(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0067749
(43) 공개일자 2022년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/216 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61K 36/74 (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/216 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2020-0154314
(22) 출원일자 2020년11월18일
심사청구일자 2021년10월06일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
(72) 발명자
양수근
인천광역시 연수구 컨벤시아대로42번길 35, 701동 1501호(송도동, 송도 더샵 그린애비뉴 7단지)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 8 항

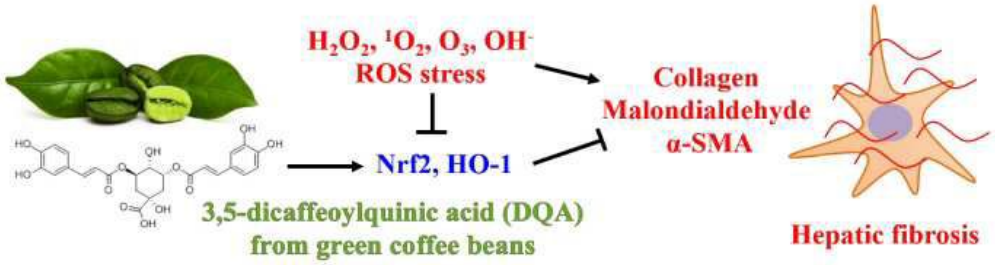
(54) 발명의 명칭 **간 섬유증 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 간 섬유증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 3,5-디카페올리퀴닉산(3,5-dicaffeoylquinic acid, DQA) 또는 이의 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 간 섬유증 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품 조성물을 제공한다.

상기 화합물 또는 이의 염은 우수한 항산화 및 항섬유화 활성을 가지고 기존의 폴리페놀 화합물 보다 우수한 경구 흡수율 및 생체 이용률을 가지므로, 보다 효과적으로 간 섬유증을 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
A61K 36/74 (2013.01)
A61P 1/16 (2018.01)
A61P 43/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711104429
과제번호 2019M3E5D1A02069623
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 혁신형의사과학자공동연구사업(R&D)
연구과제명 소화기암 타겟 치료자극 전달형 의료기기 및 치료자극 반응형 약물방출기능을 가진 내시경 기반 융합치료시스템 개발
기 여 율 40/100
과제수행기관명 인하대학교의과대학부속병원
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711116117
과제번호 2020R1A2B5B02002377
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 소화기암의 병기에 따른 항암 레지멘 및 면역 에티팅이 가능한 내시경기반 최소침습형 복합치료시스템의 설계 및 평가
기 여 율 30/100
과제수행기관명 인하대학교 산학협력단
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345315443
과제번호 2018R1A6A1A03025523
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 우주항공의학기반 다학제 응용의료기술 및 플랫폼기술 개발
기 여 율 30/100
과제수행기관명 인하대학교 산학협력단
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28

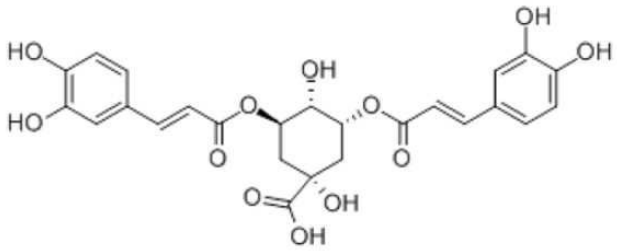
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 간 섬유증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 화합물 또는 이의 염은,

커피 생두 추출물에서 분리된 것을 특징으로 하는 간 섬유증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 화합물 또는 이의 염은,

간 섬유증에 의해 감소된 체중을 회복시키는 것을 특징으로 하는 간 섬유증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 화합물 또는 이의 염은,

간 손상에 의해 증가된 ALT(alanine amino transferase), AST(aspartate amino transferase), ALP(alkaline phosphatase) 및 빌리루빈(bilirubin)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 또는 둘 이상의 간 손상 인자의 발현을 감소시키고, 간 손상에 의해 감소된 알부민(albumin) 또는 총 단백질의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 간 섬유증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 화합물 또는 이의 염은,

섬유화 관련 인자인 α-평활근 액틴(α-SMA) 또는 α1 콜라겐 1형(COL1A1)의 발현을 감소시키며, 간 조직의 콜라겐 축적을 억제하는 것을 특징으로 하는 간 섬유증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 화합물 또는 이의 염은,

항산화 관련 인자인 Nrf2(Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 또는 HO-1(heme oxygenase-1)의 발현을 증가시키며, 산화 스트레스를 억제하는 것을 특징으로 하는 간 섬유증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

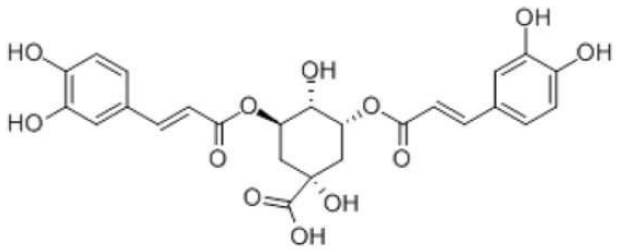
상기 간 섬유증은,

디메틸니트로사민(dimethylnitrosamine, DMN)에 의해 유발된 간 섬유증인 것을 특징으로 하는 간 섬유증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 간 섬유증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

[화학식 1]



발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 간 섬유증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 3,5-디카페올리퀴닉산(3,5-dicaffeoylquinic acid, DQA) 또는 이의 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 간 섬유증 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 슈퍼옥사이드(superoxide, $O2^{\bullet -}$), 퍼옥실(peroxyl, $ROO^{\bullet}$), 알콕실(alkoxyl, $RO^{\bullet}$), 하이드록실(hydroxyl, $HO^{\bullet}$) 및 산화질소(nitric oxide, $NO^{\bullet}$)와 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 체내 산소 대사 중에 생성된다. ROS는 구조에 쌍을 이루지 못한 전자를 가지며 다른 생분자와 크게 반응한다. ROS의 생물학적 반감기는 10^{-9}에서 수 초로 매우 짧지만, 체내에서 중요한 생물학적 역할을 담당한다. 특정 수준의 ROS가 세포의 산화환원 시스템에서 요구되지만, 항산화 시스템의 수용력을 초과하는 많은 양의 ROS는 세포 염증 반응 및 조직 손상을 유발한다. 세포의 항산화 능력을 넘어서는 ROS의 만성 노출은 결국 퇴행성 장기 부전으로 이어진다.

[0003] 간(liver)은 ROS 공격에 취약한 기관으로, 특히 만성 산화 스트레스 하에서 활성화되는 간성상세포(hepatic stellate cell)는 콜라겐 합성을 시작한다. 간 실질에 콜라겐이 과도하게 축적되면 불가역적인 간 섬유증(liver fibrosis), 간경변(hepatic cirrhosis) 및 때로는 원발성 간암으로 진행되며, 바이러스성 간염(viral hepatitis), 알콜성 간 질환 및 비알콜성 지방간 질환(NAFLD)은 항상 간 섬유화를 동반한다. 간 섬유화로 진행되는 대부분의 간 질환에서, ROS는 주도적인 역할을 하기에, ROS 소거는 섬유증 관련 간 질환을 위한 기본 치료 옵션으로 고려될 수 있다.

