구체 알콕시 글리세롤 100 mg/kg/day (AG군)의 혼합물을 섭취한 군으로 분류하여 각 군당 6 마리의 생쥐를 분배하였다. 총 6주간 실험 사료를 섭취한 후 12 시간 동안 물만 섭취하게 한 다음 혈액 샘플을 채취하고 실험 쥐를 희생하여 간 조직을 적출하였다. 적출된 간 조직은 즉시 드라이 아이스에 급속 냉동시켜 -70℃ 냉동고에 혈장과 함께 보관하였다.

[0044] <실시예 1> 혈액샘플 측정

[0045] 혈액샘플은 실험동물의 대정맥에서 수집한 후 원심분리기 (300 rpm, 15 분)를 이용해 혈장을 분리하여 Labs Biotechnology (London, Canada)의 키트(kit)를 이용하여 알라닌 아미노트랜스퍼레이즈 (ALT)측정하였다. ALT는 간세포의 염증 및 손상 정도를 민감하게 반영하는 표지자로 지방간뿐만 아니라 간염이나 간경화 등 다양한 간 질환의 상태 파악에 널리 사용되고 있다. 각 실험군 별 혈장 ALT의 변화는 도 1과 같이 MCD 식이와 플라스마로젠 전구체 알콕시 글리세롤 100 mg/kg/day를 함께 투여한 AG군이 MCDD 군에 비해 유의한 호전을 보였다.

[0046] <실시예 2> 간 조직 내 중성지방 측정

[0047] 간 조직 내 중성지방의 측정은 트리글리세리드 (GPO-Trinder) 키트(kit)를 Sigma사에서 구입하여 측정하였다. 마쇄한 간 조직 및 혈장을 상온에서 추출 버퍼와 4시간 반응시킨 후 1N H₂SO₄를 첨가하여 1000 rpm 에서 10분간 원심분리 하였고 상층액을 제거한 후 남은 용액에 Na₂S₂O₂ 100 mg 을 첨가하여 다시 1000 rpm 에서 5분간 원심분리 하였다. 이후 상층액을 얻어 규산(silicic acid) 0.5 g을 첨가하고 상온에서 5분간 반응시킨 후 1000 rpm 에서 10분간 원심분리 하였고 상층액을 N₂ 가스로 증발시켜 얻은 시료를 아이소프로판올로 녹였다. 이후 트리글리세라이드 시약 A를 첨가하여 5분간 상온에서 반응시킨 후 Emax precision micro plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 540 nm 에서 측정하였다. 각 실험군 별 간 조직의 중성지방 함량 변화는 도 2와 같으며 혈장 ALT와 마찬가지로 MCD 식이와 플라스마로젠 전구체 알콕시 글리세롤 100 mg/kg/day를 함께 투여한 AG군에서 호전되는 결과를 확인할 수 있었다.

[0048] <실시예 3> 간 조직의 염증변화

[0049] 간 조직의 염증 정도의 변화를 확인하기 위해 대표적인 염증성 사이토카인인 종양괴사인자 (TNF- α)와 대식세포주화성 단백질-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)의 유전자 발현을 실시간 유전자 증폭(real-time PCR)법으로 확인하였다. 그 결과 도 3을 참고하면 혈장 ALT 및 간 내 중성지방 함량과 마찬가지로 플라스마로젠 전구체 알콕시 글리세롤 100 mg/kg/day의 투여가 MCD 식이에 의해 증가된 염증성 사이토카인 유전자 발현을 억제하는 것을 확인하였다.

[0050] <실시예 4> 조직학적 관찰

[0051] 적출된 간 조직의 일부는 10% 중성 포르말린 용액으로 고정한 다음 파라핀에 포매하였고 흐르는 물에서 12시간 이상 포르말데히드를 세척한 후 60% 에탄올에서 1시간, 70% 에탄올에서 1시간, 80% 에탄올에서 1시간, 90% 에탄올에서 1시간, 5% 에탄올에서 1시간, 100% 에탄올에서 1시간씩 단계적으로 수세하였다. 이후 자일렌에 1시간씩 총 3회의 투명과정과 파라핀에 1시간씩 총 2회의 침투과정을 시행하였으며 포매과정을 거쳐 약 4 μ m 두께의 절편을 작성하였다.

[0052] 절편은 헤마톡시린- 에오신(H&E)와 트리크롬 C 염색을 시행하여 광학현미경으로 검경한 후 분석하였다.

[0053] 대조군, MCDD군 및 AG군 간 조직의 대표적 H&E, 트리크롬 C 염색 사진은 도 4와 같으며, MCD 식이에 의한 지방간염이 플라스마로젠 전구체 알킬 글리세롤 100 mg/kg/day 투여로 대조군과 유사한 수준으로 호전된 것을 볼 수 있다.

