(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024 년 2 월 15 일 (15.02.2024)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2024/035236 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 31/352 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61P 1/16 (2006.01) *A23K 20/121* (2016.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2023/012007

(22) 국제출원일: 2023 년 8 월 12 일 (12.08.2023)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2022-0101415 2022 년 8 월 12 일 (12.08.2022) KR

(71) 출원인: 포항공과대학교 산학협력단 (**POSTECH RESEARCH AND BUSINESS DEVELOPMENT FOUNDATION**) [KR/KR]; 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77, Gyeongsangbuk-do (KR).

(72) 발명자: 김경태 (**KIM, Kyong Tai**); 37673 경상북도 포항시 남구 지곡로 155, 4동 504호, Gyeongsangbuk-do (KR). 오은지 (**OH, Eunji**); 02543 서울특별시 동대문구 서울시립대로28길 31, 202호., Seoul (KR). 이재 (**LEE, Jae**); 35358 대전광역시 서구 관저북로 87, 101동 104호, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 백서일 (**BAEK, Seoil**); 04513 서울특별시 중구 서소문로 116, 1517호, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))

WO 2024/035236 A1

(54) **Title:** COMPOSITION FOR ALLEVIATION OF FATTY LIVER CONTAINING GOSSYPETIN

(54) **발명의 명칭:** 고시페틴을 포함하는 지방간 개선용 조성물

(57) **Abstract:** The present invention provides a use of gossypetin for alleviating fatty liver, wherein gossypetin can exhibit an excellent effect of alleviating fatty liver through AMPK protein activation. Therefore, the present invention provides a pharmaceutical composition containing gossypetin or a salt thereof for the prevention or treatment of fatty liver diseases, specifically nonalcoholic fatty liver disease such as nonalcoholic steatohepatitis, along with a food or feed composition for alleviation of fatty liver.

(57) **요약서:** 본 발명은 고시페틴의 지방간 개선 용도를 제공하는 것으로, 고시페틴은 AMPK 단백질 활성화를 통해 우수한 지방간 개선 효과를 발휘할 수 있다. 따라서, 본 발명은 고시페틴 또는 이의 염을 포함하는 지방간 질환, 구체적으로 비알콜성 지방간염과 같은 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물과 함께 지방간 개선용 식품 또는 사료 조성물을 제공한다.

명세서

발명의 명칭: 고시페틴을 포함하는 지방간 개선용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 고시페틴의 지방간 개선 용도 등에 관한 것이다.

[2] 본 발명은 대한민국 특허청에 2022년 8월 12일 제출된 특허출원 제 10-2022-0101415호의 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 전체 내용은 본 발명에 참조로 포함된다.

[3] 본 발명을 지원한 국가연구개발사업은 다음과 같다.

[4] [과제고유번호] 1395074337

[5] [세부과제번호] PJ016402022022

[6] [부처명] 농촌진흥청

[7] [연구관리전문기관] 농촌진흥청

[8] [연구사업명] 바이오그린연계농생명혁신기술개발

[9] [연구과제명] 프로바이오틱스 및 천연물을 이용한 비알코올성 지방간 개선 연구

[10] [기여율] 100%

[11] [주관기관] 포항공과대학교 산학협력단

[12] [연구기간] 2022.01.01 ~ 2022.12.31

배경기술

[13] 비알콜성 지방간 질환(nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD)은 서구화된 식생활과 운동 부족 등으로 인해 간에 지방이 축적된 상태로, 단순 지방간 상태에서 간 염증 및 간 손상이 진행된 비알콜성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis; NASH), 나아가 간경변증 또는 간세포암종 등 말기 간질환으로 진행될 수 있는 위험한 대사 질환이다. 전세계적으로 비알콜성 지방간 질환의 유병률은 급격히 증가하고 있으나, 복잡한 병태생리로 인해 현재까지 운동과 체중 감량 외에는 마땅한 치료 요법이 없는 실정이다.

[14] 비알콜성 지방간 질환의 발병 메커니즘을 설명하기 위해, 종래 "two-hit model"은 고지방 식이, 비만 및 인슐린 저항성 등에 의해 유발된 간 지질 축적이 먼저 발생하고, 뒤이어 간 염증, 간 손상, 섬유화를 유발하는 두 번째 타격(second hit)을 통해 단순 지방간에서 지방간염으로 질환이 진행된다고 제안하였다. 이후, 보다 다양한 유전적, 환경적 요인이 지방간 질환의 발병에 관여하고, 지방 조직, 췌장, 장(gut) 및 간 등 다양한 기관 기능이 서로 밀접하게 관련되어 있음이 밝혀짐에 따라, 다양한 병리 인자가 동시에 상승적으로 작용하여야 지방간 질환이 유도된다는 "multiple-hit model"이 새롭게 제안되었다(문헌[Buzzetti, Elena, Massimo Pinzani, and Emmanuel A. Tsochatzis(2016)]).

[15] AMPK (AMP-activated protein kinase)는 세포 내 에너지 상태를 감지하여 대사 조절 및 항상성 유지에 핵심 기능을 수행하는 효소로, 염증, 비만, 당뇨병 등 대사 질환에서 그 활성이 감소되어 있으며, 비알콜성 지방간 질환 개선을 위한 주요 질환 타겟으로 주목받고 있다(문헌[Zhao, Peng, and Alan R. Saltiel(2020)] 및 문헌 [Gluais-Dagorn, Pascale, et al.(2022)]).

[16] 이와 같은 배경 하에, 본 발명자는 AMPK 단백질을 효과적으로 활성화시킴으로써 지방간을 개선할 수 있는 방법을 연구하였고, 그 결과 고시페틴이 신규한 AMPK 활성화제로서 우수한 지방간 개선 효과를 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[17] 본 발명의 목적은 고시페틴의 지방간 개선 및 AMPK 단백질 활성화 용도 등을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[18] 일 측면에서, 본 발명은 고시페틴(gossypetin) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 지방간 질환(fatty liver disease) 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[19] 상기 고시페틴 또는 이의 염은 화학적으로 합성되거나 또는 천연물에서 유래될 수 있다.

[20] 상기 지방간 질환 예방 또는 치료는 간 세포 내 AMPK 활성 증가에 의해 달성될 수 있다. 여기서, 상기 지방간 질환은 간 세포 내 AMPK 활성이 감소된 것을 특징으로 할 수 있다.

[21] 상기 지방간 질환은 비알콜성 지방간 질환(NAFLD)일 수 있고, 구체적으로 비알콜성 지방간염(NASH)일 수 있으며, 선택적으로 1종 이상의 대사 질환을 동반할 수 있다. 구체적으로, 상기 지방간 질환은 고지방 식이에 의한 비알콜성 지방간 질환일 수 있다.

[22] 상기 조성물은 간 지질 축적 감소, 간 손상 감소, 간 염증 감소, 간 섬유증 감소 및 간독성 개선 효과를 가질 수 있다.