[0004] 신체의 자기 방어 항산화 시스템이 특히 만성 간 질환에서 과도한 산화 스트레스에 항상 대처하는 것은 아니다. 지금까지 섬유증 관련 간 질환의 치료를 위해 많은 항산화제가 선별되었다. 대부분의 항산화제는 한약에서 추출된 폴리페놀 화합물로, 폴리페놀은 간세포에서 과도한 ROS를 효율적으로 제거하고 산화환원 효소의 기능을 상향 조절하며, 여러 항산화 효소의 활성을 강화시킨다. 하지만 식이 폴리페놀의 치료 효능은 안정성과 용해도 문제가 있다. 대부분의 폴리페놀은 경구 투여 후 광범위하게 대사되어, 경구 생체 이용률이 5% 미만으로 너무 낮기

때문에 적절한 치료 혈중 농도를 달성할 수 없다.

[0005] 이에 경구 생체 이용률이 향상된 항산화제로서, 간 섬유증을 효과적으로 치료할 수 있는 치료제가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2019-0059494호 (2019.05.31. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

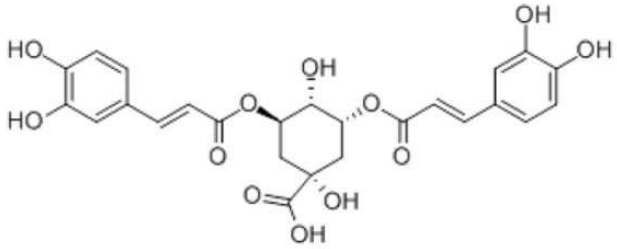
[0007] 본 발명의 목적은 경구 생체 이용률이 우수한 항산화 물질을 유효성분으로 포함하는 간 섬유증 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 간 섬유증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 간 섬유증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0010] [화학식 1]

[0011] 

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따른 화합물 또는 이의 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염은 우수한 항산화 및 항섬유화 활성을 가져, 산화 스트레스에 의한 간 손상을 억제하고 간 조직의 콜라겐 축적을 억제할 수 있다.

[0013] 상기 화합물 또는 이의 염은 기존의 폴리페놀 화합물에 비해 상대적으로 안정하여 기존의 폴리페놀 화합물 보다 경구 흡수율 및 생체 이용률이 우수하므로, 간 섬유증의 예방, 개선 또는 치료 효과가 보다 향상될 수 있다.

[0014] 또한, 상기와 같이 효과적으로 간 섬유증을 치료함으로써, 간 섬유증에 따른 간 기능의 저하, 간 섬유증의 지속화로 인한 간경변 또는 간암으로의 발전을 미리 예방할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명의 일 실험예에 따른 3,5-디카페올리퀴닉산(3,5-dicaffeoylquinic acid, DQA) 및 이의 세포 독성 실험 결과를 나타낸 그래프로, A는 DQA의 화학 구조이고, B는 WST-1 분석을 이용한 인간 간암 세포 및 인간 간세포에 대한 세포 독성 평가 결과이다. 상기 결과는 3번의 독립적인 실험의 평균 ± SD로 나타내었다.

도 2는 본 발명의 일 실험예에서 DQA 처리에 따른 DMN 유도 간 손상 래트의 체중 및 간 무게 변화를 나타낸 그래프로, A는 4주의 처리 기간 동안 측정된 체중 변화 그래프, B는 DQA 처리 4주 후에 평가된 전체 간 무게 및 상대 간 무게(체중의 백분율로 표시)를 나타낸다 (*P < 0.1 및 **P < 0.05; DMN group versus DMN+DQA group).

도 3은 본 발명의 일 실험예에서 DQA 처리에 따른 혈청 효소 수준 변화를 나타낸 그래프로, DQA 처리 4주 후에

혈청 ALT, AST, ALP, 총 빌리루빈(total bilirubin, T-bilirubin), 알부민, 및 총 단백질을 측정하였다 (**P < 0.05 및 *** P < 0.01; DMN group versus DMN+DQA group).

도 4는 본 발명의 일 실험예에서 DQA 처리에 따른 간 조직의 조직학적 변화를 나타낸 것으로, A는 헤마톡실린-에오신(H&E) 및 Masson's trichrome (MT)로 염색된 래트 간 조직 이미지, B는 래트 간 조직의 α-SMA의 면역조직학적 관찰 이미지, C 및 D는 각각 하이드록시프롤린(HP) 및 말론디알데하이드(MDA) 측정 그래프이다. 상기 데이터는 3번의 독립적인 실험의 평균 ± SD로 나타내었고, 흰색 및 노란색 막대는 각각 200㎛ 및 100㎛을 의미한다 (*P < 0.1 및 **P < 0.05; DMN group versus DMN+DQA group).

도 5는 본 발명의 일 실험예에서 DQA 처리에 따른 간 조직의 콜라겐 및 항산화 효소 수준의 변화를 나타낸 것으로, A 및 B는 α-평활근 액틴(α-SMA), α1 콜라겐 1형(COL1A1), 및 항산화 효소 Nrf2의 mRNA 발현 수준을 평가한 것이며, C 및 D는 Nrf2, 헴 옥시게나제-1(HO-1) 및 α-SMA의 단백질 수준을 평가한 것이다 (**P < 0.05 및 ***P < 0.01; DMN group versus DMN+DQA group).

도 6은 산화 스트레스 관련 간 섬유증에서 DQA의 Nrf2/HO-1 유도 예방 효과를 개략적으로 나타낸 것이다.

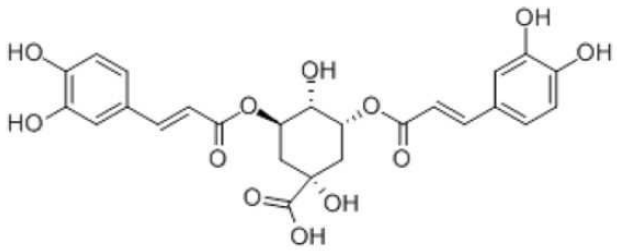
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명을 상세하게 설명하기로 한다.

[0018] 본 발명자는 커피 생두 추출물로부터 분리한 화합물이 디메틸니트로사민(dimethylnitrosamine, DMN)에 의해 유발된 간 섬유증 래트 모델에서 항산화, 항 섬유화 효과 등을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0020] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 간 섬유증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0021] [화학식 1]

[0022] 

[0024] 상기 화합물 또는 이의 염은 당업계에서 잘 알려진 방법으로 분리 또는 추출되거나 화학적 합성법에 의해 제조될 수 있으며, 시판중인 것을 선택하여 사용할 수 있으나, 그 방법 또는 물질은 특별히 한정되지 않는다.

[0025] 바람직하게는, 상기 화합물 또는 이의 염은 커피 생두(green coffee bean)의 추출물에서 분리된 것으로, 3,5-디카페올리퀴닉산(3,5-dicaffeoylquinic acid, DQA) 또는 (3R,5R)-3,5-비스[[(E)-3-(3,4-디하이드록시페닐)프로프-2-에노일]옥시]-1,4-디하이드록시사이클로헥센-1-카르복실산[(3R,5R)-3,5-bis[[(E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxy]-1,4-dihydroxycyclohexane-1-carboxylic acid]로 명명될 수 있다.

[0027] 상기 화합물은 이와 동일한 효능을 갖는 범위 내에서 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있다.

[0028] 본 명세서에서, "약학적 또는 식품학적으로 허용가능한"이란, 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없어, 인간에게 투여하기에 적합한 안전성 및 효능 프로파일을 갖는 염을 의미한다.