[0054] <실시예 5> 지방산 산화 측정

[0055] 간 조직 내 지방산 산화를 측정하기 위해 14 C-팔미테이트 (NEN Life Sciences, Boston, MA, USA)로 부터 14 CO₂가 생성되는 양을 측정하여 분석하였다.

[0056] 이를 위하여 50 μ l의 간 마쇄액에 0.2 mM 팔미테이트 ($1\text{-}^{14}\text{C}$ -palmitate at 0.5 μ Ci/ml)가 포함된 반응 버퍼를 첨가하고 30°C에서 2시간 동안 반응시켰다.

[0057] 이후 정지 버퍼인 4N 황산을 50 μ l 첨가하고 2시간 동안 반응시킨 후 14 CO₂생성량을 측정하였다. 미토콘드리아 이외에 지방산 베타 산화를 담당하는 퍼옥시좀의 지방산 산화를 알아보기 위해 미토콘드리아 억제제인 로테논 12.5 μ M과 안티마이신 100 μ M을 0.2 mM의 팔미테이트 ($1\text{-}^{14}\text{C}$ palmitate at 0.5 μ Ci/ml)와 함께 반응 버퍼에 넣고 30°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 동일하게 정지 버퍼인 4N 황산을 50 μ l 첨가하고 2시간 동안 반응시킨 후 14 CO₂생성량을 측정하였다.

[0058] 그 결과 도 5와 같은 각 실험군 별 간 조직의 퍼옥시좀 지방산 산화를 확인하였다.

[0059] <실시예 6> 고지방식이 지방간 동물모델에서 플라스마로젠 전구체 효과 확인

[0060] MCDD(methionine-choline deficient diet) 동물모델은 비알콜성 지방간염 발생을 대표하는 모델이지만 대사증후군에 동반되는 위험인자를 대변하지 못한다는 단점이 있다. 이러한 한계를 극복하기 위해 지방간(hepatic steatosis)에 대한 일반적인 동물모델로 고지방식이(HFD)를 섭취시킨 쥐의 간조직을 비교하였다.

[0061] 이 동물모델은 MCDD와 달리 염증반응 없이 단순한 지방간 질환만을 나타내었다.

[0062] 상기 동물모델에 비만 및 비알콜성 지방간을 유도하는 고지방식이에 플라스마로젠 전구체인 알콕시 글리세롤을 투여하여 그 변화를 확인하였다.

[0063] 먼저, 7주령 C57/BL6 수컷 생쥐에 대조군(CON)은 7% 지방, 18% 단백질 및 75% 탄수화물로 구성된 일반사료를 섭취시켰으며, 실험군(HFD)은 60% 지방, 18% 단백질, 22% 탄수화물로 구성된 고지방식이(HFD)를 섭취 제한없이 섭취시켰다.

[0064] 또한, 알콕시 글리세롤 투여군(AG-200)은 고지방식이에 알콕시 글리세롤 200 mg/kg/day를 혼합하여 섭취시켰다.

총 12주간 각각의 실험군에 해당 사료를 섭취시킨 후 상기 실시예 4와 같은 방법으로 간 조직학적 변화를 확인하였으며, 실시예 1과 같은 방법으로 혈장 ALT 수준을 확인하였다.

[0065] 그 결과, 도 6과 같이 고지방식이(HFD)와 알코시 글리세롤을 함께 투여한 투여군(AG-200)의 간 조직에서 지방간 발생 및 지질 함유량이 확연히 호전된 것을 확인하였으며, 간 손상 마커인 혈장 ALT 또한 의미있게 감소한 것을 확인하였다.

[0066] 이하, 본 발명의 약학조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0067] <제제예 1> 주사제의 제조

[0068] 플라스마로젠 10 mg, 소듐 메타비설파이트 3.0 mg, 메틸파라벤 0.8 mg, 프로필파라벤 0.1 mg 및 주사용 멸균 증류수 적량을 혼합하고 통상의 방법으로 최종 부피가 2 ml이 되도록 제조한 후, 2 ml 용량의 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조하였다.

[0069] <제제예 2> 정제의 제조

[0070] 베타 알콜 10 mg, 유당 100 mg, 전분 100 mg 및 스테아린산 마그네슘 적량을 혼합하고 통상의 정제 제조방법에 따라 타정하여 정제를 제조하였다.

