(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021 년 10 월 28 일 (28.10.2021)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2021/215891 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 31/7048 (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)
A61K 36/185 (2006.01) *A23L 33/125* (2016.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/005207

(22) 국제출원일: 2021 년 4 월 23 일 (23.04.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2020-0049467 2020 년 4 월 23 일 (23.04.2020) KR

(71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (**EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 03760 서울시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).

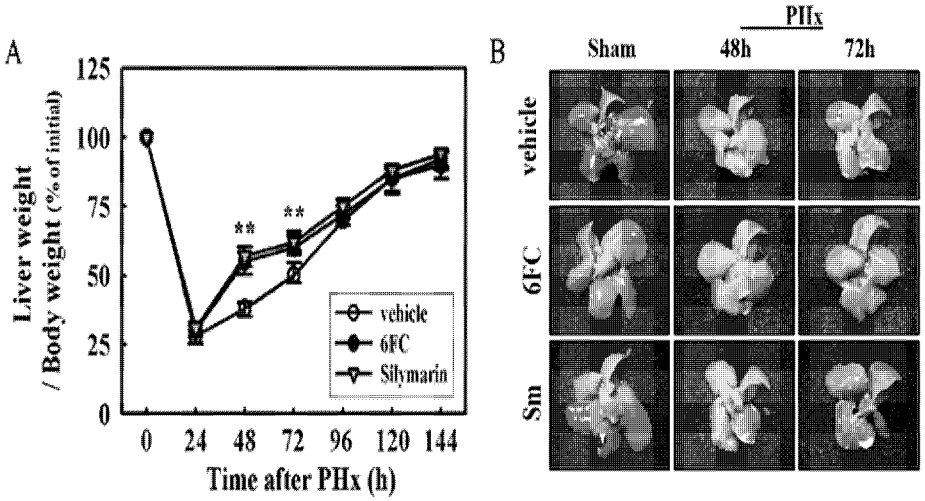
(72) 발명자: 서은경 (**SEO, Eun-Kyoung**); 06279 서울시 강남구 도곡로78길 22 103동 1906호., Seoul (KR). 우현애 (**WOO, Hyun Ae**); 03024 서울시 종로구 통일로 18길 9 103동 1304호, Seoul (KR). 길윤서 (**KIL, Yun-Seo**); 38540 경상북도 경산시 압량읍 압독로 38-10 106동 801호., Gyeongsangbuk-do (KR). 박지영 (**PARK, Ji-Young**); 03767 서울시 서대문구 이화여대 2나길 11 403호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인한얼 (**HANOL INTELLECTUAL PROPERTY AND LAW**); 05836 서울시 송파구 법원로 135 6층, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, 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,

(54) **Title:** HEPATIC REGENERATION PROMOTING COMPOSITION COMPRISING 6-O-TRANS-FERULOYL CATALPOL AS ACTIVE INGREDIENT

(54) **발명의 명칭:** 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 유효성분으로 포함하는 간 재생 촉진용 조성물



(57) **Abstract:** The present invention relates to hepatic regeneration-promoting use of a composition comprising 6-O-trans-feruloyl catalpol or pharmaceutically acceptable salts thereof and, more particularly, to: a pharmaceutical composition, for promoting hepatic regeneration or inhibiting liver damage, which comprises 6-O-trans-feruloyl catalpol or pharmaceutically acceptable salts thereof; and a functional health food composition for promoting hepatic regeneration or inhibiting liver damage. The 6-O-trans-feruloyl catalpol of the present invention has efficacy for promoting hepatic regeneration and thus can be used for developing a composition for treating or enhancing hepatic regeneration after a partial hepatectomy.

(57) **요약서:** 본 발명은 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 간 재생 촉진용도에 관한 것으로, 구체적으로, 본 발명은 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 간 재생 촉진용 또는 간 손상 억제용 약학적 조성물; 및 간 재생 촉진용 또는 간 손상 억제용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴은 간 재생을 촉진하는 효능이 있으므로, 간 절제술 후 간 재생을 개선 또는 치료를 위한 조성물 개발에 이용될 수 있다.

WO 2021/215891 A1

[다음 쪽 계속]

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

명세서

발명의 명칭: 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 유효성분으로 포함하는 간 재생 촉진용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 간 재생 촉진 용도에 관한 것으로, 구체적으로, 본 발명은 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 간 재생 촉진용 또는 간 손상 억제용 약학적 조성물; 및 간 재생 촉진용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 간은 지속적으로 효소반응 및 에너지 대사가 일어나는 생체기관으로 체외에서 들어온 물질 및 체내의 물질 대사과정에서 중추적인 역할을 담당한다. 또한, 간은 인체 내 소화기계와 전신순환계 사이에 위치함으로써 외부로부터 들어온 생체 외 물질로부터 전신을 방어하는 기능을 수행하고 있다. 따라서 일단 생체 내로 들어온 생체 외 물질이 간을 통과하는 까닭에 간은 영양소 이외에도 많은 독성물질에 노출될 위험이 다른 장기보다 많아 그만큼 손상될 확률도 다른 장기에 비해 높다.

[4] 간은 재생능력이 우수한 장기로 약간의 손상의 경우에는 충분히 정상으로 회복된다. 그러나 지속적으로 손상될 경우 간 조직의 일부가 완전히 파괴되면서 파괴된 부분이 정상으로 회복되지 못하고 결합조직이 과다 축적되게 된다. 이에 따라 간 조직에 흉터가 형성되고 간 기능이 정상으로 회복되지 못하는 상태가 된다. 또한, 간 암 및 간 종양이 발생하여 간 기능이 정상적으로 작동하지 못하는 경우, 외과수술적 방법을 통해 간의 일부를 절제하는 치료 방법이 쓰이고 있다.

[5]

[6] 간 절제술(Partial hepatectomy; PHx)은 간 암 및 간 종양 등의 질병을 치료하기 위한 일반적인 치료 방법으로 널리 사용되고 있으며, 간 절제술 후 간 세포는 절제된 간의 증식을 위하여 성장 인자에 반응해 이의 상응하는 메커니즘을 촉진한다. 이러한 간 재생은 정상적인 간 상태로의 회복을 위하여 필수적으로 일어나야한다. 그러나 상당수의 환자들은 간 절제술 후 간의 증식 능력이 떨어져 회복에 어려움을 겪는 경우가 많다. 그러므로 간 절제술 후 간 재생 촉진을 위한 치료제 개발의 필요성이 증가하고 있으며, 연구 및 실험을 통해 실리마린, 우르솔산, 퀘르세틴(quercetin) 및 레스베라톨과 같은 천연 물질의 간 세포 보호 및 간 질환 예방 효능이 밝혀지고 있다(한국등록특허 10-0693613, 한국등록특허 10-1840950).

[7]

[8] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 신규한 간 재생 촉진용 치료제를 개발하기 위한 노력을 계속한 결과, 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 이리도이드 화합물이 간 절제술 후 간 재생을 촉진하는 우수한 효과가 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 본 발명자들은 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴의 간 재생 촉진 효과를 최초로 규명하고, 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 간 재생 촉진용 또는 간 손상 억제용 약학적 조성물; 및 간 재생 촉진용 건강기능식품 조성물을 개발하여 본 출원을 완성하였다.

[11]

과제 해결 수단

[12] 본 발명의 하나의 목적은 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 간 재생 촉진용 또는 간 손상 억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[13] 본 발명의 다른 하나의 목적은 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 간 재생 촉진용 또는 간 손상 억제용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 간 절제술 후 간 재생 촉진 또는 간 손상 억제 방법을 제공한다.

[15] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 건강기능식품 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 간 재생 촉진 또는 간 손상 억제 방법을 제공한다.

[16] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 간 절제술 후 간 재생 촉진용 또는 간 손상 억제용 약학적 조성물을 제조하기 위한, 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

[17] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 간 재생 촉진용 또는 간 손상 억제용 건강기능식품 조성물을 제조하기 위한, 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

[18]

발명의 효과

[19] 본 발명의 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴은 간 재생을 촉진하는 효능이 있으므로, 간 절제술 후 간 재생을 개선 또는 치료를 위한 조성물 개발에 이용될

수 있다.

[20]

도면의 간단한 설명

[21] 도 1A는 실험 쥐 모델에서 간/체중 비율을 나타내는 그래프이다.

[22] 도 1B는 각 그룹별 간의 크기를 비교하는 사진이다.

[23] 도 2는 각 그룹별 혈청 내 ALT 및 AST의 수치를 나타내는 그래프이다.

[24] 도 3A는 전기영동을 통해 그룹별 cyclinD, cyclinE, 및 c-myc를 확인하는 사진이다.

[25] 도 3B는 단백질 정량을 통해 그룹별 cyclinD, cyclinE, 및 c-myc를 확인하는 그래프이다.

[26] 도 3C는 mRNA 발현을 통해 그룹별 cyclinD, cyclinE, 및 c-myc를 확인하는 그래프이다.

[27] 도 4A는 전기영동을 통해 그룹별 pYSTAT3, STAT3, Haploglobin, 및 Fibrinogen을 확인하는 사진이다.

[28] 도 4B는 단백질 정량을 통해 그룹별 pYSTAT3, Haploglobin, 및 Fibrinogen을 확인하는 그래프이다.

[29] 도 4C는 mRNA 발현을 통해 그룹별 pYSTAT3, Haploglobin, 및 Fibrinogen을 확인하는 그래프이다.

[30] 도 5A는 전기영동을 통해 그룹별 p-IKKIα, p-IκBα, IκBα, p-NFκB p65, 및 NFκB p65를 확인하는 사진이다.

[31] 도 5B는 단백질 정량을 통해 p-IKKIα, p-IκBα, 및 p-NFκB p65를 확인하는 그래프이다.

[32] 도 6A는 mRNA 발현을 통해 c-Jun, 및 c-Fos를 확인하는 그래프이다.

[33] 도 6B는 mRNA 발현을 통해 HGF, EGFR, TGF-α, NF-κB, IL-6, 및 C/EBP-β를 확인하는 그래프이다.

[34] 도 7A는 전기영동을 통해 그룹별 p-Akt, Akt, p-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-p38, 및 p38을 확인하는 사진이다.

[35] 도 7B는 단백질 정량을 통해 p-Akt, P-ERK, p-JNK, 및 p-p38을 확인하는 그래프이다.

[36] 도 8A는 HGF 및 6-O-trans-feruloyl catalpol를 처리한 뒤 전기영동을 통해 p-IκBα, 및 IκBα를 확인하는 사진이다.