[23] 본 발명은 또한, 고시페틴 또는 이의 염을 치료적 유효량으로 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 지방간 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[24] 본 발명은 또한, 고시페틴 또는 이의 염의 지방간 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[25] 본 발명은 또한, 지방간 질환의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 고시페틴 또는 이의 염의 용도를 제공한다.

[26] 또다른 일 측면에서, 본 발명은 고시페틴 또는 이의 염을 포함하는 지방간 개선용 식품 조성물을 제공한다. 상기 식품은 건강기능식품일 수 있다.

[27] 또다른 일 측면에서, 본 발명은 고시페틴 또는 이의 염을 포함하는 지방간 개선용 사료 조성물을 제공한다.

[28] 본 발명은 또한, 고시페틴 또는 이의 염을 사람 또는 동물이 섭취하는 단계를 포함하는, 지방간 개선 방법을 제공한다.

[29] 본 발명은 또한, 고시페틴 또는 이의 염의 지방간 개선 용도를 제공한다.

[30] 본 발명은 또한, 지방간 개선용 식품 또는 사료의 제조를 위한 고시페틴 또는 이의 염의 용도를 제공한다.

[31] 또다른 일 측면에서, 본 발명은 고시페틴 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 비만, 간 독성 질환, 간 손상 질환, 염증성 질환 또는 섬유증에 대한 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[32] 또다른 일 측면에서, 본 발명은 고시페틴 또는 이의 염을 포함하는 비만, 간 독성, 간 손상, 염증 또는 섬유증 개선용 식품 조성물 또는 사료 조성물을 제공한다.

[33] 또다른 일 측면에서, 본 발명은 고시페틴 또는 이의 염을 간 세포에 처리하는 단계를 포함하는 간 세포 내 AMPK 단백질 인산화 유도 방법을 제공한다.

발명의 효과

[34] 고시페틴은 강력한 AMPK 활성화 효과 통해 우수한 지방간 개선 효과를 발휘하므로 지방간 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물, 지방간 개선용 식품 또는 사료 조성물 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[35] 도 1은 고시페틴을 처리한 간 세포주(AML12)에서 AMPK 단백질 인산화 수준을 측정한 결과를 나타내고,

[36] 도 2는 MCD(Methionine-choline deficient) 식이 마우스에서 고시페틴 투여에 의한 AMPK 인산화 효과를 나타낸 결과이고,

[37] 도 3은 풀-다운 어세이(pull-down assay)를 통해 고시페틴과 AMPK 단백질의 직접 결합을 확인한 결과를 나타내고,

[38] 도 4는 고시페틴과 AMPK 단백질 구조 내 활성화 사이트 간 상호작용을 나타내고,

[39] 도 5는 공지된 주요 AMPK 활성화제와 고시페틴의 AMPK 인산화 효과를 비교한 결과를 나타내고,

[40] 도 6은 유사 구조의 플라보노이드와 고시페틴의 AMPK 인산화 효과를 비교한 결과를 나타내고,

[41] 도 7는 MCD 식이 마우스에서 고시페틴 투여에 의한 간 조직 내 지방간 병변 개선 효과를 관찰한 사진이고[붉은색 화살표: 간세포 풍선양 변화 지표 (Hepatocyte ballooning) 검정색 화살표: 간조직 염증 지표],

[42] 도 8은 MCD 식이 마우스에서 고시페틴 투여에 의한 간 조직 내 병변 개선 효과를 나타낸 그래프이고,

[43] 도 9는 MCD 식이 마우스에서 고시페틴 투여에 의한 NAFLD 활성 스코어 (NAS) 개선 효과를 나타낸 그래프이고,

[44] 도 10 및 도 11은 MCD 식이 마우스에서 고시페틴 투여에 의한 간 조직 내 지방 축적 개선 효과를 관찰한 사진 및 그래프이고,

[45] 도 12은 MCD 식이 마우스에서 고시페틴 투여에 의한 간 조직 내 자유 지방산 수준을 측정한 결과를 나타내고,

[46] 도 13은 MCD 식이 마우스에서 고시페틴 투여에 의한 간 조직 내 지질 축적 관련 유전자의 발현 수준을 측정한 결과를 나타내고,

[47] 도 14 및 도 15는 간 세포주(AML12)에서 고시페틴과 AMPK 단백질 억제제(컴파운드 C) 처리 후 지방 축적 개선 효과를 관찰한 사진 및 그래프이고,

[48] 도 16 및 도 17은 MCD 식이 마우스에서 고시페틴 투여에 의한 간 조직 내 섬유증 개선 효과를 시리우스 레드 염색으로 관찰한 사진 및 그래프이고,

[49] 도 18은 MCD 식이 마우스에서 고시페틴 투여에 의한 간 조직 내 콜라겐 전구물질(히드록시프롤린) 수준을 측정한 그래프이고,

[50] 도 19은 MCD 식이 마우스에서 고시페틴 투여에 의한 간 조직 내 섬유증 유전자 발현 조절 효과를 나타낸 그래프이고,

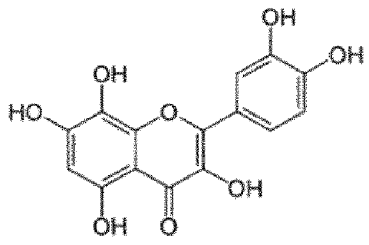
[51] 도 20은 MCD 식이 마우스에서 고시페틴 투여에 의한 간 독성 개선 효과를 측정한 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[52] 본 발명자는 간 세포에서 에너지 대사의 핵심 기능을 수행하는 AMPK 단백질을 활성화시킬 경우 지방간 개선 효과를 달성할 수 있을 것이라 가정하고, 신규 AMPK 활성화제를 발굴하기 위해 노력하였다. 그 결과, 플라보노이드 중 하나인 고시페틴에서 유사 구조의 플라보노이드 대비 강력한 AMPK 활성화 효과가 있으며, 지방간 질환 동물 모델에서 효과적으로 지방간 증상을 개선한다는 점을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[53] 본 발명에서, 고시페틴(gossypetin)은 3,5,7,8,3',4'-헥사히드록시플라본(hexahydroxyflavone)으로 불리는 플라보노이드(flavonoid)로서, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이다.

[54] [화학식 1]

[55] 

[56] 본 발명에서, 고시페틴의 염은 조성물의 산업적 적용 분야에 따라 적합한 염, 예컨대 의약품, 의약외품, 식품, 사료 등에 통상적으로 사용가능한 염을 의미한다. 상기 염은 예컨대, 고시페틴의 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 리튬, 구리, 망간, 아연, 철 등을 비롯한 무기이온 염과 염산, 인산, 황산과 같은 무기산 염, 그 외에 아스코르브산, 시트르산, 타르타르산, 락트산, 말레산, 말론산, 푸마르산, 글리콜산,

숙신산, 프로피온산, 아세트산, 오로테이트산, 아세틸살리실산과 같은 유기산 염과 라이신, 아르기닌, 구아니딘 등의 아미노산 염 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[57] 본 발명에서, 고시페틴 또는 이의 염은 화학적으로 합성되거나 또는 천연물에서 유래될 수 있다. 일 실시양태에서, 고시페틴 또는 이의 염은 저분자 출발 물질 및/또는 전구체로부터 공지된 유기 반응을 통해 합성된다. 또다른 일 실시양태에서, 고시페틴은 아욱과 무궁화속(Hibiscus) 식물 등의 천연물에서 추출, 분리 및 농축을 통해 수득된다.