[0029] 상기 염은 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염기성 염 또는 산성염 중 어느 하나의 형태로 사용할 수 있다. 염기성염은 유기 염기염, 무기 염기염 중 어느 하나의 형태로 사용할 수 있으며, 나트륨염, 칼륨염, 칼슘

염, 리튬염, 마그네슘염, 세슘염, 아미늄염, 암모늄염, 트리에칠아미늄염 및 피리디늄염으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0030] 산성염은 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산, 이중 인산, 질산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레산, 말산, 퓨마르산, 글루코산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 캠퍼설폰산, 옥살산, 말론산, 글루타릭산, 아세트산, 글리콘산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산, 아스파르탄산, 스테아르산 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에서 통상적으로 사용되는 다양한 무기산 및 유기산을 이용하여 형성되는 염이 모두 포함될 수 있다.

[0031] 또한, 상기 화합물은 상기 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물, 용매화물, 유도체 등을 모두 포함할 수 있다. 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있고, 수혼화성 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세토니트릴 등에 녹여 과량의 유기염기를 가하거나 무기염기의 염기 수용액을 가한 후 침전시키거나 결정화시켜서 제조할 수 있다. 또는 이 혼합물에서 용매나 과량의 염기를 증발시킨 후 건조시켜서 부가염을 얻거나 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 염은 산화 스트레스 등에 의한 간 손상, 이에 따른 콜라겐 축적 등을 억제하여 간 섬유증을 예방 또는 치료할 수 있고, 간 섬유증에 의해 감소된 체중을 회복시킬 수 있다.

[0034] 본 발명의 일 실험예에 따르면, 디메틸니트로사민(dimethylnitrosamine, DMN)에 의해 간 섬유증이 유도된 래트 모델에서 섬유증 정량적 지표인 하이드록시프롤린(hydroxyproline, HP)과 산화 스트레스로 인한 지질 과산화의 주요 부산물인 말론디알데하이드(malondialdehyde, MDA)가 현저히 증가하여 간 손상이 일어났음을 확인하였고, 이에 DQA를 처리한 경우, 증가된 HP 및 MDA가 유의적으로 감소하여 간 손상이 회복됨을 확인할 수 있었다.

[0036] 보다 상세하게는, 상기 화합물 또는 이의 염은 간 손상에 의해 증가된 혈청 생화학적 마커, 예를 들어, 알라닌 아미노 트랜스퍼라제(alanine amino transferase, ALT), 아스파르테이트 아미노 트랜스퍼라제(aspartate amino transferase, AST), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP) 및 빌리루빈(bilirubin)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 또는 둘 이상의 발현을 감소시키고, 간 손상에 의해 감소된 알부민(albumin) 또는 총 단백질의 발현을 증가시킬 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 실험예에 따르면, DMN에 의해 간 섬유증이 유도된 래트 모델에서 간 손상 마커인 ALT, AST, ALP, 빌리루빈 등이 현저히 증가하였으나, DQA 처리에 의해 감소되어 정상 범위로 유지되었고, DMN에 의해 감소된 알부민 및 총 단백질은 DQA 처리에 의해 정상 범위로 회복됨을 확인할 수 있었다.

[0039] 상기 화합물 또는 이의 염은 섬유화 관련 인자의 발현을 감소시킬 수 있고, 간 조직의 섬유성 변성 또는 콜라겐 축적을 억제할 수 있다. 상기 섬유화 관련 인자는 α-평활근 액틴(α-smooth muscle actin, α-SMA) 또는 α1 콜라겐 1형(α-1 collagen type I, COL1A1)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명의 일 실험예에 따르면, DMN 처리에 의해 증가된 α-SMA 또는 COL1A1의 발현이 DQA 처리에 의해 감소됨을 확인할 수 있었다.

[0042] 또한, 상기 화합물 또는 이의 염은 기존의 폴리페놀 화합물보다 안정하여 경구 흡수율 또는 생체 이용률이 향상될 수 있으며, 보다 우수한 항산화 활성을 가질 수 있다. 상기 화합물 또는 이의 염은 항산화 관련 인자의 발현을 증가시키고, 간 섬유증의 주요 원인이 되는 산화 스트레스를 억제할 수 있다. 상기 항산화 관련 인자는 핵인자 적혈구 2 관련 인자 2(Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 또는 헴 옥시게나제-1(heme oxygenase-1, HO-1)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 본 발명의 일 실험예에 따르면, DMN 처리에 의해 발현이 감소된 Nrf2 또는 HO-1이 DQA 처리에 의해 상향 조절됨을 확인할 수 있었다.

[0044] 이에, 상기 화합물 또는 이의 염은 간 섬유증의 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물로 사용될 수 있다.

[0046] 본 명세서에 있어서, 상기 "간 섬유증(liver fibrosis)"는 만성 간 내 염증으로 인한 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 과다한 침착으로 정의될 수 있다. 만성 간 질환에 수반되는 생체 적응 반응의 일부로서 손상된 간 조직이 정상적인 간세포로 복구되는 것이 아니라, 콜라겐과 같은 섬유조직으로 변형되는 상태를 말하며, 생체 적응 반응이지만 생체 내 물질의 대사, 담즙 분비 등 간의 고유 기능을 전혀 수행할 수 없는 섬유조직으로 간이 대체된다는 점에서 간 기능의 저하가 필연적으로 나타난다. 이러한 세포외 기질의 과다한 침착으로 만성 간 질환이 지속되는 경우 간 내 구조의 변형과 간세포수의 감소로 간경변 또는 간암으로 진행될 수 있다.

[0047] 상기 간 섬유증은 산화 스트레스에 의한 간 손상에 의해 발병되는 것일 수 있고, 간염, 알코올성 간염, 비알코올성 지방 간염 등 다양한 간 질환에 동반되어 나타날 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 바람직하게는 상기 간 섬유증은 디메틸니트로사민(dimethylnitrosamine, DMN)에 의해 유발된 간 섬유증일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 약학 조성물은 제형에 따라 약학적으로 허용가능한 적절한 담체와 배합될 수 있고, 필요에 따라, 부형제, 희석제, 분산제, 유화제, 완충제, 안정제, 결합제, 붕해제, 용제 등을 더 포함하여 제조될 수 있다. 상기 적절한 담체 등은 본 발명에 따른 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 활성 및 특성을 저해하지 않는 것으로, 투여 형태 및 제형에 따라 달리 선택될 수 있다.

[0051] 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제, 희석제 등으로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0053] 본 발명에 따른 약학 조성물은 어떠한 제형으로도 적용될 수 있고, 상세하게는 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여에 적합한 단위투여형의 제제로 제형화시켜 사용될 수 있다.

[0054] 보다 상세하게는, 상기 경구형 제형 중 고형 제형은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등의 형태로, 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스, 솔비톨, 만니톨, 셀룰로오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있고, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 포함될 수 있다. 또한, 캡술제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 포함할 수 있다.

[0055] 상기 경구형 제형 중 액상 제형은 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.

[0056] 상기 비경구 제형은 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 주사제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 이에 제한되지 않고, 당업계에 널리 공지된 적합한 제제를 모두 사용 가능하다.

[0058] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 치료 효능의 증진을 위해 항산화제를 더 첨가할 수 있다. 상기 항산화제로는 티아민(thiamin, 비타민 B1), 리보플라빈(riboflavin, 비타민 B2), 나이아신(niacin, 비타민 B3), 판토펜산

(pantothenic acid, 비타민 B5), 피리독신(pyridoxine, 비타민 B6) 및 코발라민(cobalamin, 비타민 B12) 등의 비타민 B군의 화합물과 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않고, 당업계에 널리 공지된 적합한 제제를 모두 사용 가능하다.

[0060] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다.

[0061] 본 명세서에서, "약학적으로 유효한 양"이란, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다.