[37] 도 8B는 HGF 및 6-O-trans-feruloyl catalpol를 처리한 뒤 단백질 정량을 통해 P-IκBα를 확인하는 그래프이다.

[38] 도 8C는 HGF 및 6-O-trans-feruloyl catalpol를 처리한 뒤 전기영동을 통해 p-Akt, Akt, p-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-p38, 및 p38을 확인하는 사진이다.

[39] 도 8D는 HGF 및 6-O-trans-feruloyl catalpol를 처리한 뒤 단백질 정량을 통해 p-Erk, p-JNK, p-p38, 및 p-Akt를 확인하는 사진이다.

[40]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[41] 이하에서는, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[42] 한편, 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시 형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.

[43] 또한, 당해 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[44]

[45] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 실시 양태는 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 간 재생 촉진용 또는 간 손상 억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[46] 본 발명에 따른 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴은 우수한 간 재생 촉진 및 간 손상 억제 효능을 나타내므로, 간 절제술 후 간 재생을 촉진하거나 간 손상을 억제하는 목적으로 조성물에 포함될 수 있으며, 간 재생 촉진 또는 간 손상 억제에 대하여 높은 효과를 기대할 수 있다.

[47] 본 발명의 용어, "간 재생"은 간의 일부가 상실되었을 때, 그 부분을 보충하는 현상을 의미한다.

[48] 본 발명의 용어, "촉진"은 어떤 일이 빨리 이루어지도록 돕는 것을 의미한다.

[49] 본 발명의 용어, "간 손상"은 간이 병 들어나 다치는 현상을 의미한다.

[50] 본 발명의 용어, "억제"는 생물 활동이나 활성이 저하되는 현상을 의미한다.

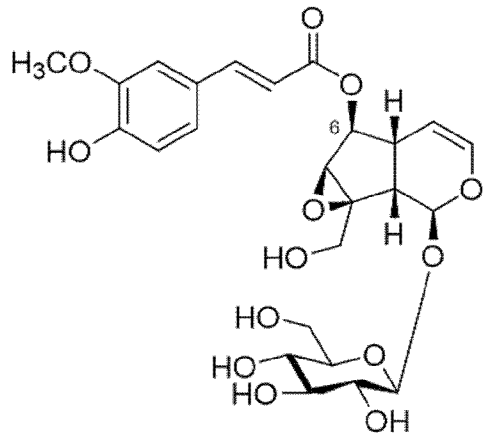
[51] 구체적으로, 상기 간 재생은 간 절제술 후 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 또한, 상기 재생은 세포 주기 조절 단백질 발현 증가, STAT3 또는 NF-κB 단백질 활성 증가, 초기 재생 단계 유전자 발현 증가, 재생 관련 성장인자 또는 전사인자의 발현 증가, Akt, ERK, JNK, 및 p38 인산화 증가에 의한 것일 수 있고, 보다 구체적으로, 상기 세포 주기 조절 단백질은 c-myc, cyclinD, 또는 cyclinE일 수 있고, 상기 초기 재생 단계 유전자는 c-Jun 또는 c-Fos일 수 있으며, 상기 재생 관련 성장인자 또는 전사인자는 HGF, EGFR, TGF-α, IL-g, NF-κB, 또는 C/EBF-β일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[52] 또한, 본 발명의 조성물은 HGF를 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[53]

[54] 본 발명의 용어, 본 발명의 "6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴(6-O-trans-Feruloyl catalpol)"는 화학식 I의 구조를 갖는 화합물을 의미한다

[55] [화학식1]



[56]

[57] 상기 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴은 개오동나무 추출물에서 분획한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 및 개오동나무 추출물의 간 재생 촉진 효능에 대하여는 알려진 바가 없었으며, 본 발명자에 의하여 최초로 규명되었다.

[58]

[59] 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 포함하는 조성물은 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴에서 일부 당업자가 예상 가능한 범위의 유도체가 포함될 수 있으며, 본 발명에서의 동일한 효과가 있는 한 제한 없이 포함된다. 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴은 이를 포함하는 추출물에서 수득될 수 있다. 또한, 공지의 방법으로 합성해서 사용 가능하다.

[60]

[61] 본 발명의 용어, "간 절제술(Partial hepatectomy; PHx)"은 간 암 및 간 종양 등의 질병을 치료하기 위한 일반적인 치료 방법으로 널리 사용되고 있다.

[62]

[63] 본 발명에서, 상기 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 포함하는 간 재생 촉진용 약학 조성물은 간 재생을 촉진하는 것을 특징으로 한다. 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에서는 상기 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 처리한 쥐 그룹의 간 절제술 후 간/체중 무게를 측정하여 재생을 촉진하는 효능을 확인하였으며(도 1), 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 처리 그룹에서 간 손상 마커 ALT 및 AST의 발현 저하를 확인하고(도 2), 세포 주기-관련 단백질 c-myc 및 cyclinD,E의 수준 증가를 확인하였으며(도 3), 간 절제술 후 초기에서 NF-κB 및 STAT3를 포함하는 간 재생을 위한 여러 인자의 활성 변화를 확인하고(도 4 내지 도 6). 성장인자들의 인산화를 확인하였으며(도 7), HGF를 함께 처리하여 시너지 효능을 통한 세포 증식 및 재생 관련 인자들의 증가를 확인하여(표 1, 표 2, 및 도 8), 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴이 쥐의 간 절제술 후 간 세포 증식을 유도하여 간 재생을 돕는 것을 확인하였다.

[64]

[65] 본 발명의 용어, "약학적으로 허용 가능한 염"은 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하고 있는 물질인 염 중에서도 약학적으로 사용될 수 있는 형태의 염을 의미하며, 통상적으로 금속염, 유기염기와의 염, 무기산과의 염, 유기산과의 염, 염기성 또는 산성 아미노산과의 염 등이 될 수 있다. 예를 들어, 금속염으로는 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등), 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염, 바륨염 등), 알루미늄염 등이 될 수 있고; 유기염기와의 염으로는 트리에틸아민, 피리딘, 피콜린, 2,6-루티딘, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 시클로헥실아민, 디시클로헥실아민, N,N-디벤질에틸렌디아민 등과의 염이 될 수 있으며; 무기산과의 염으로는 염산, 브롬화수소산, 질산, 황산, 인산 등과의 염이 될 수 있고; 유기산과의 염으로는 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 프탈산, 푸마르산, 옥살산, 타르타르산, 말레인산, 시트르산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 등과의 염이 될 수 있으며; 염기성 아미노산과의 염으로는 아르기닌, 라이신, 오르니틴 등과의 염이 될 수 있고; 산성 아미노산과의 염으로는 아스파르트산, 글루탐산 등과의 염이 될 수 있다.

[66]

[67] 본 발명의 약학적 조성물은, 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있는데, 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occuring carrier)를 포함할 수 있다.

[68] 보다 구체적으로, 상기 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 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, 폴리카프로락톤(polycaprolactone), 폴리락틱액시드(Poly Lactic Acid), 폴리-L-락틱액시드(poly-L-lactic acid), 광물유 등을 들 수 있다.

[69] 상기 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 담체의 형태로는 각종 부정형의 담체, 마이크로 스피어, 나노파이버 등을 포함할 수 있다.

[70] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[71] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 추출물과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될

수 있다.

[72] 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[73] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[74] 본 발명의 약학적 조성물에 포함된 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴의 함량은 특별히 제한되지 않는다.

[75]

[76] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 실시 양태는 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 간 재생 촉진용 또는 간 손상 억제용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[77] 이때, 상기 "6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴", "간 재생", "촉진", "간 손상" 및 "억제"에 대한 설명은 상기에서 서술한 바와 같다.

[78]

[79] 본 발명에 따른 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴은 우수한 간 재생을 촉진 효능을 나타내므로, 간 절제술 후 간 재생을 촉진하는 목적으로 식품 조성물에 포함될 수 있으며, 상기 식품 조성물은 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 간 재생 촉진에 대하여 높은 효과를 기대할 수 있다.

[80]

[81] 본 발명의 용어, "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, '기능성'은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 한편, 건강식품은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품은 건강 보조 목적의 식품을 의미하는데, 경우에 따라, 건강기능식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 혼용될 수 있다.

[82]

[83] 본 발명의 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴은 그대로 첨가되거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[84] 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 상기 제조 시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 구체적으로, 상기 식품 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다.

또한, 상기 식품 조성물은 방부제, 살균제, 산화방지제, 착색제, 발색제, 표백제, 조미료, 감미료, 향료, 팽창제, 강화제, 유화제, 증점제, 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.

[85] 또한, 상기 식품의 제형은 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고 휴대성이 뛰어나므로, 본 발명의 식품은 간 재생을 촉진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[86]

[87] 본 발명의 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴은 간 재생 촉진 또는 간 손상 억제를 위한 효능을 나타낼 수 있다면 식품조성물에 다양한 중량%로 포함될 수 있다. 구체적으로 식품 조성물의 총 중량 대비 0.00001 내지 100 중량% 또는 0.01 내지 80 중량%로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 건강 및 위생을 목적으로 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 함량을 포함할 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[88]

[89] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 간 절제술 후 간 재생 촉진 또는 간 손상 억제 방법을 제공한다.

[90] 상기 "6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴", "약학적으로 허용 가능한 염", "간 절제술", "간 재생", "촉진", "간 손상" 및 "억제"에 대한 설명은 상기에서 서술한 바와 같다.

[91] 본 발명에서 개체는 간 절제술 후 간 손상이 의심되는 개체로서, 해당 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 가축 등을 포함하는 포유 동물일 수 있으나, 본 발명의 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 약학적 조성물로 치료 가능한 개체는 제한 없이 포함된다. 또한, 본 발명의 개체에서 인간은 제외될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[92] 본 발명의 방법은 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 약학적 유효량으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이,

투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

[93]

[94] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 건강기능식품 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 간 재생 촉진 또는 간 손상 억제 방법을 제공한다.

[95] 상기 "6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴", "건강기능식품", "개체", "간 재생", "촉진", "간 손상" 및 "억제"에 대한 설명은 상기에서 서술한 바와 같다.

[96] 본 발명의 방법은 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 건강기능식품 조성물을 식품학적 유효량으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 식품학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

[97]

[98] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 간 절제술 후 간 재생 촉진용 또는 간 손상 억제용 약학적 조성물을 제조하기 위한, 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

[99] 상기 "6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴", "약학적으로 허용 가능한 염", "간 절제술", "간 재생", "촉진", "간 손상" 및 "억제"에 대한 설명은 상기에서 서술한 바와 같다.