[58] 본 발명에서, 지방간 질환(fatty liver disease; FLD)은 간 지방증(hepatic steatosis)으로 불리는, 간에 과도한 지질이 축적된 상태를 지칭한다. 상기 상태는 예컨대 간조직 검사시 5% 이상의 간세포에 지방이 침착된 상태로 정의될 수 있다.

[59] 본 발명에서 지방간 질환 예방 또는 치료는 지방간 질환의 병태 또는 증상의 예방, 방지, 지연, 호전, 해소, 완화, 경감, 개선, 치료 등의 효과를 포함하며, 지방간 질환의 완전한 발병 억제에 한정되지 않는다.

[60] 상기 지방간 질환 예방 또는 치료는 간 세포 내 AMPK 단백질 활성을 증가시킴으로써 달성될 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 AMPK 단백질 활성 증가는 AMPK 단백질 인산화 유도를 의미한다.

[61] 본 발명에서, AMPK (AMP-activated protein kinase) 단백질은 간 세포에서 당과 지방산의 섭취, 산화 등 에너지 항상성에 핵심적인 역할을 수행하는 단백질로, 세포 내에서 AMPKα, AMPKβ 및 AMPKγ 세 가지 아형이 결합된 헤테로트라이머(heterotrimer) 형태로 존재한다. 인간에서 AMPKα, AMPKβ 및 AMPKγ 유전자 유형 및 서열 정보는 본 발명이 속한 기술 분야에 공지되어 있다.

[62] AMPK 단백질과 직접 상호작용하여 AMPK 인산화를 유도하는 직접 AMPK 활성화제(direct AMPK activator)는 지방간 질환의 핵심 지표를 개선하고 관련 대사 증상을 완화할 수 있어 비알콜성 지방간염을 비롯한 지방간 질환의 주요 치료 타겟으로 고려되고 있으며, 예컨대 직접 AMPK 활성화제인 AICAR, A-769662, C13, PF-249/739, PF-06409577, Compound 1, PXL770 등의 저분자 화합물은 동물 모델에서 지방간 개선 효과를 나타낸다는 점이 잘 알려져 있다(문헌[Zhao, Peng, and Alan R. Saltiel. (2020)] 및 문헌[Gluais-Dagorn, Pascale, et al. (2022)] 등).

[63] 고시페틴은 플라보노이드 골격 A 고리 5번, 7번 및 8번 탄소, B 고리의 3'번 및 4'번 탄소 및 C 고리의 3번 탄소에 각각 히드록시기가 부착된 플라보놀 구조를 특징으로 하며 다른 플라보놀 화합물과 차별화되는 독특한 스캐폴드 구조를 형성한다. 이로 인해, 고시페틴은 AMPK 단백질의 ADaM(allosteric drug and metabolite) 사이트에 직접 결합하여 AMPK 단백질의 인산화를 유도할 수 있는 직접 AMPK 활성화제(direct AMPK activator)로 기능할 수 있다(도 3 내지 도 5). 나아가, 이와 같은 고시페틴의 강력한 AMPK 단백질 인산화 효과를 통해, 지질 축적 감소 효과를 포함한 지방간 개선 효과를 발휘할 수 있음을 확인하였다(도 14 및 도 15).

[64] AMPK 단백질의 신호전달 경로는 NASH를 포함한 지방간 질환의 발병 과정에서 지질 대사 및 간 섬유증 등을 효과적으로 조절할 수 있다고 알려져 있다(문헌[Herzig, Sebastien, and Reuben J. Shaw. (2018)] 및 문헌[Garcia, Daniel, et al.(2019)] 등). 따라서, 고시페틴은 다른 플라보노이드 대비 현저하게 향상된 AMPK 활성화 기능을 통해 지방간 질환 예방 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

[65] 일 실시양태에서, 지방간 질환은 간 세포 내 AMPK 활성, 구체적으로 AMPK 인산화 수준이 정상 간 세포에 비해 감소된 것을 특징으로 할 수 있다(문헌[Zhao, Peng, and Alan R. Saltiel. (2020)], 문헌[Gluais-Dagorn, Pascale, et al. (2022)], 문헌[Smith, Brennan K., et al. (2016)] 등).

[66] 본 발명에서, 지방간 질환은 발병 원인에 따라 알콜성 지방간 질환(alcoholic liver disease) 및 비알콜성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)을 포함하며, 바람직하게는 비알콜성 지방간 질환이다. 비알콜성 지방간 질환은 유의한 음주, 약인성, 바이러스 간염 등과 같은 이차적 원인에 의한 간질환이 없으면서 임상적 소견이나 생화학적, 영상학적, 병리학적 검사에 합당한 소견이 있는 질환으로 정의된다(문헌[대한간학회(2021)] 등).

[67] 상기 비알콜성 지방간 질환은 간에 단순히 지방만 축적된 상태인 단순 지방간, 간세포 손상(풍선화 또는 섬유화 등)을 동반한 염증 소견이 있는 비알콜성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis; NASH), 및 이를 동반한 간경변 또는 간세포암종까지 질환의 진행 정도에 따라 다양한 하위 질환을 포함한다. 일 실시양태에서, 비알콜성 지방간 질환은 비알콜성 지방간염(NASH)이다.

[68] 일 실시양태에서, 비알콜성 지방간 질환은 고지방 식이(high-fat diet; HFD)에 의한 비알콜성 지방간 질환이다. 구체적으로, 상기 고지방 식이는 총 칼로리의 35% 이상이 불포화 및 포화 지방으로 구성된 식단일 수 있다.

[69] 고지방 식이는 간 세포 내 AMPK 활성 저하와 밀접하게 연관되어 있다(문헌[Lindholm, Christopher R., et al. (2013)], 문헌[Shiwa, Mami, et al. (2015)] 등). 간 조직 특이적으로 AMPK 활성을 조절할 수 있는 마우스 모델에서, 고지방 식이 마우스의 간 세포 AMPK 활성을 인위적으로 증가시킬 경우 간 지방 축적, 염증, 섬유증 개선 등 지방간 질환 지표를 개선시킬 수 있다(문헌[Garcia, Daniel, et al. (2019)). 따라서, 고지방 식이에 의한 비알콜성 지방간 질환에서 고시페틴 또는 이의 염에 의한 간 세포의 강력한 AMPK 활성 증가는 우수한 지방간 질환의 예방 또는 치료 효과를 발휘할 수 있다(도 1 내지 도 3).