[0062] 상기 약학 조성물의 유효 용량 수준은 사용 목적, 환자의 연령, 성별, 체중 및 건강 상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 달리 결정될 수 있다. 예를 들어, 일정하지는 않지만 일반적으로 0.001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 10mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여될 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

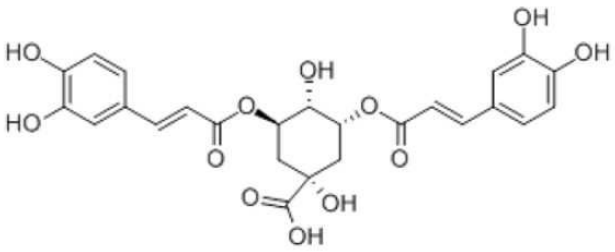
[0064] 본 발명에 따른 약학 조성물은 간 섬유증이 발생할 수 있는 임의의 동물에 투여될 수 있고, 상기 동물은 예를 들어, 인간 및 영장류뿐만 아니라 소, 돼지, 말, 개 등의 가축 등을 포함할 수 있다.

[0065] 상기 약학 조성물은 제제 형태에 따른 적당한 투여 경로로 투여될 수 있고, 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다. 투여 방법은 특히 한정할 필요 없이, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피부 도포, 호흡기내 흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 등의 통상적인 방법으로 투여될 수 있다.

[0066] 본 발명에 따른 약학 조성물은 간 섬유증의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로 사용될 수 있고, 수술 또는 다른 약물 치료 등과 병용하여 사용될 수 있다.

[0068] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 간 섬유증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0069] [화학식 1]

[0070] 

[0072] 상기 화합물 또는 이의 염은 산화 스트레스 등에 의한 간 손상, 이에 따른 콜라겐 축적 등을 억제하여 간 섬유증을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0073] 보다 상세하게는 상기 화합물 또는 이의 염은 간 손상에 의해 증가된 ALT, AST, ALP 및 빌리루빈으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 또는 둘 이상의 발현을 감소시키고, 간 손상에 의해 감소된 알부민 또는 총 단백질의 발현을 증가시켜 정상 범위로 회복시킬 수 있으며, 상기 화합물 또는 이의 염은 α-SMA 또는 COL1A1 등의 섬유화 관련 인자의 발현을 감소시킬 수 있고, 간 조직의 섬유성 변성 또는 콜라겐 축적을 억제할 수 있다.

[0074] 또한, 상기 화합물 또는 이의 염은 기존의 폴리페놀 화합물보다 안정하여 경구 흡수율 또는 생체 이용률이 향상될 수 있으며, 보다 우수한 항산화 활성을 가질 수 있다. 상기 화합물 또는 이의 염은 Nrf2 또는 HO-1 등의 항산화 관련 인자의 발현을 증가시키고, 간 섬유증의 주요 원인이 되는 산화 스트레스를 억제할 수 있다.

[0075] 이에, 상기 화합물 또는 이의 염은 간 섬유증의 예방 또는 개선을 위한 건강기능식품 조성물로 사용될 수 있다.

[0076] 이에 상응하는 특징들은 상술된 부분에서 대신할 수 있다.

[0078] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 건강기능식품은 간 섬유증의 예방 또는 개선 목적으로, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료 등으로 제조될 수 있다. 상기 건강기능식품이 취할 수 있는 형태에는 제한이 없으며, 상기 약학 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가될 수 있다.

[0079] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 건강기능식품은 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, 음료 및 각종 드링크, 과실 및 그의 가공식품(과일통조림, 잼 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(햄, 베이컨 등), 빵류 및 면류, 쿠키 및 스낵류, 유제품(버터, 치즈 등) 등이 가능하며, 통상적인 의미에서의 기능성 식품을 모두 포함할 수 있다. 또한 동물을 위한 사료로 이용되는 식품도 포함할 수 있다.

[0081] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 식품학적으로 허용가능한 식품 첨가제(식품 첨가물) 및 적절한 기타 보조 성분을 더 포함하여 제조될 수 있다. 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정할 수 있다. 상기 '식품첨가물공전'에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.

[0082] 상기 기타 보조 성분은 예를 들어, 향미제, 천연 탄수화물, 감미제, 비타민, 전해질, 착색제, 펙트산, 알긴산, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다. 특히, 상기 천연 탄수화물로는 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜을 사용할 수 있으며, 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0084] 본 발명에 따른 건강기능식품에 함유된 상기 화합물 또는 이의 염의 유효용량은 간 섬유증 예방 또는 개선 등 그 사용 목적에 따라 적절하게 조절될 수 있다.

[0085] 상기 건강기능식품 조성물은 식품을 원료로 하여 일반 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 간 섬유증 예방 또는 개선을 위한 보조제로 섭취될 수 있다.

[0087] 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.

[0089] **<실험방법>**

[0090] 1. 실험재료

[0091] 둘베코 수정이글배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM), 트립신-에틸렌디아민테트라아세트산(trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 디나트륨 염, 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 페니실린(penicillin), 및 스트렙토마이신(streptomycin)은 Gibco BRL (Paisley, Scotland, UK)로부터 구입하였고, 디메틸니트로사민(dimethylnitrosamine, N-nitrosodimethylamine; DMN), 3,5-디카페올리퀴닉산(3,5-dicaffeoylquinic acid, DQA), 및 하이드록시프롤린(hydroxyproline)은 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

[0093] 2. DQA의 세포 독성 측정

[0094] Huh7 세포 (인간 간암 세포) 및 Chang 간세포 (인간 간세포 유래 세포)는 American Type Culture Collection (Manassas, VA)로부터 수득하여 10% 소태아혈청 (Gibco), 및 1% 페니실린/1% 스트렙토마이신이 함유된 DMEM 배지에서 성장시켰다.

[0095] 세포 독성 분석을 위해, 세포는 96 웰 배양 플레이트에 0.2 mL의 배양 배지 내 1×10^{3} cells/well로 접종되었다. 37℃에서 24시간 배양시킨 후, 배지는 0.2 mL의 다른 농도의 DQA로 교체되어 72시간 더 배양되었다. 세포 생존율은 EZcytox assay kits (Daeil Lab Service, Chungcheongbuk-do, Korea)를 사용하여 측정되었다. UV 흡광도는 450 nm에서 Infinite M200 micro-plate reader (Tecan, Zurich, Switzerland)를 사용하여 측정되었다.

[0097] 3. DMN-유도 간 섬유증 래트 모델

[0098] 모든 동물 실험은 실험실 동물 관리에 대한 국립보건원 지침에 따라 인하대학교의 동물 관리 및 사용 위원회 (IACUC)에 의해 승인받았다. 200-240g의 수컷 Sprague-Dawley rats를 Orient-Bio Co. (Gyeonggi-do, Korea)로부터 구입하였다. 래트는 먹이와 물에 무제한으로 접근할 수 있으며, 25℃, 12시간의 광주기 하에서 기존 케이지에 보관되었다.

[0099] 12 마리의 래트를 4개의 그룹으로 나누었다. 대조군 래트는 부형제(vehicle)만을 주입하였다. 간 섬유증의 유도를 위해 DMN을 체중 100g 당 1 mL (0.15 M 멸균 NaCl로 1:100으로 희석) 용량으로 래트에 복강 내 주사하였다. 주사는 4주 동안 매주 3일 연속으로 제공되었다. DQA-처리된 군은 DQA 100 mg/kg을 4주 동안 주 3회 경구 투여받았다.