[100]

[101] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 간 재생 촉진용 또는 간 손상 억제용 건강기능식품 조성물을 제조하기 위한, 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

[102] 상기 "6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴", "건강기능식품", "간 재생", "촉진", "간 손상" 및 "억제"에 대한 설명은 상기에서 서술한 바와 같다.

[103]

발명의 실시를 위한 형태

[104] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는

것은 아니다.

[105]

[106] **실험예 1: 실험동물의 사용**

[107] 실험에는 10주령 수컷 마우스 C57BL/6J를 사용하였으며, 모든 절차는 이화여자대학교 동물관리위원회에서 승인된 가이드라인을 준수하여 수행하였다. 마우스를 12시간 빛/12시간 어둠 주기로 온도가 제어된 케이지에 넣고 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴(6-O-trans-Feruloyl catalpol) 또는 실리마린(Silymarin) 10mg/mL를 수술 전 7일부터 희생될 때까지 매일 경구투여하여 관찰하였다.

[108] 또한, 간 절제술을 받지 않았지만 화합물을 처리한 거짓-수술 그룹, 간 절제술을 받고 화합물 대신 PBS 처리를 한 vehicle-treated 그룹, 및 양성 대조군으로 실리마린을 투여한 그룹을 준비하여 비교하였다.

[109] 모든 수술은 한 사람에 의하여 진행되어 표준화하였으며, 마취 후 간의 중앙 및 좌측 측면 엽을 절제하여 수집하였으며(중간 2/3), 혈액은 수집하여 3000g에서 5분간 원심분리하여 혈청을 분리한 뒤, -80℃에서 저장하였다.

[110]

[111] **실험예 2: mRNA 발현의 정량**

[112] 총 RNA는 조직으로부터 TRIzol 용액(Invitrogen)을 사용하여 분리하였고, ABI PRISM 7700 시스템 (PE Biosystems)을 이용하여 RT-PCR 및 real-time PCR 분석하였으며, 데이터는 GAPHD mRNA를 통해 정량화 하였다.

[113]

[114] **실험예 3: 면역블롯**

[115] 개별의 마우스로부터 동일한 양의 단백질을 각 그룹별로 수집하였다. 보다 구체적으로, 마우스 조직을 단백질 용해 버퍼와 함께 균질기를 통해 균질화하였고, 잔해물을 제거한 뒤, 15,000rpm, 4℃ 조건에서 15분간 원심분리하였다. 상등액은 폴리아크릴아마이드(polyacrylamide) SDS 겔에 용해하여 폴리비닐리덴디플루오라이드(polyvinylidene difluoride) 막으로 전기영동 하였다. 상기 막은 5% BSA를 처리한 뒤, 1차 항체와 함께 배양하였다. 이후, 화학발광 시약(Ab Frontier)으로 강화시킨 뒤, 면역 복합체는 horseradish peroxidase-conjugated 2차 항체(Bio-Rad)를 통해 검출하였다. 많은 양의 타겟 단백질은 면역블롯의 밀도 측정 분석에 의해 정량화하였다.

[116]

[117] **실험예 4: 세포배양**

[118] Hep3B 인간 간암 세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 입수하였으며, 10% 소 태아 혈청(HyClone) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신이 포함된 DMEM에서, 5% CO2, 37℃ 조건에서 세포를 배양하였다. 또한, 세포의 형태는 현미경으로 조사하였으며, 80%의 confluence에서 계대배양 하였다. Hep3B 세포(1x106/mL)는 HGF(10ng/mL) 자극

16시간 전에 혈청을 제거하였다.

[119]

[120] **실험예 5: 세포 증식 어세이**

[121] 세포의 증식 연구를 위하여 세포 수 카운팅은 12웰 배양 접시에서 단일층 배양에서 헤모사이토미터를 통해 측정하였다. Hep3B 세포는 0.5μM ~ 10μM의 화합물을 포함하는 배양액 및 대조군으로 DMSO만 포함된 배양액에 0.5x105/mL 농도로 10μM만큼 접종하고, 24시간마다 트립신 처리를 하여 살아있는 세포의 수를 3회씩 카운팅하였다. 상기 실험은 4일간 이루어졌으며, 독립적인 3회의 실험을 통해 본 발명의 화합물이 증식에 미치는 용량-의존적인 영향을 확인하였다.

[122]

[123] **실험예 6: 재료 준비**

[124] 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴은 개오동나무의 줄기 껍질에서부터 분리하였으며, 순도 평가는 분석용 HPLC (순도>99%)에 의해 수행되었다. 또한, 실리마린은 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구매하였다.

[125]

[126] **실시예 1: 간/체중 비율 측정 및 혈청 내 ALT/AST 활성**

[127] 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴이 간 재생에 미치는 영향을 확인하기 위해, 실험예 1의 방법을 통해, 수술 7일전부터 희생하기까지 매일 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 구강 투여한 실험 그룹들의 간/체중 비율을 측정하였다.

[128] 그 결과, 도 1 에서 볼 수 있듯이, 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 투여한 그룹의 체중 대비 간 무게는 vehicle-treated 그룹과 비교하여 48시간 후 약 2배, 72시간 후 약 1.3배 증가하였다. 이는 실리마린과 유사한 효능이었으며(도 1A), 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 투여한 그룹은 간 절제술 14일 후에도 간의 과성장을 유도하지 않았다(도 1B).

[129] 이를 통해, 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴이 간 재생 초기 단계에서, 특히 수술 후부터 72시간까지 월등한 재생 촉진 효능을 확인하여, 초기 단계의 회복에 우수한 효능이 있음을 확인하였으며, 또한, 이는 간의 과성장을 유발하지 않는 것을 확인하였다.

[130]

[131] **실시예 2: 쥐의 혈청 내 ALT/AST**

[132] 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT; alanine aminotransferase) 및 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST)는 간 손상을 나타내는 마커로 알려져 있어, 간이 재생되는 동안의 쥐 혈청 내 상기 ALT 및 AST의 값을 이의 키트를 통해 분석하였다.

[133] 그 결과, 도 2에서 볼 수 있듯이, 간 절제술 12시간 후 vehicle-treated 그룹보다, 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 투여한 그룹에서 간 손상 마커 수치가 약 1/2로

감소한 것을 확인하였으며, 12시간 이후에도 지속적으로 억제하는 것을 확인하였다(도 2). 또한, 이는 실리마린을 투여한 결과와 유사한 효능임을 확인하였다.

[134] 이를 통해, 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴이 간 손상을 약 1/2로 억제하는 것으로 사료되었다.

[135]

[136] **실시예 3: c-myc, cyclinD, 및 cyclinE 발현**

[137] **실시예 3-1: 단백질 정량**

[138] 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴이 간 재생 동안 세포 주기를 정상 주기로 돌아오게 촉진시키는지 확인하기 위하여, 간 세포 주기 단백질의 단백질을 정량화하여 분석하였다.

[139] 보다 구체적으로, 재생 과정 동안 활성이 일어나는 것으로 알려져 간 재생의 초기 마커로서 활용되는 c-myc와 같은 원암유전자(proto-oncogene)의 활성 및 간 세포 성장에 필요하다고 알려진 cyclinD 및 cyclinE는 간 세포 주기 마커로 알려져 있기에, 이의 활성을 통상의 방법을 통한 전기영동, 및 실험예 3의 방법을 통한 단백질 정량을 통해 측정하였다.

[140] 그 결과, 도 3A 내지 3B에서 볼 수 있듯이, vehicle-treated 그룹에 비하여 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 투여한 그룹에서 간 절제술 후, cyclinD가 증가한 것을 확인하였으며, 이는 실리마린을 처리한 그룹 보다도 우수하게 증가한 것을 확인하였다.

[141] 또한, cyclinE 및 c-myc가 증가하는 것을 확인하였으며, 실리마린을 처리한 그룹에서도 이와 유사한 효능을 확인하였다(도 3B).

[142] 이를 통해, 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 투여할 경우, 초기단계에서 간 재생 사이클 마커가 증가하는 것을 확인하여, 간 재생이 활발하게 일어나는 것을 유추할 수 있었으며, 이는 실리마린 보다 증진된 간 재생 촉진 효능이 있음을 확인하였다.

[143]

[144] **실시예 3-2: mRNA 발현**

[145] 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴이 간 재생 동안 세포 주기를 정상 주기로 돌아오게 촉진시키는지 확인하기 위하여, 간 세포 주기 단백질의 mRNA를 실험예 2의 방법을 통하여 분석하였다.

[146] 그 결과, 도 3C에서 볼 수 있듯이, vehicle-treated 그룹에 비하여 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 투여한 그룹에서 간 절제술 후, cyclinD 및 cyclinE가 증가한 것을 확인하였으며, 실리마린을 처리한 그룹에서도 이와 유사한 효능을 확인하였다.

[147] 이를 통해, 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 투여할 경우, 초기 단계에서 간 재생 사이클 마커가 증가하는 것을 확인하여, 간 재생이 활발하게 일어나는 것을 유추할 수 있었으며, 이는 실리마린과 유사한 간 재생 촉진 효능이 있음을

확인하였다.

[148]

[149] **실시예 4: STAT3 활성**

[150] **실시예 4-1: 단백질 정량**

[151] 사이토카인 및 성장인자는 STAT3(signal transducer and activator of transcription 3)를 활성화시키며, 활성화 된 STAT3은 이량체화(dimerize)된 후 핵으로 이동하여 표적 유전자에 결합해 전사를 유도하는 것으로 알려져 있다. 상기 STAT3는 간 재생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴의 간 재생 효능을 확인하기 위하여, STAT3, 티로신 인산화 된 pYSTAT3, pYSTAT3의 타겟으로 비례하여 증가되는 Haptoglobin(HapG), 및 Fibrinogen의 발현을 전기영동 및 실험예 3의 방법을 통하여 확인하였다.

[152] 그 결과, 도 4A 내지 4B에서 볼 수 있듯이, vehicle-treated 그룹에 비하여 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 투여한 그룹에서 간 절제술 후, pYSTAT3/STAT3, HapG/GAPDH 및 Fibrinogen/GAPDH 비율이 증가한 것을 확인하였으며, 실리마린을 처리한 그룹 보다 우수하게 증가한 것을 확인하였다(도 4B).