[70] 본 발명의 실시예에서, 비알콜성 지방간 질환을 유발하기 위해 메티오닌-콜린 결핍(methionine-choline deficient; MCD) 식이 또는 콜린 결핍 고지방식(choline-deficient high fat diet; CDHFD)을 섭취한 마우스를 사용하였고, 상기 마우스에게 고시페틴 투여 후 지방간 질환 병변의 개선 효과를 확인하였다. 그 결과, 질환 동물 모델에서 간 조직 내 지방증(steatosis), 풍선화(ballooning) 및 염증 개선 효과(도 7 및 도 8) 및 NAFLD 활성 스코어(NAS) 개선 효과(도 9), 간 지방 축적 억제 효과(도 10 내지 도 15), 간 섬유화 증상 개선 효과(도 16 및 도 17), 간 조직 내 섬

유화 유전자 발현 조절 효과(도 18 및 도 19) 및 간독성 개선 효과(도 20)를 확인하였다. 상기 지방간 개선 효과는, 고시페틴의 강력한 AMPK 활성화 작용에 의한 것으로 유사 구조의 플라보노이드 화합물보다 현저히 개선된 것이다(도 1 내지 도 6 및 도 14 내지 도 15). 따라서, 고시페틴은 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료를 위해 유용하게 활용될 수 있다.

[71] 본 발명에서, 지방간질환은 전신적인 대사 질환을 동반할 수 있으며, 예컨대 비만, 제2형 당뇨병, 대사증후군, 고지혈증 및/또는 만성 신장병 등의 간 외 질환을 동반할 수 있다.

[72]

[73] 본 발명의 약학 조성물은 유효성분으로서 고시페틴 또는 이의 염 외에 약학적으로 허용 가능한 1종 이상의 담체, 부형제, 희석제, 가용화제 등을 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있고, 가용화제로는 폴록사머 및 라브라솔 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[74] 상기 약학 조성물은 경구 또는 비경구 투여를 위한 적합하고 다양한 제형으로 존재할 수 있다. 본 발명에서, 경구 투여용 제형은 정제, 환제, 분말, 산제, 과립, 펠렛, 캡슐, 트로키, 로젠지, 현탁액, 에멀젼, 시럽 및 엘릭시르제 등을 포함할 수 있고, 비경구 투여용 제형은 주사제, 좌제, 호흡기 흡입제, 에어로졸제, 연고, 액제, 로션제, 패치제, 도포용 분말, 오일, 크림, 겔 등을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[75] 상기 약학 조성물은 제형에 따라 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 비경구 투여는 피하 투여, 피내 투여, 경피 투여, 모발 투여, 복강 투여, 직장 투여, 정맥 투여, 근육 투여, 흉부 투여 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[76] 상기 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 여기서, 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효한 양의 수준은 환자의 상태, 체중, 성별, 연령, 건강상태, 질병의 정도, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로, 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[77] 상기 약학 조성물은 고시페틴 또는 이의 염 외에도 대사성의 개선 효능을 갖는 1종 이상의 유효성분을 더 포함하여 지방간 질환의 예방 또는 치료 효능을 상승시키는 병용 조성물로 사용될 수 있다.

[78] 본 발명에서, 식품 조성물은 고시페틴 또는 이의 염을 일정 농도로 포함하는 건강식품, 건강기능식품, 음료, 식품 첨가제, 식품 보조제 등 모든 식품 형태를 포함하며, 바람직하게는 건강기능식품이다. 상기 건강기능식품은 인체에 유용한 기

능성을 가진 원료나 성분을 사용하여, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 제조 및 가공한 식품을 의미한다.

[79] 상기 건강기능식품에 고시페틴 또는 이의 염은 기능성 원료로 포함될 수 있다. 본 발명의 실시예에서, 지방간 상태를 재현하기 위해 메티오닌-콜린 결핍(methionine-choline deficient; MCD) 식이를 섭취한 마우스를 사용하였고, 상기 마우스에게 고시페틴 투여 후 지방간 상태 개선 효과를 확인하였다. 그 결과, 지방간 동물의 간 조직 내 지방 축적, 간 손상 및 염증 개선 효과(도 7 및 도 8) 및 지방간 개선 효과(도 9), 간 지방 축적 억제 효과(도 10 내지 도 15), 간 섬유화 개선 효과(도 16 및 도 17), 간 조직 내 섬유화 유전자 발현 조절 효과(도 18 및 도 19) 및 간독성 개선 효과(도 20)를 확인하였다. 상기 지방간 개선 효과는, 고시페틴의 강력한 AMPK 활성화 작용에 의한 것으로 유사 구조의 플라보노이드 화합물보다 현저히 개선된 것이다(도 1 내지 도 6 및 도 14 내지 도 15). 따라서, 고시페틴은 지방간과 같은 간 건강 개선을 위해 유용하게 활용될 수 있다.

[80]

[81] 본 발명의 조성물이 건강기능식품으로 사용될 경우, 사람에게 하루 1회 내지 수회에 걸쳐 투여될 수 있으며, 이때 고시페틴 또는 이의 염의 하루 투여 용량은 0.1 내지 500 mg/일일 수 있고, 구체적으로 1 내지 100 mg/일일 수 있다.

[82] 본 발명에서, 사료 조성물은 인간을 제외한 포유류를 포함하는 동물에게 섭취를 위해 제공되는 식이로서, 상기 동물의 지방간 개선 효과를 발휘할 수 있다.

[83]

[84] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[85] <재료 및 방법>

[86] 1. 실험 동물

[87] 4 주령 수컷 C57BL/6 마우스를 Central Lab Animal Inc.(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 적응 2 주 후, 대조군 내 마우스를 표준 보통 식이(chow diet) 및 MCD 식이(Research Diets, New Brunswick, NJ, United States)로 4 주 동안, 또는 CDHFD 식이(Research Diets)로 3 개월 동안 배급하여 비알콜성 지방간염(NASH)을 유발하였다.

[88] 고시페틴의 약리 효과 측정을 위해, 고시페틴을 MCD 식이와 함께 4 주 동안 및 CDHFD 식이와 함께 3 개월 동안 20 mg/kg/일의 용량으로 경구 투여하였다. 이후, 혈액 샘플을 구후 출혈법(retrobulbar bleeding)으로 수집하고, 혈청을 3000 rpm, 20 분 동안 원심분리 하여 수집하였다. 혈청 샘플 내 ALT 및 AST 수준을 SCL Health Inc. (Seoul, Korea)에서 측정하여 지질 독성을 평가하였다.

[89] 2. 약물 처리

[90] 고시페틴은 Boc sciences (Shirley, NY, USA)에서 합성되었고 세포 기반 실험 및 마우스 투여를 위해 DMSO(Sigma-Aldrich)에 용해되었다. 효과 확인을 위해 고시

페틴(20 mg/kg) 또는 비히클(1% 카복시메틸셀룰로오스)을 4 개의 상이한 마우스 그룹(n=17-20)에 4 주 동안 경구 투여하였다.

[91] 3. 조직 검사

[92] 마우스 간 조직을 4% 파라포름알데히드(PFA)로 고정하고 H&E(Hematoxylin and eosin) 및 시리우스 레드(Sirius red) 염색을 위해 파라핀에 포매하였다. 파라핀 블록을 4 μm 두께로 절편화하고 H&E 염색 후 NAFLD 활성 스코어(NAFLD activity score; NAS)를 측정하였다.