[0100] 4주가 끝날 무렵, 래트는 마취하에 희생시켜 간 조직을 회수하여 무게를 측정하였다. 혈액 샘플은 심장 천자 (cardiac puncture)에 의해 수집되었고, 혈청 샘플은 혈액 샘플을 4℃에서 3,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 회수하였다. 조직화학 분석을 위해 간 표본은 즉시 10% 중성 완충 포름알데히드에 고정시켰고, 다른 연구를 위해 혈청 및 간 조직 샘플은 -80℃에 보관하였다.

[0102] 4. 혈청 효소 바이오마커의 측정

[0103] 혈청 샘플은 4℃에서 1800 g (RCF)로 15분간 원심분리에 의해 전혈로부터 분리되었다. 혈청 알라닌 아미노 트랜스퍼라제(alanine amino transferase, ALT), 아스파르테이트 아미노 트랜스퍼라제(aspartate amino transferase, AST), 총 단백질, 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP), 총 빌리루빈(total bilirubin, T-bilirubin), 직접 빌리루빈(direct bilirubin, D-bilirubin), 및 알부민(albumin)이 Green Cross Labcell (Gyeonggi-do, Korea)에 의해 분석되었다.

[0105] 5. 간 말론디알데하이드(malondialdehyde) 수준 측정

[0106] 말론디알데하이드(Malondialdehyde, MDA)는 산화 스트레스로 인한 지질 과산화의 주요 부산물이다. 간 조직의 MDA 수준은 Bioxytech MDA-586 Assay Kit (OxisResearchTM, Portland, OR)를 이용하여 측정되었다. 간단히 말하면, 간 조직은 부틸화 하이드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene)과 혼합한 후 균질화하고, 상층액을 모아 N-메틸-2-페닐인돌(N-methyl-2-phenylindole)로 반응시켰다. MDA와 N-메틸-2-페닐인돌 사이의 반응에 의해 생성된 카보시아닌(carbocyanine) 염료의 양은 586 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다 (Infinite M200, Tecan, Switzerland). 단백질 농도는 Protein Assay Kits (Pierce Biotechnology,Waltham, MA)를 사용하여 결정하였고, MDA 수준은 조직 단백질 수준에 대해 표준화되었다 (nmol/mg).

[0108] 6. 간 하이드록시프롤린(hydroxyproline) 수준 측정

[0109] 간 조직에서 콜라겐 총량은 조직의 하이드록시프롤린(콜라겐의 주요 아미노산 성분) 함량을 측정하여 결정하였다. 간단히 말하면, 간 조직은 1.0 mL의 6 N HCl로 균질화시킨 다음, 균질화된 간 샘플은 120℃에서 20분 동안 오토클레이브하여 콜라겐을 구성 아미노산으로 가수 분해하였다. 샘플은 진공 오븐(65℃에서 2일)에서 증발 건

조시켰고, 수득한 건조 펠렛은 1.0 mL의 1.0 mM HCl에서 재현탁시키고 1분 동안 볼텍싱하였다.

[0110] 표준물질 또는 샘플(50㎕)을 1.5 mL 원심분리 튜브로 옮겨 450㎕의 클로라민 T(chloramine T)와 혼합한 뒤, 30초 볼텍싱하고 실온에서 25분 동안 둔 다음, Ehrlich's 시약(500㎕)으로 60℃에서 20분간 반응시켰다. 샘플의 흡광도는 558 nm에서 spectrophotometer를 사용하여 측정되었다. 트랜스-4-하이드록시-L-프롤린(Trans-4-hydroxy-L-proline)이 표준물질로 사용되었다.

[0112] 7. 섬유화 관련 유전자 판단을 위한 RT-PCR

[0113] RNA는 Trizol® solution (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 동결된 래트 간 조직으로부터 분리되었다.

[0114] 단일 가닥 cDNA는 제조사의 지침에 따라 역전사 시스템 (Promega, Madison, WI)을 사용하여 1㎍의 총 RNA로부터 제조되었다. cDNA는 1xPCR 반응 완충액, 200㎛M dNTPs, 0.5 pmol의 각 유전자에 대한 특이적 프라이머 및 1 unit의 Taq DNA 폴리머라제 (TaKaRa Biotech, Shiga, Japan)를 포함하는 25㎕ 반응 용량에서 PCR에 의해 증폭되었다. GAPDH는 DNA 합성 및 PCR 증폭을 위한 참조 유전자로 사용되었다. 프라이머 세트는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)로 부터 구입하였다.

[0116] 8. 간 조직의 웨스턴 블롯 분석

[0117] 간 조직은 프로테아제 억제제를 포함하는 방사성 면역침전 분석 버퍼에서 균질화하고 조직 균질물은 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 단백질을 수득하였다. 단백질 농도는 비신코닌산(bicinchoninic acid) 기반 방법을 사용하여 결정하였다. 간 단백질(40㎍)은 2D 10% SDS-PAGE에 의해 분리되었고, 분리된 단백질은 0.2㎛m 니트로셀룰로오스 막 (Schleicher & Schuell, Middlesex, UK) 위로 옮겨졌다. 블롯은 PBS의 5% skim milk에서 블로킹되고 1차 항체와 배양된 후 2차 항체와 접합되었으며, 화학발광 시약 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)으로 염색되었다. 1차 항체는 mouse monoclonal anti α-SMA (Abcam, Cambridge, UK), rabbit polyclonal anti-Nrf2, anti HO-1 및 β-actin (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX)이고, 2차 항체는 Cell Signaling Technologies (Danvers, MA)로부터 구입하였다.

[0119] 9. 조직학 연구

[0120] 간 표본은 10% 완충 포름알데히드에 18 내지 24시간 동안 고정시키고, 파라핀에 포매한 후 절편화하였다. 탈파라핀화 및 수화 후, 표본은 현미경 관찰 (Axio Vert, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany)을 위해 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin, H&E) 및 Masson's trichrome (MT)으로 염색시켰다.

[0121] 조직 내 α-SMA의 평가를 위해 면역 조직 화학 염색을 수행하였다. 1차 항체는 anti α-SMA (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX)를 사용하였다. Alexa Fluor® 555-접합된 2차 항체는 fluorescence microscopy (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany)를 위해 사용되었다.

[0123] 10. 통계 분석

[0124] student t-test는 차이의 중요성을 결정하는데 사용되었고, 결과는 평균 ± 표준 편차(STD)로 나타내었다.

[0126] **<실험결과>**

[0127] **1. 항산화제 DQA의 세포 독성 확인**

[0128] 커피 생두 추출물의 주요 성분 중 하나인 DQA는 도 1A와 같이 화학적으로 에스테르 결합을 통해 퀴닉산(quinic acid)에 의해 연결된 두 개의 카페익산(caffeic acid) 분자로 구성된다.

[0129] 먼저, Huh7 및 Chang 간세포에서 DQA의 세포 독성을 관찰한 결과, 도 1B와 같이, DQA는 10㎍/mL 이하의 농도에서 인간 간암 세포 또는 Chang 간세포에 대해 어떠한 유의미한 세포 독성도 나타내지 않았다.

[0131] **2. 체중 및 혈청 효소 수준에 대한 DQA의 영향 확인**

[0132] 이를 확인하기 위해, DQA는 4주 동안 주 3회 경구 투여되었고, DMN은 동일한 4주 동안 주당 연속 3일 복강 내 주사되었다.

[0133] 4주 동안 DQA의 경구 투여 래트의 물리적 및 혈청 생화학적 관찰을 통해 DQA의 안정성을 관찰한 결과, 도 2A와 같이, 비처리 대조군(control) 및 DMN 처리군(DMN)과 각각 비교했을 때, DQA 처리군(DQA) 및 DQA+DMN 처리군(DMN+DQA)에서 체중이 약간 증가하는 것으로 나타났다.