[153]

[154] **실시예 4-2: mRNA 발현**

[155] 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴의 간 재생 효능을 확인하기 위하여, 상기에서 확인한 pYSTAT3의 타겟으로 비례하여 증가되는 Haptoglobin(HapG), 및 Fibrinogen의 mRNA를 실험예 2의 방법을 통하여 분석하였다.

[156] 그 결과, 도 4C에서 볼 수 있듯이, vehicle-treated 그룹, 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 투여한 그룹, 및 실리마린을 처리한 그룹에서 모두 점진적으로 HapG 및 Fibrinogen의 mRNA 발현이 증가하는 것을 확인하였으며, vehicle-treated 그룹에 비하여 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 및 실리마린을 투여한 그룹에서 mRNA 증가율이 보다 높은 것을 확인하였다(도 4C).

[157] 이를 통해, 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 투여 시, 간 재생 마커인 HapG 및 Fibrinogen의 mRNA 발현이 vehicle-treated 그룹에 비하여 유의하게 높은 것을 확인하였으며, 또한, 단백질 정량화를 통해 STAT3의 티로신 인산화가 월등히 증가하는 것을 확인하였고, 이는 실리마린보다도 뛰어난 효능임을 확인하여, 본 발명의 조성물의 우수한 간 재생 촉진 효능을 확인하였다.

[158]

[159] **실시예 5: NF-κB 활성**

[160] NF-κB의 활성은 간 절제술 후 수 시간 내에 이루어지는 것을 확인하여 간 재생에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 사료되어지며, 세포 자살을 방지하고, 간 세포의 생존을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 또한, p-IKKα, p-IκBα, 및 p-NFκB p65는 상기 NF-NFκB의 마커로 알려져 있다. 따라서 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴의 간 재생 효능을 확인하기 위하여, 상기 NF-κB의

마커인 p-IKKα, p-IκBα, 및 p-NFκB p65의 발현을 전기영동 및 실험예 3의 방법을 통하여 확인하였다.

[161] 그 결과, 도 5에서 볼 수 있듯이, vehicle-treated 그룹에 비하여 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 투여한 그룹에서 간 절제술 후, p-IKKα/GAPDH 비율이 증가한 것을 확인하였으며, 실리마린을 처리한 그룹에서도 증가하였지만, 본 발명의 조성물을 투여한 그룹의 증가량이 보다 높은 것을 확인하였다.

[162] 또한, p-IκBα/IκBα 및 p-NFκB p65/NFκB p65의 비율이 증가하였고, 이는 실리마린을 처리한 그룹 보다 우수하게 증가한 것을 확인하였다(도 5B).

[163] 이를 통해, 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 투여 시, 간 활성을 나타내는 NF-κB의 활성이 간 절제술 후 즉시 나타나며, vehicle-treated 및 실리마린처리 그룹보다 월등한 효능이 있음을 확인하였으며, 간 활성 증가를 통한 간 재생 촉진 효능이 있음을 확인하였다.

[164]

[165] **실시예 6: 간 재생 초기 단계의 유전자 및 인자 발현**

[166] **실시예 6-1: c-Jun 및 c-Fos**

[167] c-Jun 및 c-Fos 유전자는 간 재생 초기에 중요한 역할을 하는 AP-1(activator protein-1)의 성분으로, 간 재생 단계의 마커로서 사용될 수 있어, 이의 mRNA 발현을 확인하였다.

[168] 그 결과, 도 6A에서 볼 수 있듯이, vehicle-treated 그룹에 비하여 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 투여한 그룹에서 간 절제술 후, c-Jun mRNA가 증가한 것을 확인하였으며, 실리마린을 처리한 그룹에서도 이와 유사한 효능을 확인하였다.

[169] 또한, C-Fos의 mRNA 역시 증가하였으며, 실리마린을 처리한 그룹에서도 이와 유사한 효능이 나타나는 것을 확인하였다.

[170] 이를 통해, 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴이 간 재생 초기에 중요한 역할을 하는 유전자인 c-Jun 및 c-Fos의 발현을 월등히 증가시켜, 간 재생 유도 효능이 있음을 확인하였다.

[171]

[172] **실시예 6-2: 성장인자 및 전사인자**

[173] 간 재생에 관여하는 다수의 성장인자 및 전사인자의 mRNA 발현을 확인하여, 간 재생을 확인하였다.

[174] 보다 구체적으로, HGF(hepatocyte growth factor), EGFR(epidermal growth factor receptor), TGF-α, IL-g, NF-κB, 및 C/EBF-β(CCAAT enhancer-β)의 발현을 확인하였다.

[175] 그 결과, 도 6B에서 볼 수 있듯이, vehicle-treated 그룹에 비하여 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 투여한 그룹에서 간 절제술 후, HGF mRNA, EGFR mRNA 및 C/EBP-β가 증가한 것을 확인하였으며, 이는 실리마린을 처리한

그룹보다 월등히 증가하는 것을 확인하였다.

[176] 또한, NF-κB, IL-6 및 TGF-α가 증가하였으며, 실리마린을 처리한 그룹에서도 유사한 효능을 확인하였다.

[177] 이를 통해, 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴이 간 재생을 촉진하는 성장인자 및 전사인자인 HGF, EGFR, TGF-α, IL-g, NF-κB, 및 C/EBF-β의 발현을 증가시키는 것을 확인하였으며, 특히 HGF, EGFR, 및 C/EBF-β의 발현은 실리마린처리 그룹보다도 월등히 증가하는 것을 확인하여, 본 발명의 조성물의 종래에 알려진 우수한 간 재생 유도 효능을 확인하였다.

[178]

[179] **실시예 7: Akt, ERK, JNK, 및 p38 인산화**

[180] Akt 세린/트레오닌 카이네이즈는 성장인자 자극에 반응하는 중요한 세포 생존 매개체이며, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 K)/Akt 경로의 활성화는 세포 자살을 억제하는 것으로 알려져 있다. 또한, ERK, JNK, 및 p38는 간 재생에서 중요한 신호 전달의 매개체이기에, 간 절제술 이후 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 처리한 그룹의 인산화 된 Akt, ERK, JNK, 및 p38를 전기영동 및 단백질 정량을 통해 분석하였다.

[181] 그 결과, 도 7에서 볼 수 있듯이, vehicle-treated 그룹에 비하여 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 투여한 그룹에서 간 절제술 후, p-Akt/Akt, p-Erk/Erk, p-JNK/JNK 및 p-p38/38 비율이 각각 증가하였으며, 실리마린을 처리한 그룹에서도 유사한 효능을 확인하였다(도 7A 및 7B).

[182] 이를 통해, 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴이 생존 매개체 및 재생 신호 전달 매개체인 Akt, ERK, JNK, 및 p38의 인산화를 촉진시켜, 실리마린과 유사한 간 재생 유도 효능이 있음을 확인하였다.

[183]

[184] **실시예 8: HGF에 처리에 의한 시너지 효능**

[185] 상기 실시예 6에서 HGF 성장인자의 발현이 월등히 증가한 것을 확인하여, HGF 성장인자 추가 처리에 의한 시너지 효능을 확인하였다.

[186]

[187] **실시예 8-1: in vitro 내 세포 증식**

[188] HGF 및 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴의 시너지 효능을 인간 간 세포 Hep3B를 통해 평가하였다(표 2). 완전 배지 내 10ng/mL HGF, 및 10μM 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 처리한 Hep3B 세포를 통해 세포 생존율을 평가하였고, 음성 대조군으로는 DMSO를 사용하였고, 양성 대조군으로는 실리마린을 사용하였다.

[189] [표1]

Hep3B	Cell number (× 10^5 per mL)				
	HGF (10ng/ml)				
	Day after treatment (10μM)				
Compounds	0	1	2	3	4
Control		1.04±0.22	1.32±0.09	2.05±0.08	2.23±0.25
Silymarin[a]	0.50±0.06	1.16±0.20	1.52±0.28	2.22±0.03*	2.71±0.05*
6-*O-trans*-feruloyl catalpol		1.24±0.12	2.32±0.19*	2.88±0.28*#	3.05±0.14*#

[a] Positive control.
* $P < 0.05$ vs. control(DMSO alone)
# $P < 0.05$ vs. positive control.

[190]

[191] 그 결과, 표 1에서 볼 수 있듯이, 24시간 마다 세포수를 카운팅하여, 4일의 배양기간 동안, 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 Hep3B 세포에 처리하자, 대조군과 비교하여 세포 증식률이 1일부터 4일까지 각각 19%, 76%, 39%, 및 37% 증가함을 확인하였다. 또한, 실리마린 역시 세포 수가 증가되는 것을 확인하였으나(각 12%, 15%, 7%, 및 21%), 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 처리하였을 때 보다는 증가율이 적은 것을 확인하였다.

[192]

[193] [표2]

Hep3B	Cell number (× 10^5 per mL)					
	HGF (10ng/ml)					
	-	+	+	+	+	+
	Concentration of compound (μM)					
Compounds	0	0	0.5	1	5	10
Control			2.18±0.07	2.17±1.53	2.15±0.13	2.20±0.27
Silymarin[a]	1.90±0.09	2.14±0.05	2.27±0.21	2.31±0.13	2.33±0.06*	2.51±0.12*
6-*O-trans*-feruloyl catalpol			2.41±0.10*	2.44±0.06*	2.82±0.09*#	3.08±0.13*#

[a] Positive control.
* $P < 0.05$ vs. control(DMSO alone)
# $P < 0.05$ vs. positive control.

[194]

[195] 또한, 표 2에서 볼 수 있듯이, 실리마린 및 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 농도별로 Hep3B 세포에 처리하여 4일간 배양한 결과, 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 0.5, 1, 5, 및 10μM 처리하자 대조군과 비교하여 Hep3B 세포 내 성장이

각각 10.9%, 12.1%, 29.7%, 및 41.7% 증가하였으며, 실리마린을 0.5, 1, 5, 및 10μM 처리한 그룹은 각각 4.1%, 7.0%, 6.9%, 및 15.5% 증가하는 것을 확인하였다.

[196]

[197] 반면, 두 화합물에 의한 세포 배양 중 세포 부착 또는 형태 차이는 없는 것을 확인하였다.

[198] 이를 통해, HGF 및 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 함께 처리할 경우, 세포의 부착 또는 형태에는 영향을 미치지 않으면서 세포의 증식률이 지속적/농도의존적으로 더욱 증가되었으며, 실리마린 보다 이의 효능이 현저하게 뛰어남을 확인하여, 본 발명의 조성물이 종래에 알려진 실리마린 보다 우수한 간 재생 효능이 있음을 확인하였다.