[93] 섬유증 수준을 측정하기 위해 파라핀 절편을 Picrosirius red 용액(IHC WORLD, Ellicott City, MD, USA)으로 염색하였다. 절편을 자일렌으로 탈파라핀화하고 에탄올 농도를 100%에서 70%로 줄여가며 탈수시켰다. 탈수된 절편을 Weigert's iron hematoxylin solution (IHC WORLD)으로 염색하고 흐르는 수돗물로 세척한 후 시리우스 레드 염색을 수행하였다. 그 다음, 절편을 0.5% 아세트산 용액으로 세척하고 100% 에탄올로 탈수시켰다. 절편을 Optic mount S3 (BBC Biochemical, Mount Vernon, WA, USA)로 슬라이드 글래스에 마운팅하고 추가 분석에 사용하였다. 모든 이미지는 Axioplan2 microscope (Zeiss Axio Scan Z.1, Jena, Germany)로 촬영하였다.

[94] 간 조직을 OCT(optimal cutting temperature) 컴파운드(Sakura Finetek USA, St, Torrance, CA, USA)로 포매 및 동결화하였다. OCT 블록을 10 μm 두께로 절편화하고 오일 레드 O(Sigma-Aldrich)로 염색하여 간 지방증을 측정하였다. 동결 절편을 상온에서 공기 건조시킨 다음, 냉각된 10% 포르말린(Sigma-Aldrich)으로 고정하였다. 고정된 절편을 증류수로 3 회 세척한 다음, 절편을 100% 프로필렌 글리콜(Sigma-Aldrich)에 집어넣고 60 ℃ 오븐에서 예열된 오일 레드 O 용액에서 염색하였다. 그 다음, 절편을 85% 프로필렌 글리콜 용액에 처리하고 증류수로 2회 세척하였다. 다음으로, 절편을 Mayer's modified hematoxylin 용액(Abcam, Cambridge, UK)으로 염색하고 흐르는 수돗물로 세척하였다. 절편을 Dako(Agilent, Glostrup, Denmark) 슬라이드 글래스에 마운팅하여 추가 분석에 사용하였다.

[95] 4. 히드록시프롤린 어세이

[96] 고시페틴이 MCD 식이-섭취 마우스의 간 조직에서 섬유증 병태를 감소시키는지 조사하기 위해, 히드록시프롤린 함량을 측정하였다. 콜라겐의 전구물질인 히드록시프롤린의 상대 수준을 측정하여 총 간 콜라겐 함량을 결정하였다. 간 샘플(50 mg)을 증류수(100 μl)에 균질화하고 120 ℃에서 3 시간 동안 10 N HCl로 hydrolyze하였다. 히드록시프롤린 함량을 문헌[Brown et al., 2001]에 기재된 대로 결정하였다.

[97] 5. 자유 지방산 정량화

[98] 간 조직 내 자유 지방산 수준을 제조사 설명서에 따라 자유 지방산 정량화 키트(Sigma-Aldrich)를 통해 측정하였다.

[99] 6. 세포 배양

[100] AML12 마우스 간세포를 10% 우태아 혈청(Hyclone), 10% 페니실린/스트렙토마이신 (Welgene, Gyeongsan-si, Korea), 20 mg의 덱사메타손(Sigma-Aldrich) 및 5 ml의 인슐린-트랜스페린-셀레늄 함유 Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12 (Hyclone, Logan, UT, USA)로 37 ℃에서 습윤화된 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다.

[101] 7. 분자 도킹

[102] 인간 AMPK(code: 5iso)의 결정 구조를 RCSB Protein Data Bank에서 준비하였다. 분자 도킹 및 예측 결합 에너지 계산을 PyRx 소프트웨어 내 AutoDock Vina를 이용해 수행하여 AMPK 내 도킹 위치를 확인하였다. 도킹을 위한 그리드 맵은 AMPK의 N-말단 내 ADaM 사이트에 커버되었다. 도킹 결과를 PyMol 시각화 시스템을 이용해 시각화하였다. 수소 결합은 PyMol 소프트웨어로 예측되었다.

[103] 8. 웨스턴 블롯팅

[104] 세포를 50 mM Tris (pH 7.4), 140 mM NaCl, 5 mM EDTA 및 프로테아제 억제제 태블릿을 함유한 라이시스 버퍼로 용해한 후 초음파 처리를 수행하였다. 용해물의 단백질 농도를 브래드포드 시약(AMERSCO, Framingham, MA, USA)을 이용해 결정하였다. 단백질을 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 젤 전기영동법으로 분석하고, 니트로셀룰로오스 멤브레인(Pall Corporation, New York, NY, USA)으로 트랜스퍼한 후 블로킹 버퍼(TBS 내 5% 무지방 건조유 및 0.1% Tween 20)로 30 분 동안 인큐베이션하였다. 웨스턴 블롯팅을 AMPK, 인산화-AMPK, LKB, 인산화-LKB(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 및 GAPDH (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA)에 대한 일차 항체를 이용해 수행하였다. 이차 항체로 토끼(Promega, Madison, WI, USA), 랫트, 및 염소 항체(Bethyl Laboratories)를 사용하였고, 제조사 설명서에 따라 SUPEX ECL 시약(Neuronex, Goryeong, Korea) 및 ImageQuant LAS-4000 (GE Healthcare, Chicago, MA, USA)를 이용하여 검출을 수행하였다. 통합 블롯팅 밀도를 ImageJ로 정량화하였다.

[105] 9. 역전사(RT-PCR) 및 리얼-타임 정량 PCR(qPCR)

[106] 전체 RNA를 NucleoZOL 시약(Takara Bio Inc., Kusatsu, Shiga, Japan)을 이용해 분리하였다. RNA를 제조사 설명서에 따라 ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega)를 이용해 역전사하였다. 검출 및 정량화를 위해 StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 FastStart Universal SYBR Green Master(Roche, Basel, Switzerland)와 함께 사용하였다. 리얼-타임 qPCR 데이터를 비교 C_T 방법(comparative C_T method)으로 분석하였다.

[107] 10. 통계 분석

[108] 모든 정량 데이터는 평균±표준편차로 나타냈다. 두 그룹 간 비교는 two-tailed unpaired Student's t-test를 통해 분석하였다. 둘을 초과하는 그룹간 비교는 일원 또는 이원 배치 분산 분석을 Tukey 테스트와 함께 수행하였다.

[109] $p < 0.05$는 통계적으로 유의하다고 간주된다.

[110] **<실시예 1> 고시페틴의 간 세포 AMPK 활성화 효과**

[111] 고시페틴이 AMPK 단백질의 인산화를 유도하는지 확인하기 위해 마우스 간 세포(AML12)에 상이한 농도의 고시페틴을 처리하고, 인산화된 AMPK 단백질의 양을 웨스턴 블롯팅으로 확인하였다. 그 결과, 고시페틴은 농도 의존적으로 AMPK 인산화를 유도하였으며 저농도(EC_{50} 수치 0.43 μM)에서 AMPK를 인산화시킬 수 있음을 확인하였다(도 1).