[0071] <제제예 3> 캡슐제의 제조

[0072] 베타 알콜 10 mg, 유당 50 mg, 전분 50 mg, 탈크 2 mg 및 스테아린산 마그네슘 적량을 혼합하고 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0073] 이하, 본 발명에 따른 플라스마로젠 또는 이의 유사체를 이용한 건강식품 제조예를 설명하나, 이는 본 발명을 한정하고자 함이 아니라 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0074] <제조예 1> 건강식품의 제조

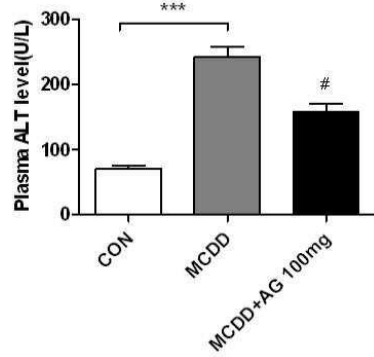
[0075] 베타 알콜 10 mg, 비타민 혼합물 적량(비타민 A 아세테이트 70 µg, 비타민 E 1.0 mg, 비타민 B 1 0.13 mg, 비타민 B 2 0.15 mg, 비타민 B 6 0.5 mg, 비타민 B 12 0.2 µg, 비타민 C 10 mg, 비오틴 10 µg, 니코틴산아미드 1.7 mg, 엽산 50 µg, 판토텐산 칼슘 0.5 mg), 무기질 혼합물 적량(황산제1철 1.75 mg, 산화아연 0.82 mg, 탄산마그네슘 25.3 mg, 제1인산칼륨 15 mg, 제2인산칼슘 55 mg, 구연산칼륨 90 mg, 탄산칼슘 100 mg, 염화마그네슘 24.8 mg)을 혼합한 다음 과립을 제조하고 통상의 방법에 따라 건강식품을 제조하였다.

[0076] <제조예 2> 건강음료의 제조

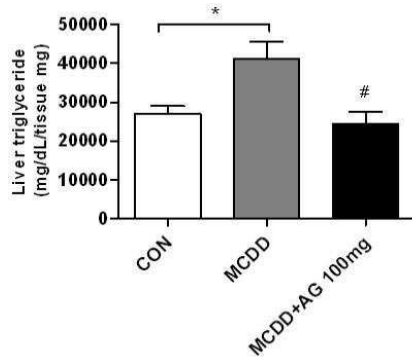
[0077] 상어 간유 10 mg, 구연산 1000 mg, 올리고당 100 g, 매실농축액 2 g, 타우린 1 g 및 정제수를 가하여 전체 900 ml가 되도록 하며, 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 L 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관하였다.

도면

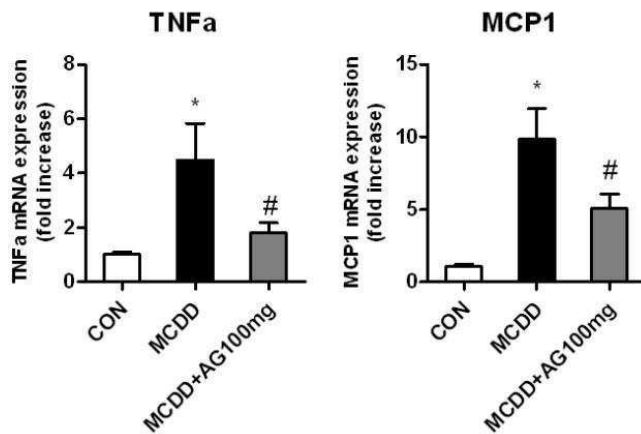
도면1



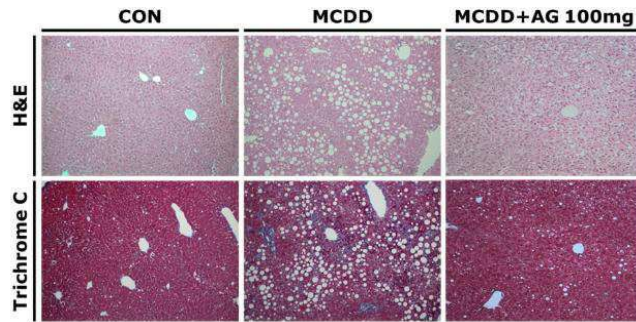
도면2



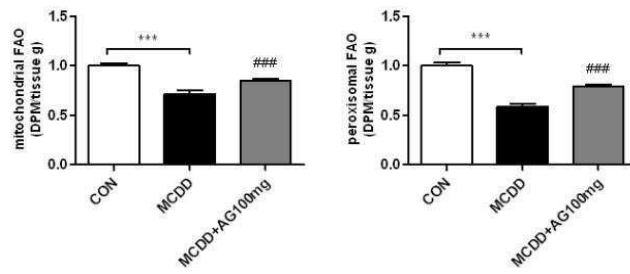
도면3



도면4



도면5



도면6