[199]

[200] **실시예 8-2: in vitro 내 단백질 인산화**

[201] HGF 및 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴의 시너지 효능을 IκBα, Akt, ERK, JNK, 및 p38의 인산화를 전기영동 및 단백질 정량을 통해 분석하였다.

[202] 보다 구체적으로, HGF 성장인자 10ng/mL를 처리하고 vehicle-treated 그룹 및 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 그룹 내 상기 인자들의 시간별 발현률을 비교하였다.

[203] 그 결과, 도 8에서 볼 수 있듯이, vehicle-treated + HGF 그룹보다 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 + HGF를 투여한 그룹에서 p-IκBα/IκBα, p-ERK/ERK, p-JNK/JNK, p-Akt/Akt 및 p-p38/p38의 비율이 각각 점진적으로 현저하게 증가하여, vehicle-treated + HGF 그룹에 비하여 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴 + HGF 그룹의 인산화가 더욱 활발히 일어나는 것을 확인하였다(도 8).

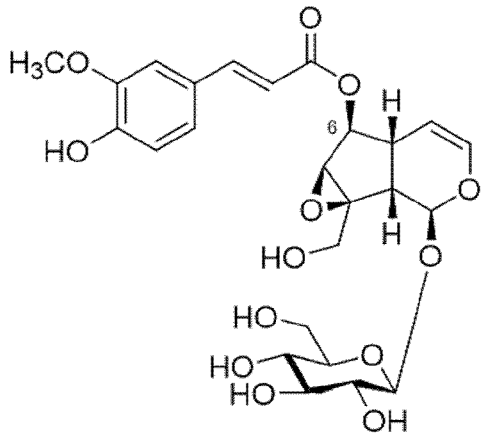
[204] 이를 통해, HGF와 6-O-트랜스-페룰로일 카탈폴을 함께 처리할 경우, Akt, ERK, JNK, 및 p38의 인산화가 더욱 증가하여 간 세포 증식이 촉진되는 시너지 효능을 확인하였다.

[205]

[206] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

[청구항 1] 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 간 재생 촉진용 또는 간 손상 억제용 약학적 조성물:
[화학식 I]



[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 재생은 간 절제술 후에 이루어지는 것인, 간 재생 촉진용 약학적 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 재생은 세포 주기 조절 단백질 발현 증가에 의해 촉진되는 것인, 간 재생 촉진용 약학적 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 재생은 STAT3 또는 NF-κB 단백질 활성 증가에 의해 촉진되는 것인, 간 재생 촉진용 약학적 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 재생은 초기 재생 단계 유전자 발현 증가에 의해 촉진되는 것인, 간 재생 촉진용 약학적 조성물.

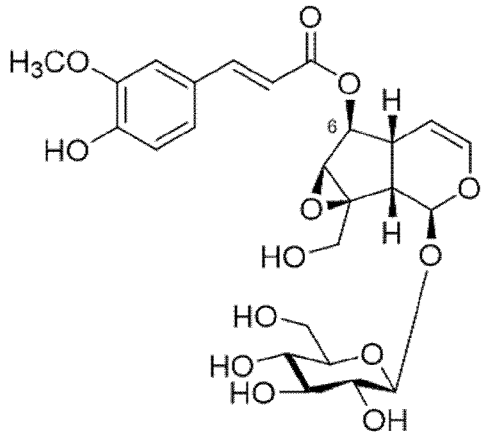
[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 재생은 재생 관련 성장인자 또는 전사인자 발현 증가에 의해 촉진되는 것인, 간 재생 촉진용 약학적 조성물.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 재생은 Akt, ERK, JNK, 또는 p38 인산화 증가에 의해 이루어지는 것인, 간 재생 촉진용 약학적 조성물.

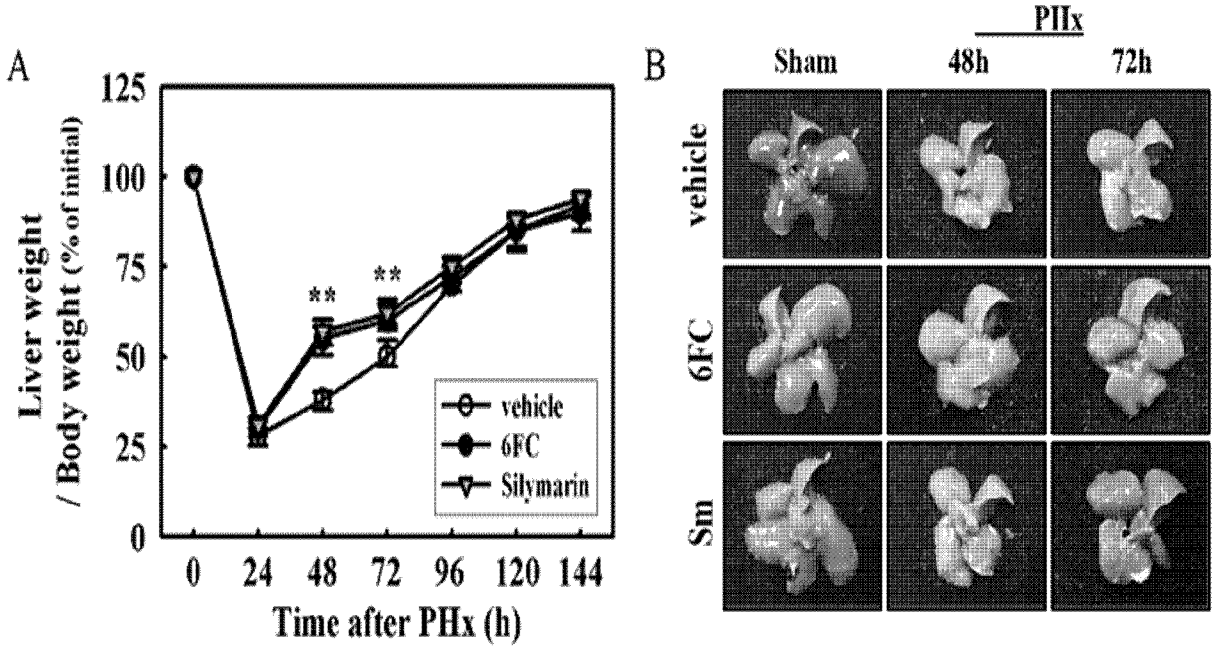
[청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 HGF를 추가로 포함하는 것인, 간 재생 촉진용 약학적 조성물.

[청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 화합물은 개오동나무 추출물에서 분획한 것인, 간 재생 촉진용 약학적 조성물.

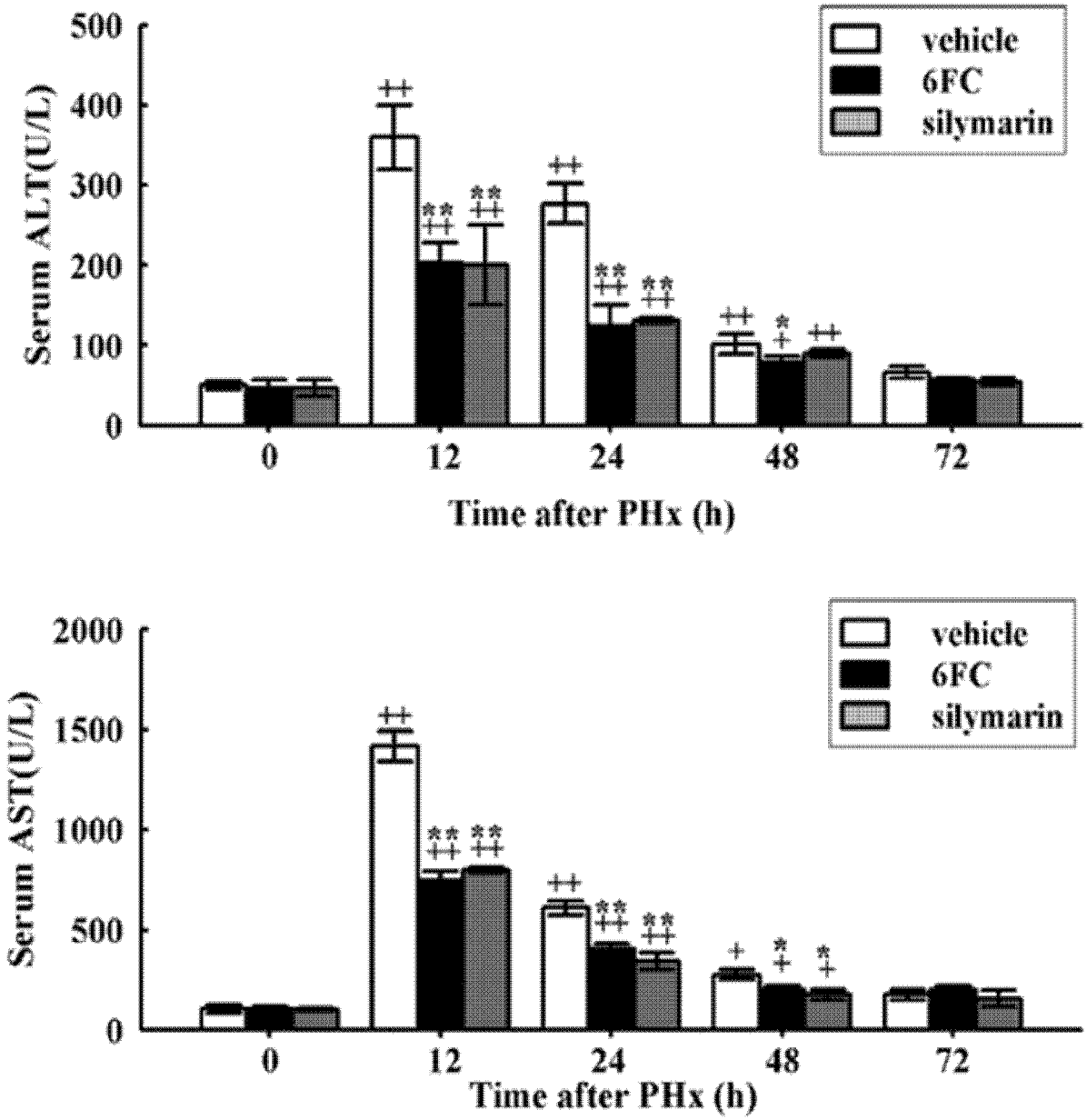
[청구항 10] 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 간 재생 촉진용 또는 간 손상 억제용 건강기능식품 조성물:
[화학식 I]