[112] 고시페틴의 간 세포 AMPK 활성화 기능이 실제 지방간 질환 동물의 간조직에서 발휘되는지 확인하기 위해, 고시페틴을 투여받은 MCD 식이 마우스의 간 조직에서 웨스턴 블롯팅으로 AMPK 인산화 정도를 측정하였다. 그 결과, 고시페틴은 지방간 마우스의 간 세포에서도 AMPK 단백질의 인산화를 유도함을 확인하였다(도 2).

[113]

[114] **<실시예 2> AMPK 단백질의 직접 활성화제로서 고시페틴의 AMPK 인산화 효과**

[115] 고시페틴의 AMPK 인산화가 고시페틴 및 AMPK 단백질의 직접 결합에 의해 유도되는지 알아보기 위해 CNBr-비드 컨쥬게이션 어세이를 수행하였다. 구체적으로, 고시페틴을 CNBr 비드와 24 시간 동안 인큐베이션하여 컨쥬게이션되도록 한 후, AML12 세포의 세포 용해물을 CNBr 비드와 함께 인큐베이션하였다. 그 다음, 풀-다운 어세이를 통해 AMPK 단백질 검출 여부를 웨스턴 블롯팅을 통해 확인하였다. 그 결과, 고시페틴-컨쥬게이션된 CNBr 비드 샘플에서 AMPK 단백질 밴드가 강하게 검출되어 고시페틴이 AMPK에 직접 결합한다는 점을 확인하였다(도 3).

[116] AMPK의 ADaM(allosteric drug and metabolite) 사이트에 결합하는 저분자 활성화제는 활성 AMPK 구조를 안정화시킨다는 점이 알려져있으므로(문헌[Gu, Xin, et al. (2018)] 등), 고시페틴이 ADaM 사이트 활성화제로서 AMPK의 알로스테릭 구조를 직접 조절할 수 있는지 조사하였다. AutoDock 프로그램을 이용해 AMPK의 ADaM 사이트에 대한 고시페틴의 결합 친화도를 예측한 결과, 고시페틴은 AMPK 중 ADaM 사이트의 Ser108, Lys29, Lys31 및 Asn48와 상호작용할 수 있고(도 4), 그 결합 에너지가 공지된 AMPK 활성화제인 AICAR 및 A-769662와 유사한 수준이라는 점을 확인하였다.

[117] 마우스 간 세포(AML12)에서 AMPK 활성화제와 고시페틴의 AMPK 인산화 유도 효과를 비교한 결과, 고시페틴은 주요 AMPK 직접 활성화제인 AICAR 및 A-769662보다 AMPK 인산화 유도 효과가 더 우수한 것으로 확인하였다(도 5).

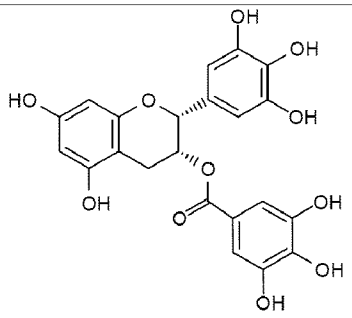
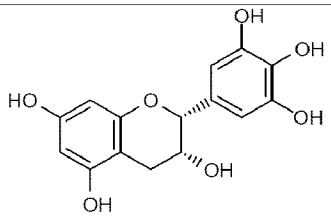
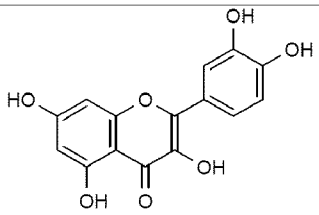
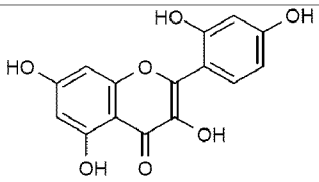
[118]

[119] **<실시예 3> 고시페틴과 유사 플라보노이드 간의 AMPK 활성화 효과 비교**

[120] 퀘르세틴 등 플라보노이드 대사 산물은 NAFLD 및 NASH의 병변을 일부 완화할 수 있다고 알려져 있어(문헌[Tan, Panli, et al. (2022)]), 고시페틴의 AMPK 활성화 효과를 유사한 구조의 플라보노이드 화합물(비교 화합물 1 내지 4)과 비교하기 위해 간 세포(AML12)에 약물 처리 후 AMPK 인산화 수준을 비교하였다.

[121] [표 1]

[122]

	화합물 명칭	화합물 구조
비교 화합물 1	EGCG (epigallocatechin gallate)	
비교 화합물 2	EGC (epigallocatechin)	
비교 화합물 3	퀘르세틴 (Quercetin)	
비교 화합물 4	모린 (Morin)	

[123] 그 결과, 고시페틴은 유사한 플라보노이드 배당체(비교 화합물 1) 뿐만 아니라 골격 및 히드록시기 부착 위치가 유사한 플라보노이드 화합물(비교 화합물 2 내지 4)에 비해 현저히 우수한 AMPK 인산화 효과를 발휘한다는 점을 확인하였다(도 6).

[124]

[125] **<실시예 4> 질환 동물에서 고시페틴의 지방간 질환 병변 개선 효과**

[126] 고시페틴을 투여한 MCD 식이 마우스 간 조직에 대해 H&E 염색 후, 간 지방증(steatosis), 간세포 확장 정도(hepatocyte ballooning) 및 염증 등 지방간 질환 병변을 현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 고시페틴 투여시 간 조직에서 지방간 질환 병변이 개선됨을 확인하였다(도 7 및 도 8).

[127] NAFLD 활성 스코어(NAFLD activity score; NAS)는 간 조직검사에서 관찰된 지방 변화(0-3점), 소엽 염증(0-3점) 및 풍선화 변성(1-2) 등급을 합산한 수치로, 이를 통해 지방간 질환의 진단 및 약물 치료 효능 개선 여부 등을 평가한다(문헌

[De, Arka, and Ajay Duseja.(2020)] 등). NAS 평가 결과, 고시페틴 투여시 지방간 질환 개선 지표 역시 현저히 개선됨을 확인하였다(도 9).

[128]

[129] **<실시예 5> 고시페틴의 AMPK 활성화를 통한 지방 축적 감소 효과**

[130] 고시페틴을 투여한 MCD 식이 마우스에서 간 조직 오일 레드 O 염색을 실시한 결과, 지질 축적을 나타내는 염색 수준이 감소함을 확인하였다(도 10 및 도 11). 또한, 간 조직 내 자유 지방산 수준 역시 고시페틴 투여 후 감소함을 확인하였다(도 12).

[131] 간 조직에서 지방 생성 및 β-산화와 관련된 지질 대사 유전자 발현 수준을 측정한 결과, 고시페틴을 투여받은 지방간 마우스에서 지방 생성 유전자(*Srebp1c* 및 *Acyl*)의 발현은 감소되고 β-산화 유전자(*Cptα* 및 *Acox1*)의 발현은 증가됨을 확인하였다(도 13).