[0134] 도 2B를 참조하면, 간 무게의 변화 역시 체중 변화와 동일한 패턴을 나타냈으며, DMN 처리군 및 DQA+DMN 처리군에서 상대적인 간 무게(간 무게/최종 체중)이 각각 2.95% 및 3.39%로 확인되었다 ($P < 0.1$).

[0135] 이러한 결과는 DQA가 DMN 유발 간 손상에서 간 무게뿐만 아니라 체중의 회복에도 도움이 됨을 의미한다.

[0137] 또한, 혈청 ALT, AST, ALP, T-빌리루빈, 및 알부민의 수준 측정을 통해 DMN 유도 간 손상에서 DQA의 보호 효과를 평가한 결과, 도 3과 같이 DMN은 대조군에 비해 ALT, AST, ALP, 및 T-빌리루빈의 수준을 현저하게 증가시켰다. 그러나 이 수준은 DQA를 처리했을 때 회복되었다. 반대로, 혈장 단백질 수준(알부민)은 DMN 처리 후 감소하였으나, DQA 처리 후 회복되었다.

[0139] **3. 간 조직의 섬유 변형에 대한 DQA의 영향 확인**

[0140] H&E 및 Masson's trichrome (MT)로 염색된 래트 간은 도 4A의 노란색 화살표와 같이, DMN 처리군에서 광범위한 콜라겐 축적을 보여주었다.

[0141] 대조군 간은 중앙 정맥 및 방사성 간 코드를 가진 정상적인 소엽(lobular) 구조를 보여준 반면, DMN 처리 래트의 간은 섬유성 격막의 뚜렷한 조직화 패턴, 퇴행된 간세포의 유사 소엽으로의 통합, 및 대조군 간 보다 높은 콜라겐 함량을 보여주었다. DQA+DMN 처리는 간 섬유화 정도를 현저하게 완화시켰고 콜라겐 침착을 유의하게 감소시켰다.

[0142] 간에서 총 콜라겐은 간의 하이드록시프롤린 수준(섬유화 정량적 지표) 측정을 통해 평가되었다. 도 4C를 참조하면, DMN 처리군의 하이드록시프롤린 함량은 대조군에 비해 상당히 높았으며, DMN 매개로 증가한 간 하이드록시프롤린은 DQA+DMN 처리군에서 억제되었다. 이 결과는 DQA가 DMN 유도 간 콜라겐 침착을 약화시켰음을 보여준다.

[0143] 도 4D를 참조하면, DMN 군에서 간 조직의 MDA 함량은 대조군에 비해 유의적으로 높았으나, DQA+DMN 처리로 DMN 유도 MDA가 억제되었다.

[0144] 간 조직에서 MDA 및 하이드록시프롤린의 측정된 수준은 간 변형의 주요 원인이 산화 스트레스임을 시사한다. DMN의 투여가 산화 스트레스를 유발하고, 생성된 ROS는 고도 불포화 지질과 반응하여 지질 과산화의 독성 생성물인 MDA를 형성한다. 마지막으로, MDA는 간 조직의 섬유성 변형을 일으킨다.

[0146] **4. α-SMA, Type 1 collagen, Nrf2 및 HO-1에 대한 DQA의 영향 확인**

[0147] 간 조직에서 간 섬유화 관련 인자(예를 들어, 1형 콜라겐 및 α-SMA) 및 항산화 효소(예를 들어, Nrf2 및 HO-1)의 발현에 대한 DQA의 영향을 RT-PCR, 웨스턴 블롯 및 면역 형광 분석으로 평가하였다.

[0148] 먼저, α-평활근 액틴(α-SMA) 및 α1 콜라겐 1형(COL1A1)에 대한 특이적 단편은 RT-PCR에 의해 증폭되었고, 농도계 분석의 결과는 해당 GAPDH 전사체에 대해 정규화되었다. 그 결과, 도 5A 및 5B와 같이 DMN 처리군에서 α-SMA 및 COL1A1의 간 발현은 각각 170.3% 및 121.1%로, 대조군보다 더 높게 나타났다. 그러나 DQA (100 mg/kg)를 더 처리한 경우, DMN 처리군에 비해 α-SMA 및 COL1A1의 mRNA 발현이 각각 12.6% 및 97.2%의 감소를 보였다 ($p < 0.001$). Nrf2의 상대적인 mRNA 발현은 DMN 처리군의 9.37%에서 DMN+DQA 처리군의 64.9%로 증가하였다.

[0149] 이러한 결과는 COL1A1 및 α-SMA의 mRNA 발현이 DMN 주입 후 상승하는 반면, DQA의 경구 투여는 간 섬유화 관련 인자의 상승을 차단함을 명백하게 보여준다.

[0150] 또한, 면역 형광 분석은 도 4B와 같이, DMN 처리군의 α-SMA 발현 수준과 비교하여 DMN+DQA 처리가 α-SMA의 발

현 수준을 현저하게 억제함을 증명하였다.

[0152] 간 섬유성 격막에서 α-SMA, Nrf2 및 HO-1의 단백질 발현을 관찰한 결과, 도 5C 및 5D와 같이, 전체 간 용해물에서 DQA는 α-SMA의 발현을 감소시키고 Nrf2의 발현을 증가시켰다. DMN 처리군에서 α-SMA 단백질 수준은 대조군보다 115% 더 높았고 ($P < 0.1$), DMN+DQA 처리군에서는 DMN 처리군보다 16% 더 낮았다 ($p < 0.05$). Nrf2 단백질 수준은 DQA 처리에 의해 증가되었다. DMN+DQA 처리군의 Nrf2 수준은 DMN 처리군보다 116% 더 높았다 ($p < 0.1$). 이에 따라, DMN+DQA 처리군에서 HO-1 수준은 DMN 처리군에 비해 311.0%로 증가되었다.

[0153] DQA에 의한 Nrf2의 유도 메커니즘은 완전히 입증되지 않았지만, 일반적으로 Nrf2은 헴 옥시게나제-1(heme oxygenase-1, HO-1), NAD(P)H 퀴논 디하이드로게나제 1(NAD(P)H quinone dehydrogenase 1, NQO1), 슈퍼옥사이드 디스무타제(superoxide dismutase, SOD), 및 글루타치온 S-트랜스퍼라제 패밀리(glutathione S-transferase family)와 같은 항산화 효소를 상향 조절하고 ROS에 의한 지질 과산화 및 그에 따른 섬유화를 보호하는 것으로 보고되어있어, DQA의 항산화 효과도 이와 동일한 메커니즘을 따른다고 가정하였다.

[0155] **5. 항산화 효과를 위한 폴리페놀 및 DQA**

[0156] 폴리페놀은 단일 또는 다중 방향족 고리에 하나 또는 그 이상의 하이드록실기를 가진 유비쿼터스 2차 식물 대사산물로 분류된다. 폴리페놀은 다중 항산화 효소의 활성을 상향 조절하고, 세포에서 넘치는 ROS를 중화시켜 항산화 활성을 나타낸다. 그러나 식이 폴리페놀은 경구 투여 후 엄청난 분해를 겪어, 이의 항산화제로서의 치료적 활성에 항상 의문이 있다.