H3CO
HO
O
O
6
H
O
O
H
HO
O
HO
HO
HO
O
OH

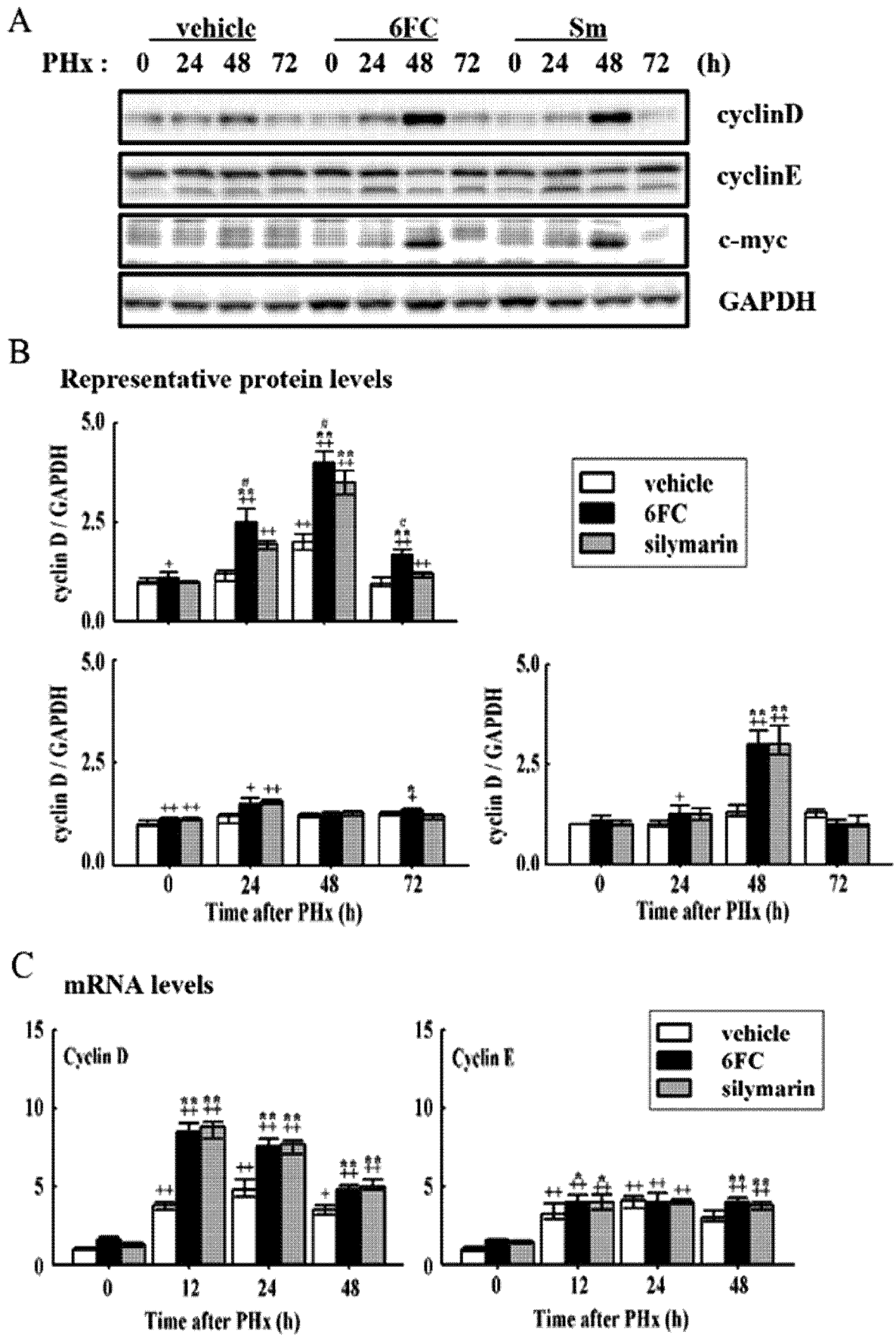
[도1]


A
Liver weight / Body weight (% of initial)
125
100
75
50
25
0
0 24 48 72 96 120 144
Time after PHx (h)
**
**
vehicle
6FC
Silymarin
B
PHx
Sham
48h
72h
vehicle
6FC
Sm

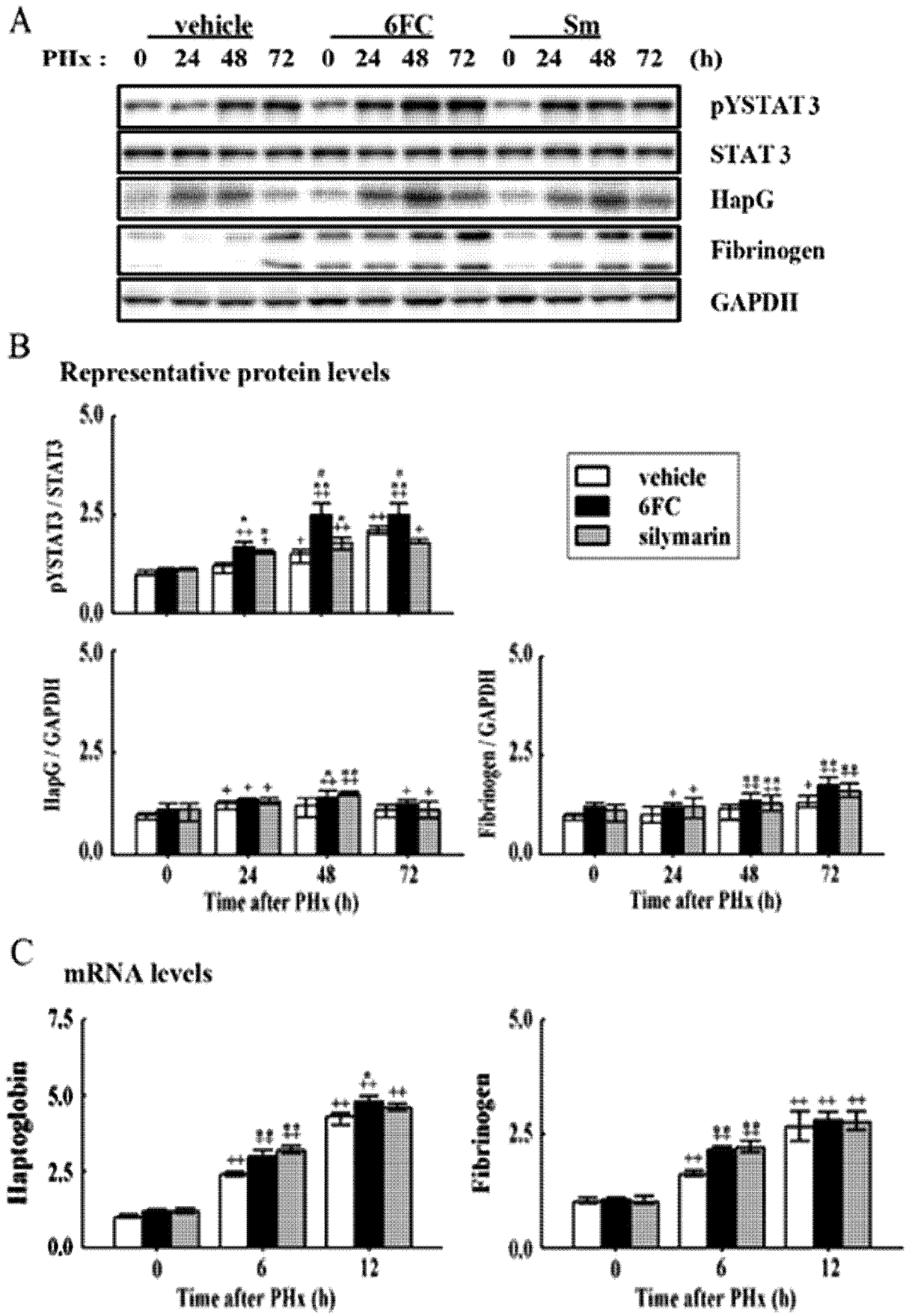
[도2]


Serum ALT(U/L)
500
400
300
200
100
0
0
12
24
48
72
Time after PHx (h)
vehicle
6FC
silymarin
Serum AST(U/L)
2000
1500
1000
500
0
0
12
24
48
72
Time after PHx (h)
vehicle
6FC
silymarin

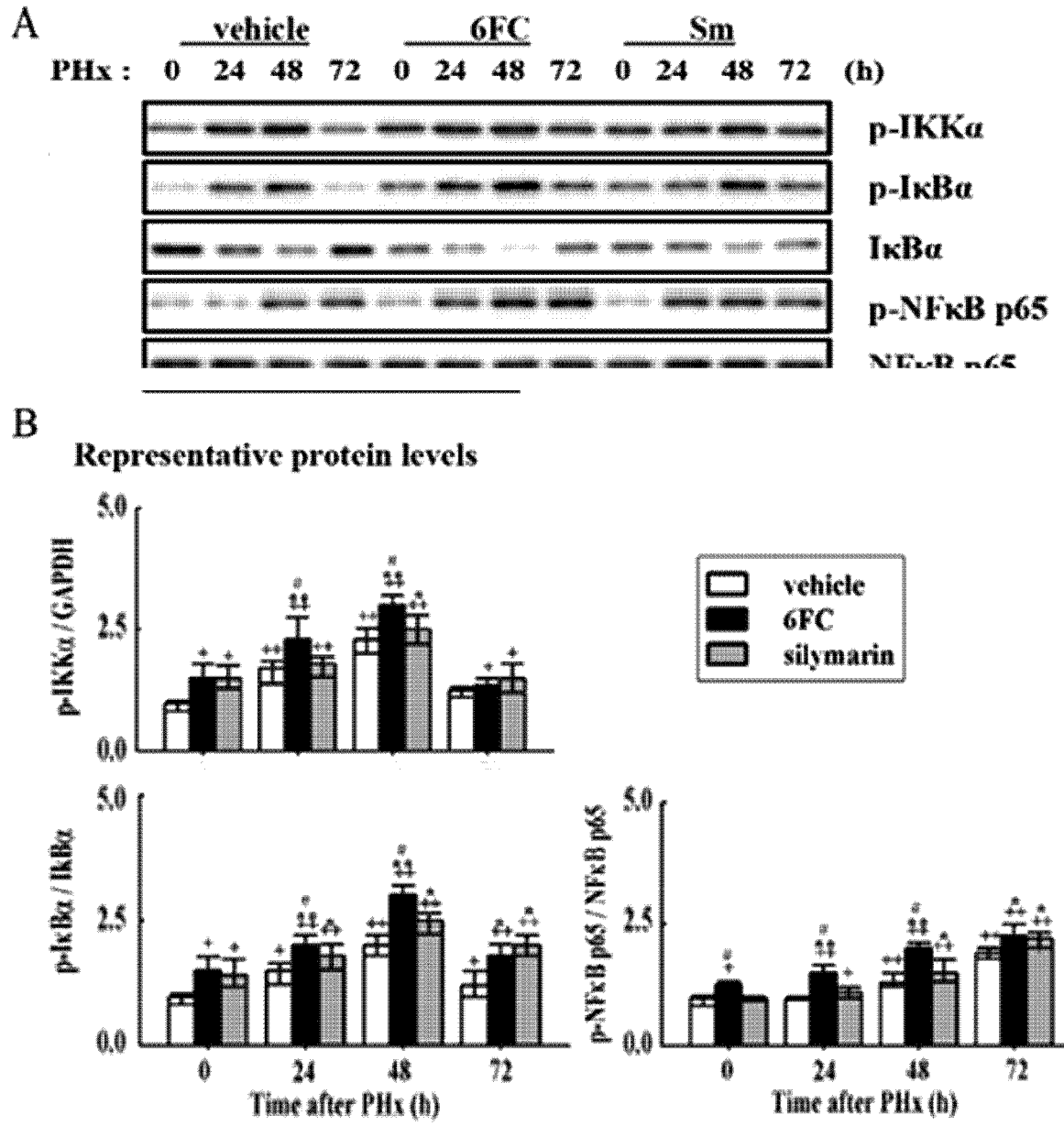
[도3]