[132] 한편, AMPK 단백질 억제제인 컴파운드 C (5 μM)와 고시페틴을 함께 처리한 후 오일 레드 O 염색을 통해 지질 축적 수준을 평가하였다. 그 결과, 컴파운드 C가 처리되어 AMPK 활성화가 억제된 경우 고시페틴의 지질 축적 효과가 관찰되지 않아, 고시페틴의 지질축적 효과가 AMPK 활성화 효과를 통해 발휘된다는 점을 확인하였다(도 14 및 도 15).

[133]

[134] **<실시예 6> 질환 동물에서 고시페틴의 간 섬유증 개선 효과**

[135] 간 조직검사에서 관찰되는 섬유화 병변은 NAFLD 활성 스코어와 함께 임상적으로 널리 사용되는 지방간염 지표이다(문헌[대한간학회, 2021] 등). 이에, MCD 식이 마우스의 간 조직을 시리우스 레드(Sirius Red) 염색한 후 현미경 관찰을 통해 섬유화 병변의 변화를 측정하였다. 그 결과, MCD 식이 마우스의 간 조직에서는 혈관 근처 간 섬유증 수준이 증가하였으나, 고시페틴을 투여받은 MCD 식이 마우스의 간 조직에서는 염색 영역이 감소하여 섬유화 수준이 현저히 개선됨을 확인하였다(도 16 및 도 17).

[136] MCD 식이 마우스에서 섬유증과 관련한 지표인 콜라겐 생성에 미치는 고시페틴의 억제 효과를 확인하기 위해 간 조직에서 관련 지표 수준을 측정한 결과, 고시페틴 처리 후 콜라겐 전구물질인 히드록시프롤린 함량(도 18) 및 콜라겐 유전자인 *collagen 1a* 및 *collagen 3a*의 발현(도 19)이 모두 감소됨을 확인하였다.

[137]

[138] **<실시예 7> 지방간 질환 동물 모델에서 고시페틴의 간 독성 개선 효과**

[139] 혈청 간 독성 지표(ALT, AST)는 간 조직 내 병변과 함께 비알콜성 지방간 질환의 선별검사 방법으로 사용될 수 있다(문헌[Yoo, JangSuk, et al.(2008)] 등). 이에, 고시페틴을 투여한 MCD 식이 마우스에서 혈액 샘플을 채취하여, ALT, AST 등 간 독성 지표를 측정하였다. 그 결과, MCD 식이 마우스에서 증가한 간 독성 지표가 고시페틴 투여시 감소함을 확인하여, 지방간 질환에서 고시페틴의 간독성 저해 효과를 확인하였다(도 20).

[140] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 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 것으로 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] 고시페틴(gossypetin) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 지방간 질환(fatty liver disease) 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 2] 제 1 항에 있어서, 고시페틴 또는 이의 염은 화학적으로 합성되거나 또는 천연물에서 유래된 것인 조성물.

[청구항 3] 제 1 항에 있어서, 지방간 질환 예방 또는 치료는 간 세포 내 AMPK 활성 증가에 의해 달성되는 것인 조성물.

[청구항 4] 제 1 항에 있어서, 지방간 질환은 비알콜성 지방간 질환(NAFLD)인 조성물.

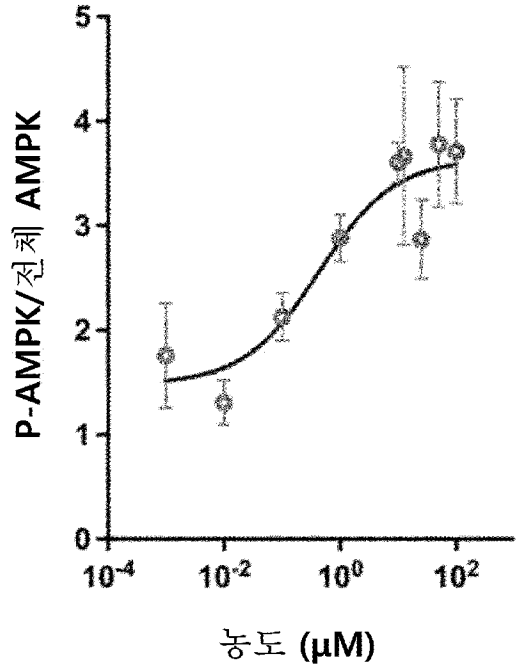
[청구항 5] 제 4 항에 있어서, 비알콜성 지방간 질환은 비알콜성 지방간염(NASH)인 조성물.

[청구항 6] 제 5 항에 있어서, 간 지질 축적 감소, 간 손상 감소, 간 염증 감소, 감 섬유증 감소 및 간독성 개선 효과를 갖는 조성물.

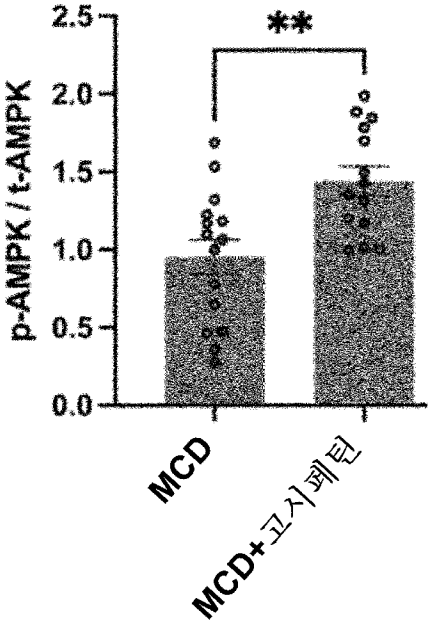
[청구항 7] 고시페틴 또는 이의 염을 포함하는 지방간 개선용 식품 조성물.

[청구항 8] 고시페틴 또는 이의 염을 포함하는 지방간 개선용 사료 조성물.

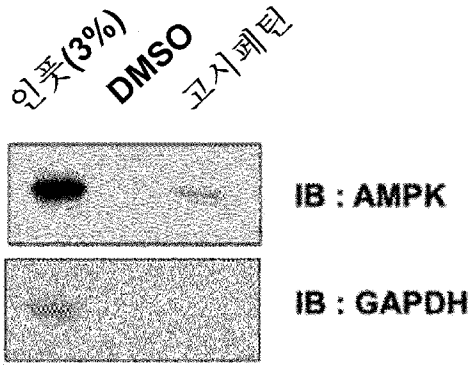
[도1]


P-AMPK/전체 AMPK
5
4
3
2
1
0
10^{-4}
10^{-2}
10^{0}
10^{2}
농도 (μM)