[0157] 예를 들어, 갈릭산(gallic acid) 및 이소플라본(isoflavones)의 생체 이용률은 대략 5%에 불과하며, 다른 플라반-3-올(flavan-3-ol; a catechin), 플라바논(flavanone) 및 퀘르세틴(quercetin)은 5% 보다 낮은 생체 이용률을 보여준다. 게다가, 커큐민(curcumin)과 같은 일부 폴리페놀은 용해도가 낮아 경구 흡수가 심각하게 제한되며, 프로안토시아니딘(proanthocyanidins), 갈로일화 티 카테킨(galloylated tea catechins), 및 안토시아닌(anthocyanins)의 치료 효능은 낮은 경구 흡수로 인해 제한된다.

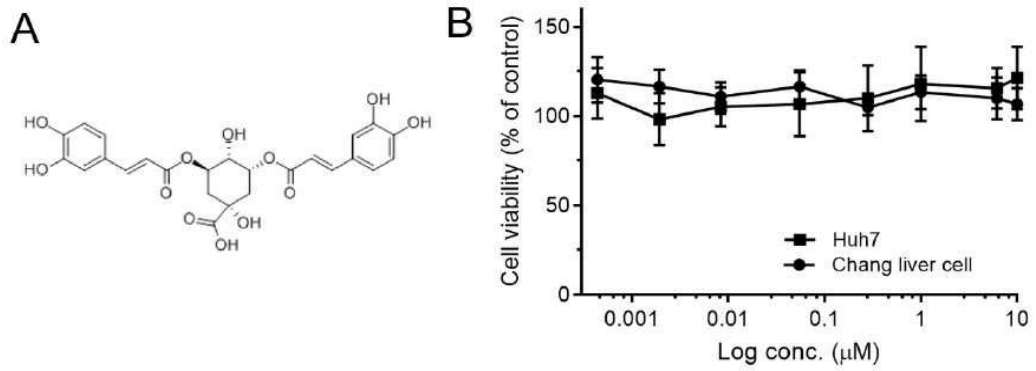
[0158] 커피 생두 추출물은 항 고혈압, 말초 혈관 확장 효과, 체중 증가 및 지방 축적 억제 효과, 및 포도당 대사 조절 효과 등 인체 건강에 많은 유익한 효과를 가진다. 그러나 커피 생두 추출물의 단일 화합물의 치료적 효과는 아직 철저하게 연구되지 않았다.

[0159] DQA는 상대적으로 안정한 화합물로, 다른 폴리페놀 보다 경구 흡수율이 우수하다. DQA의 주요 성분 중 하나인 카페익산(caffeic acid)은 전신 순환 후에도 생물학적 효과를 유지할 수 있을 만큼 충분히 안정적이다. 그러므로 DQA는 만성 ROS 노출에 의해 유도된 간 섬유증에 대해 신뢰할 수 있는 예방 효과를 보여줄 수 있다 (도 6).

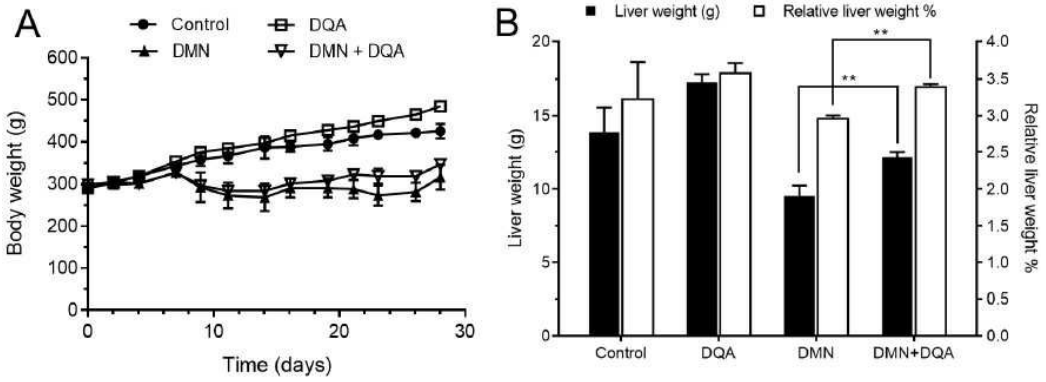
[0161] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