A
vehicle
6FC
Sm
PHx : 0 24 48 72 0 24 48 72 0 24 48 72 (h)
cyclinD
cyclinE
c-myc
GAPDH
B
Representative protein levels
cyclin D / GAPDH
5.0
2.5
0.0
vehicle
6FC
silymarin
0
24
48
72
Time after PHx (h)
C
mRNA levels
Cyclin D
Cyclin E
15
10
5
0
12
24
48
Time after PHx (h)

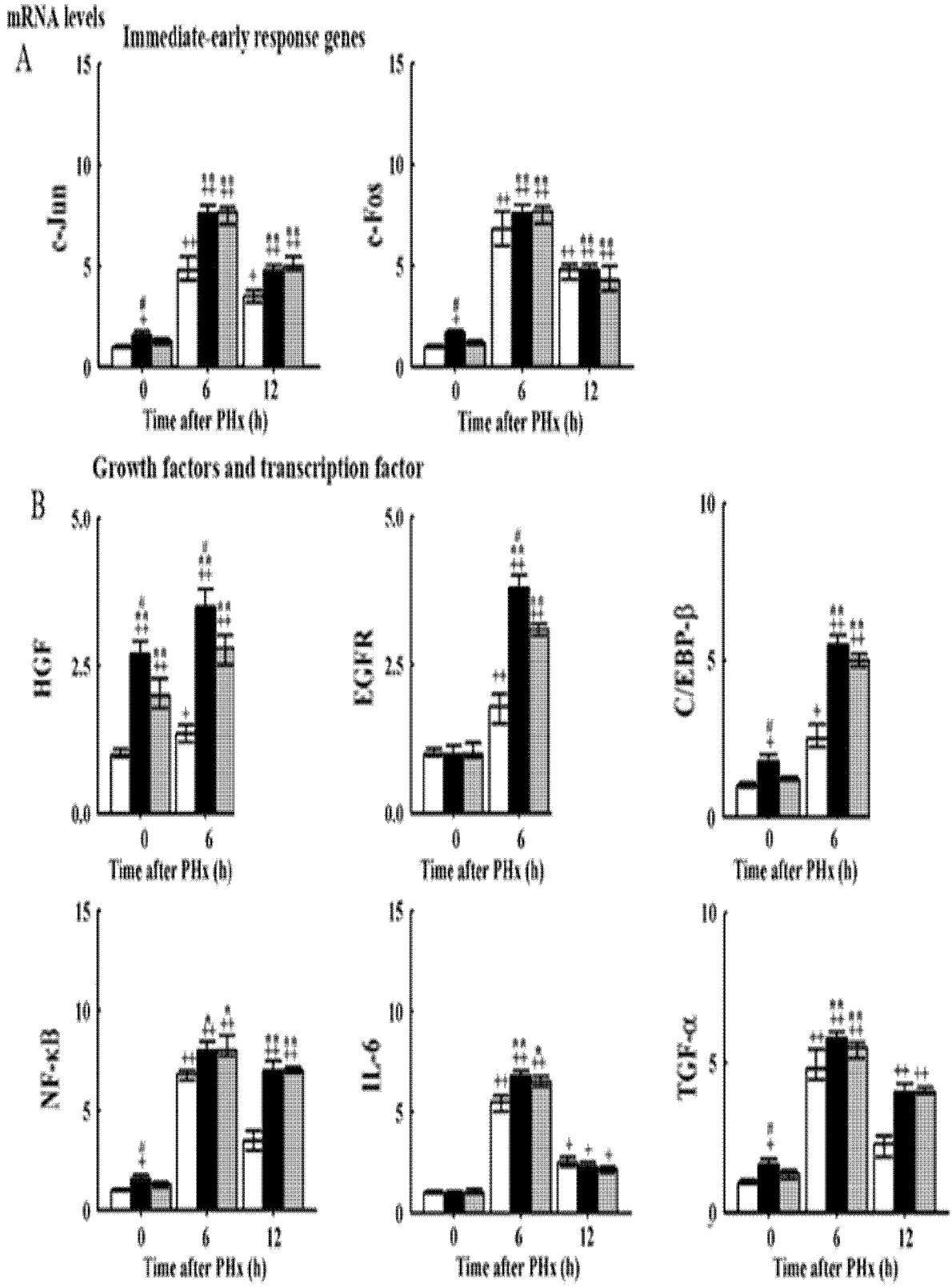
[도4]


A
vehicle
6FC
Sm
PHx : 0 24 48 72 0 24 48 72 0 24 48 72 (h)
pYSTAT3
STAT3
HapG
Fibrinogen
GAPDH
B
Representative protein levels
pYSTAT3 / STAT3
HapG / GAPDH
Fibrinogen / GAPDH
vehicle
6FC
silymarin
Time after PHx (h)
C
mRNA levels
Haptoglobin
Fibrinogen
Time after PHx (h)

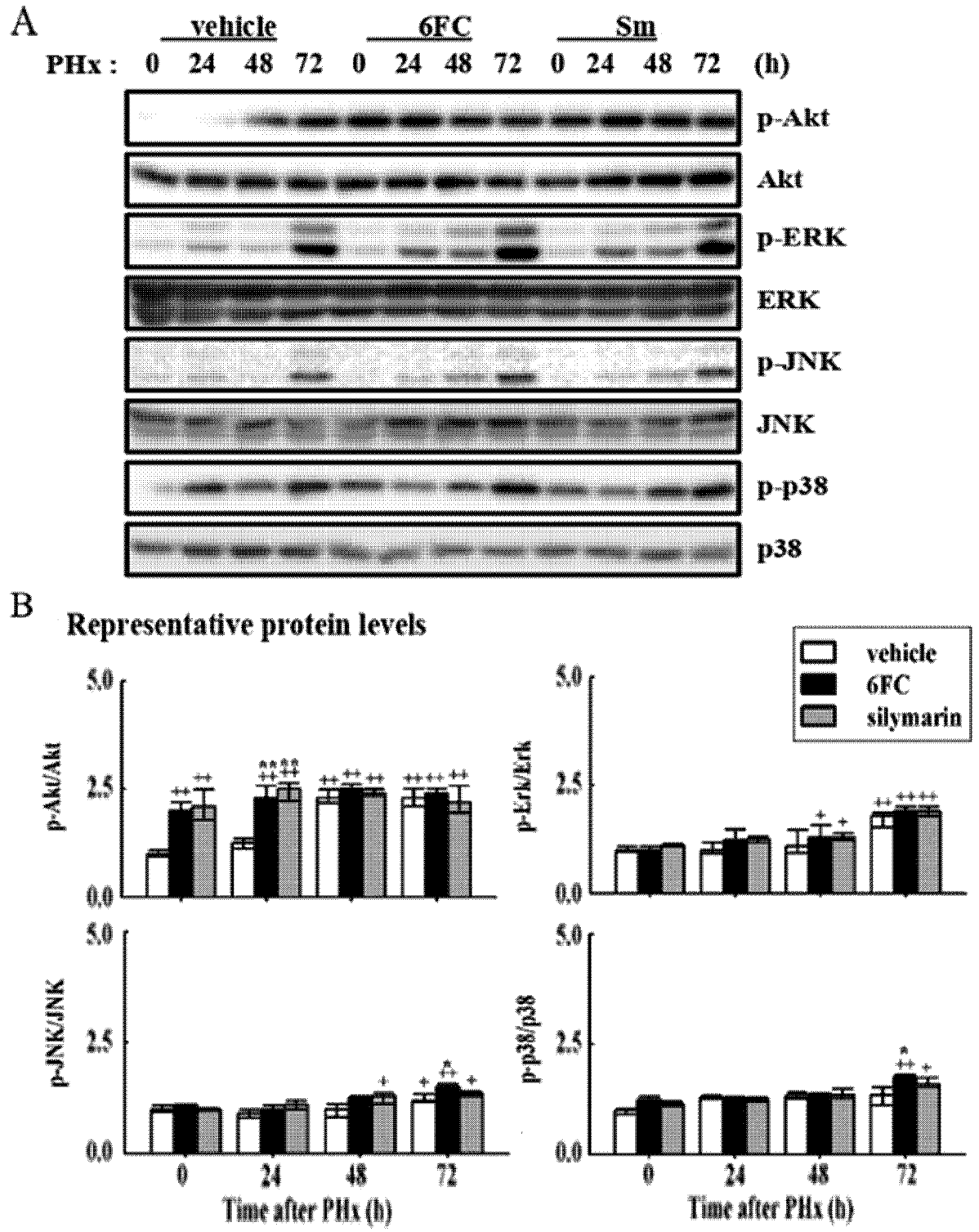
[도5]


A
vehicle
6FC
Sm
PHx : 0 24 48 72 0 24 48 72 0 24 48 72 (h)
p-IKKα
p-IκBα
IκBα
p-NFκB p65
B
Representative protein levels
p-IKKα / GAPDH
p-IκBα / IκBα
p-NFκB p65 / NFκB p65
vehicle
6FC
silymarin
5.0
2.5
0.0
0 24 48 72
Time after PHx (h)

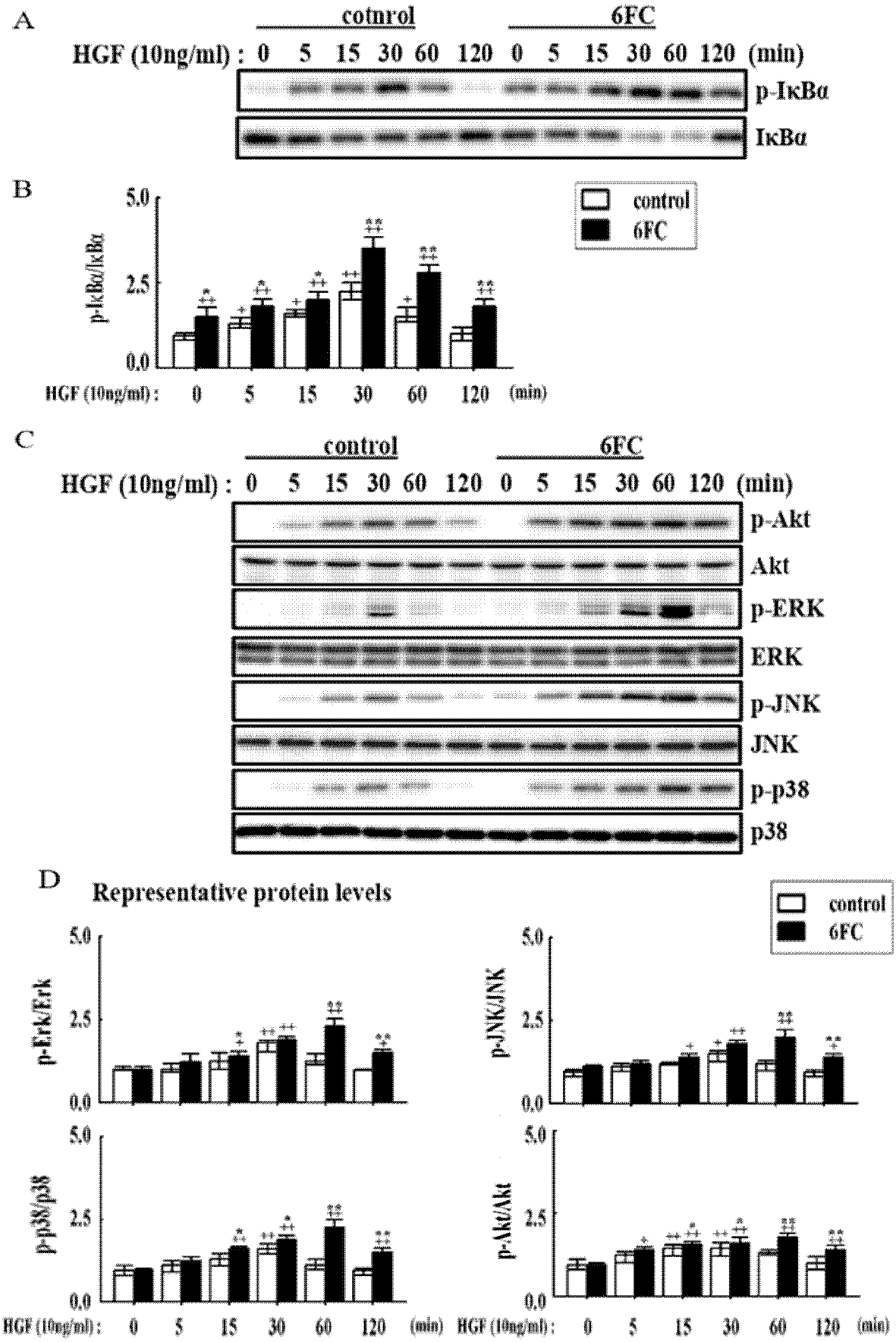
[도6]


mRNA levels
A
Immediate-early response genes
c-Jun
c-Fos
Time after PHx (h)
B
Growth factors and transcription factor
HGF
EGFR
C/EBP-β
NF-κB
IL-6
TGF-α

[도7]


A
vehicle
6FC
Sm
PHx : 0 24 48 72 0 24 48 72 0 24 48 72 (h)
p-Akt
Akt
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK
p-p38
p38
B
Representative protein levels
vehicle
6FC
silymarin
p-Akt/Akt
p-Erk/Erk
p-JNK/JNK
p-p38/p38
5.0
2.5
0.0
0
24
48
72
Time after PHx (h)

[도8]


A
cotnrol
6FC
HGF (10ng/ml) : 0 5 15 30 60 120 0 5 15 30 60 120 (min)
p-IκBα
IκBα
B
control
6FC
p-IκBα/IκBα
5.0
2.5
0.0
HGF (10ng/ml) : 0 5 15 30 60 120 (min)
C
control
6FC
HGF (10ng/ml) : 0 5 15 30 60 120 0 5 15 30 60 120 (min)
p-Akt
Akt
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK
p-p38
p38
D
Representative protein levels
control
6FC
p-Erk/Erk
p-JNK/JNK
p-p38/p38
p-Akt/Akt
5.0
2.5
0.0
HGF (10ng/ml) : 0 5 15 30 60 120 (min)
HGF (10ng/ml) : 0 5 15 30 60 120 (min)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/005207

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/7048(2006.01)i; **A61K 36/185**(2006.01)i; **A61P 1/16**(2006.01)i; **A23L 33/125**(2016.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/7048(2006.01); A61K 31/35(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), STN (Registry, Caplus), Google & keywords: 간 재생 (liver regeneration), 간 손상 (liver injury), 간 절제술 (hepatectomy), 카탈폴 (catalpol)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STUPPNER, H. et al. Minor iridoid and phenol glycosides of Picrorhiza kurrooa. Planta Medica. 1989, vol. 55, pp. 467-469. See abstract; page 469, left column, paragraph [0002]; and figure 1.	1,10
Y		2-9
Y	SAKSENA, S. et al. Effect of picroliv on regeneration of liver after partial hepatectomy in rats. Phytotherapy Research. 1995, vol. 9, pp. 518-521. See abstract.	2-7
Y	ISHII, T. et al. Hepatocyte growth factor stimulates liver regeneration and elevates blood protein level in normal and partially hepatectomized rats. The Journal of Biochemistry. 1995, vol. 117, pp. 1105-1112. See abstract.	8
Y	PIAZ, F. D. et al. A chemical–biological study reveals C9-type iridoids as novel Heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors. Journal of Medicinal Chemistry. 2013, vol. 56, pp. 1583-1595. See pages 1583 and 1588; and figure 1.	9

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 August 2021	**27 August 2021**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LU, Q. et al. Phytochemical composition, isolation and hepatoprotective activity of active fraction from Veronica ciliata against acetaminophen-induced acute liver injury via p62-Keap1-Nrf2 signaling pathway. Journal of Ethnopharmacology. 2019, vol. 243, 112089, pp. 1-15. See abstract; compound 15; page 2; and figure 1.	1,10
A	KR 10-0218052 B1 (CHOONGWAE PHARM. CO.) 01 September 1999 (1999-09-01) See entire document.	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2021/005207

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-0218052 B1	01 September 1999	CN 100047307 C	15 December 1999
		CN 100082895 A	02 March 1994
		DE 4323567 A1	20 January 1994
		DE 4323567 B4	07 December 2006
		IT 1264923 B1	17 October 1996
		IT MI931522 A1	16 January 1994
		JP 06-087740 A	29 March 1994
		JP 3571061 B2	29 September 2004
		KR 10-1994-0001886 A	16 February 1994
		US 5929038 A	27 July 1999

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/005207

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/7048(2006.01)i; **A61K 36/185**(2006.01)i; **A61P 1/16**(2006.01)i; **A23L 33/125**(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/7048(2006.01); A61K 31/35(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부검색 시스템), STN (Registry, Caplus), Google & 키워드: 간 재생 (liver regeneration), 간 손상 (liver injury), 간 절제술 (hepatectomy), 카탈폴 (catalpol)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y	STUPPNER, H. 등, "Minor iridoid and phenol glycosides of Picrorhiza kurrooa", Planta Medica, 1989, 55권, 페이지 467-469 초록; 페이지 469, 좌컬럼, 단락 2; 도면 1	1,10 2-9
Y	SAKSENA, S. 등, "Effect of picroliv on regeneration of liver after partial hepatectomy in rats", Phytotherapy Research, 1995, 9권, 페이지 518-521 초록	2-7
Y	ISHII, T. 등, "Hepatocyte growth factor stimulates liver regeneration and elevates blood protein level in normal and partially hepatectomized rats", The Journal of Biochemistry, 1995, 117권, 페이지 1105-1112 초록	8
Y	PIAZ, F. D. 등, "A chemical–biological study reveals C9-type iridoids as novel Heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors", Journal of Medicinal Chemistry, 2013, 56권, 페이지 1583-1595 페이지 1583, 1588; 도면 1	9
X	LU, Q. 등, "Phytochemical composition, isolation and hepatoprotective activity of active fraction from Veronica ciliata against acetaminophen-induced acute liver injury via p62-Keap1-Nrf2 signaling pathway", Journal of Ethnopharmacology, 2019, 243권, 112089, 페이지 1-15 초록; 화합물 15; 페이지 2; 도면 1	1,10

☑ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2021년08월27일(27.08.2021)	**2021년08월27일(27.08.2021)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관
대한민국 특허청 **(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)**	정다원
팩스 번호 **+82-42-481-8578**	전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/005207

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-0218052 B1 (주식회사중외제약) 1999.09.01 전문	1-10

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2021/005207

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-0218052 B1	1999/09/01	CN 100047307 C	1999/12/15
		CN 100082895 A	1994/03/02
		DE 4323567 A1	1994/01/20
		DE 4323567 B4	2006/12/07
		IT 1264923 B1	1996/10/17
		IT MI931522 A1	1994/01/16
		JP 06-087740 A	1994/03/29
		JP 3571061 B2	2004/09/29
		KR 10-1994-0001886 A	1994/02/16
		US 5929038 A	1999/07/27