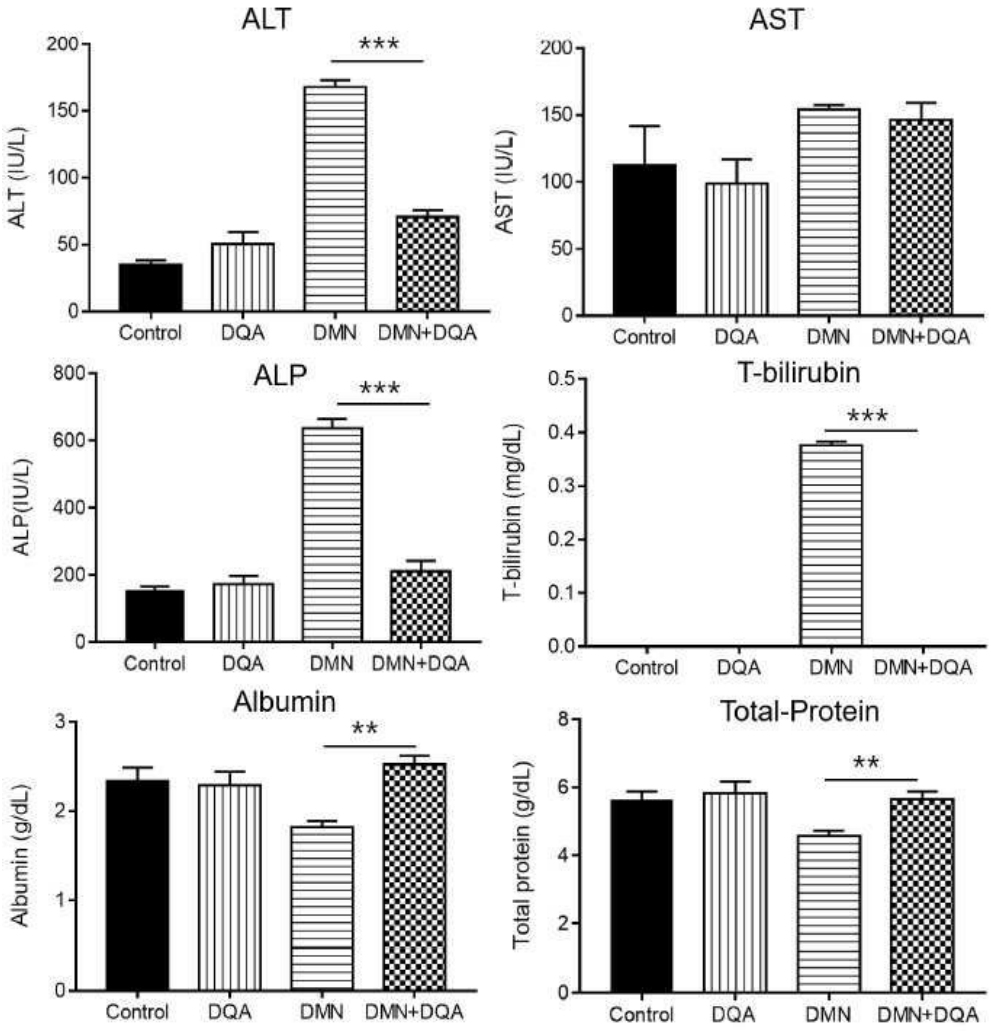
도면1


A
B
Cell viability (% of control)
Log conc. (μM)
Huh7
Chang liver cell

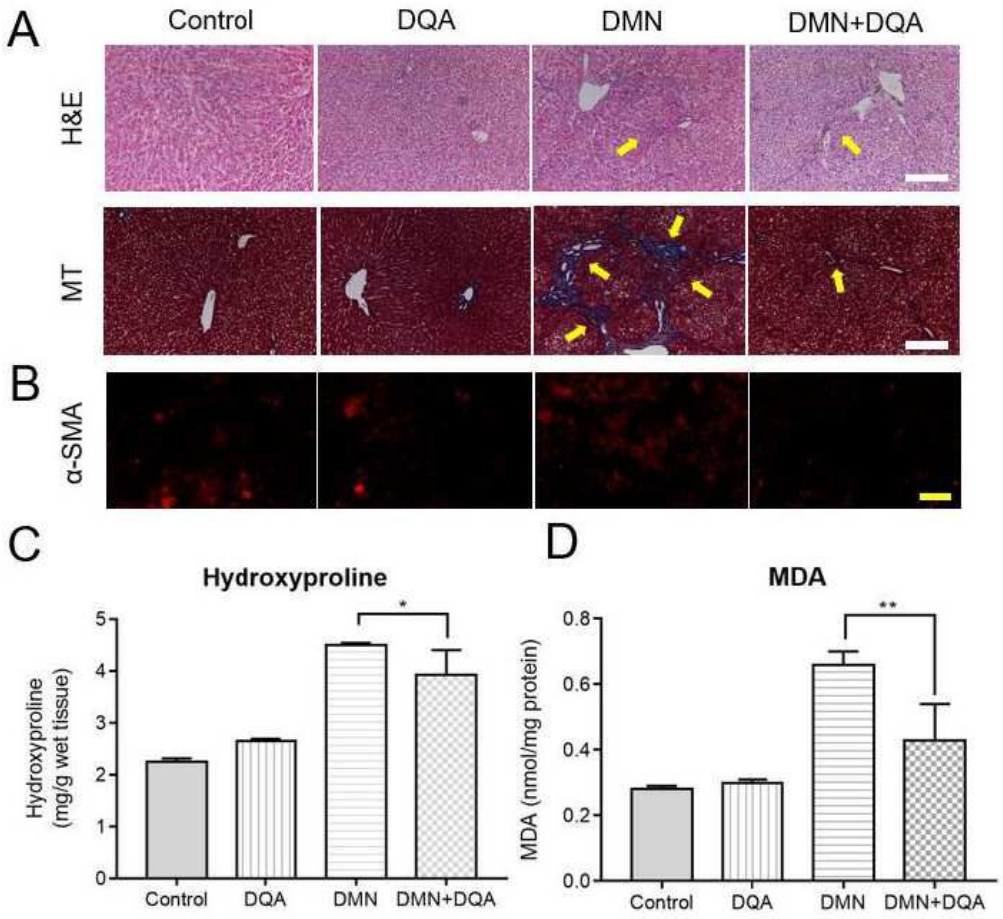
도면2


A
Control
DMN
DQA
DMN + DQA
Body weight (g)
Time (days)
B
Liver weight (g)
Relative liver weight %
Control
DQA
DMN
DMN+DQA

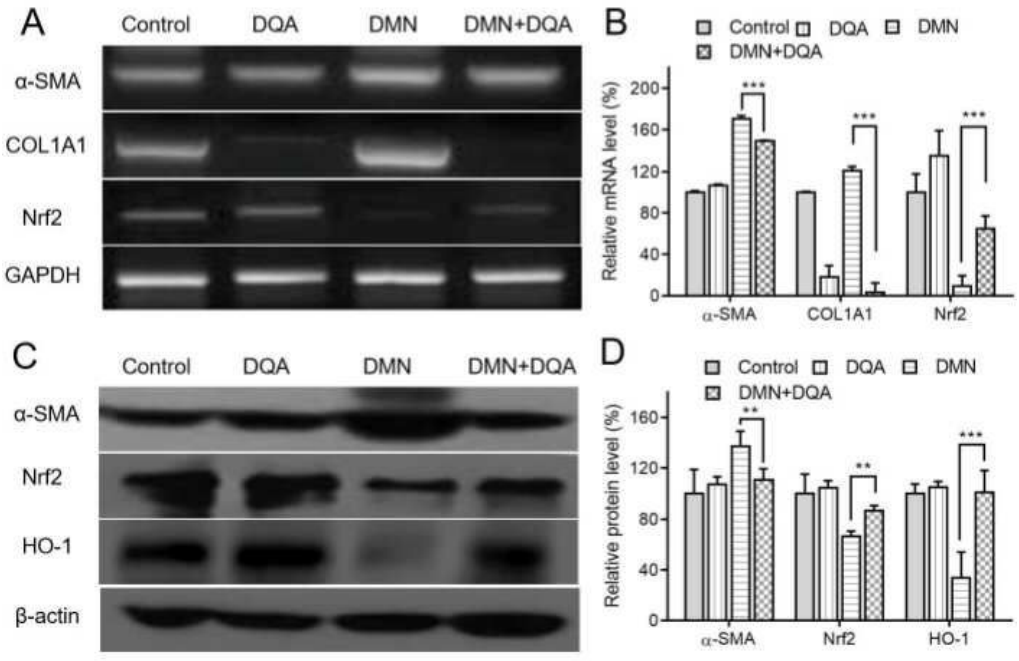
도면3


ALT
ALT (IU/L)
200
150
100
50
0
***
Control
DQA
DMN
DMN+DQA
AST
AST (IU/L)
200
150
100
50
0
Control
DQA
DMN
DMN+DQA
ALP
ALP(IU/L)
800
600
400
200
0
***
Control
DQA
DMN
DMN+DQA
T-bilirubin
T-bilirubin (mg/dL)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
***
Control
DQA
DMN
DMN+DQA
Albumin
Albumin (g/dL)
3
2
1
0
**
Control
DQA
DMN
DMN+DQA
Total-Protein
Total protein (g/dL)
8
6
4
2
0
**
Control
DQA
DMN
DMN+DQA

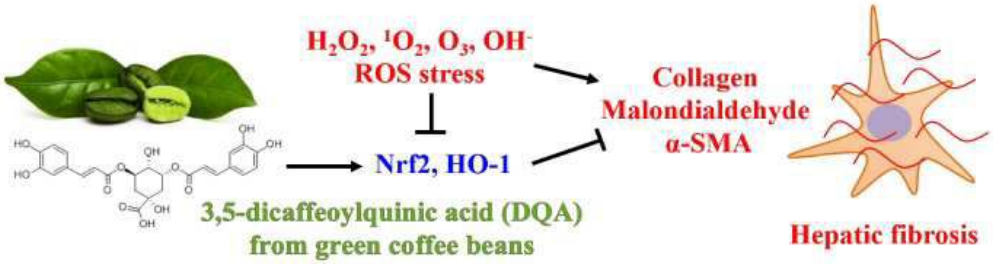
도면4


A
Control
DQA
DMN
DMN+DQA
H&E
MT
B
α-SMA
C
Hydroxyproline
Hydroxyproline (mg/g wet tissue)
Control
DQA
DMN
DMN+DQA
D
MDA
MDA (nmol/mg protein)

도면5


A
Control
DQA
DMN
DMN+DQA
α-SMA
COL1A1
Nrf2
GAPDH
B
Relative mRNA level (%)
C
HO-1
β-actin
D
Relative protein level (%)

도면6


H_2O_2, $^1O_2$, O_3, OH^-
ROS stress
Nrf2, HO-1
Collagen
Malondialdehyde
α-SMA
3,5-dicaffeoylquinic acid (DQA)
from green coffee beans
Hepatic fibrosis