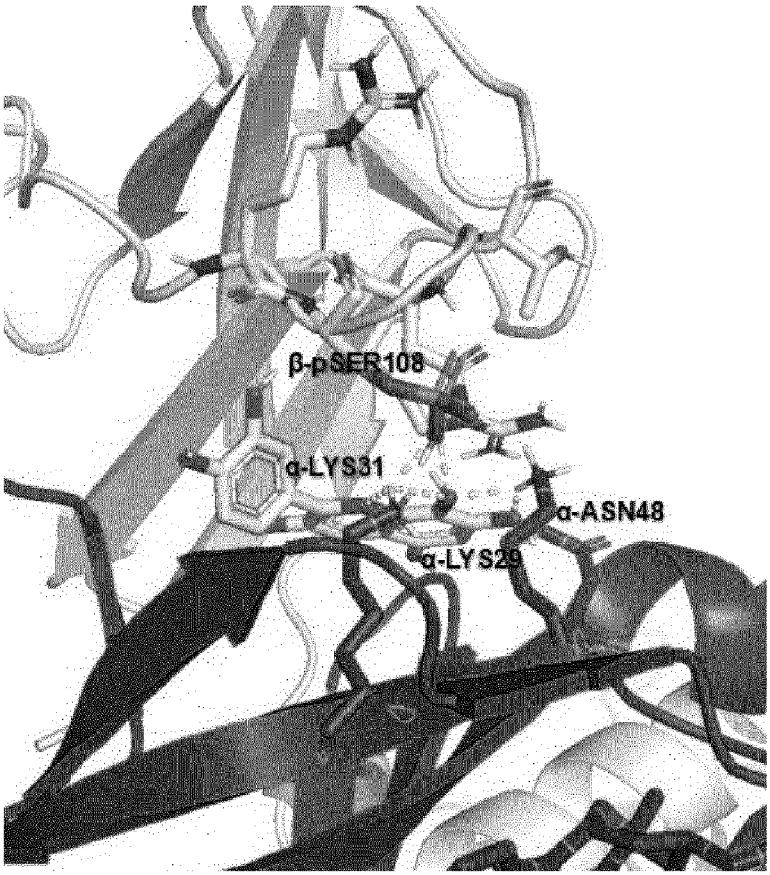
[도2]


p-AMPK / t-AMPK
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
MCD
MCD+고시페틴

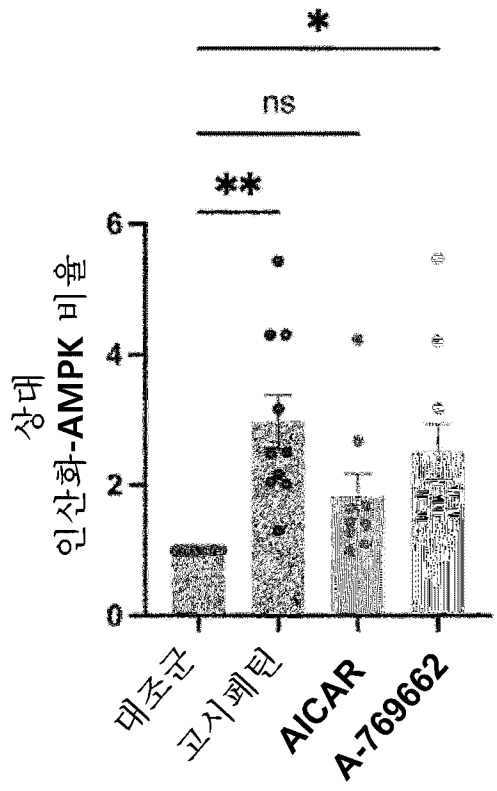
[도3]


인풋(3%)
DMSO
고시페린
IB : AMPK
IB : GAPDH

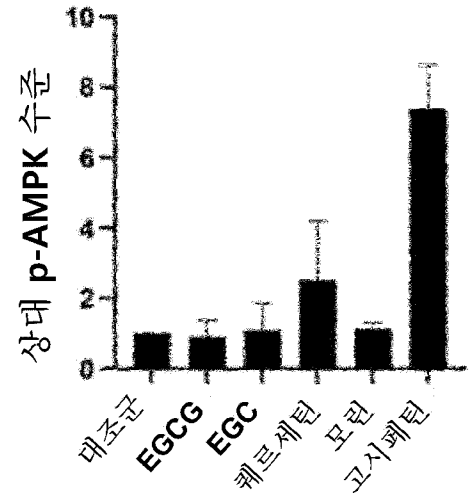
[도4]


β-pSER108
α-LYS31
α-ASN48
α-LYS29

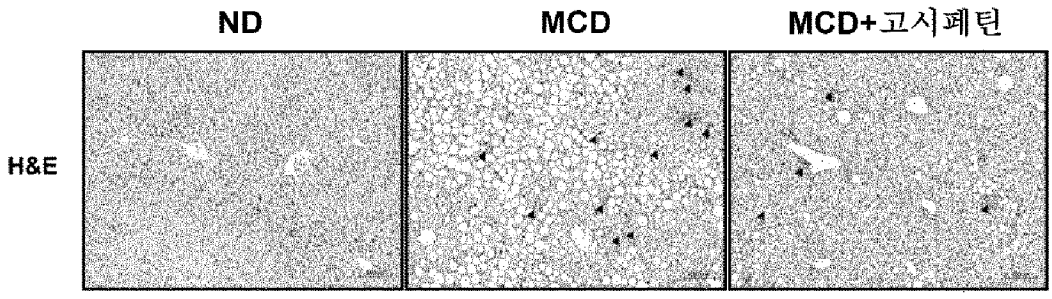
[도5]


*
ns
**
상대 인산화-AMPK 비율
6
4
2
0
대조군
고시페틴
AICAR
A-769662

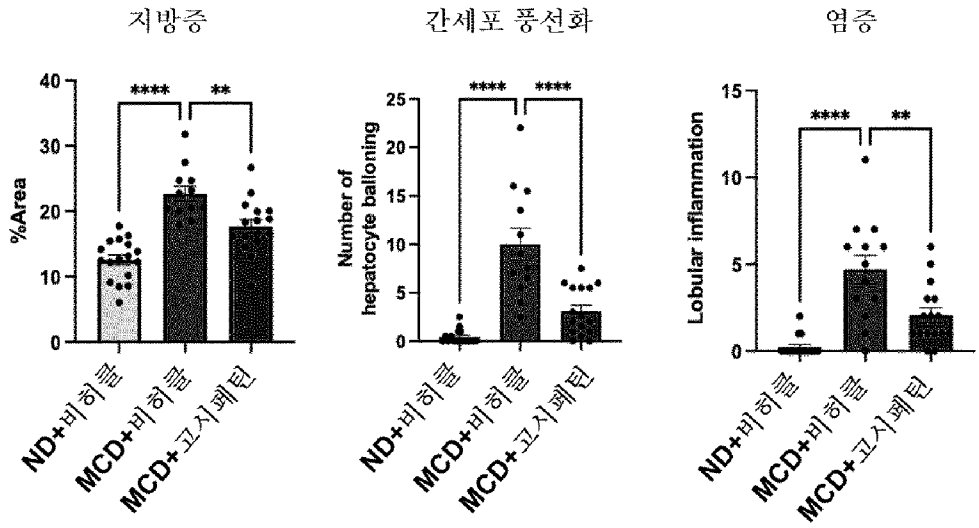
[도6]


상대 p-AMPK 수준
10
8
6
4
2
0
대조군
EGCG
EGC
퀘르세틴
모린
고시페틴

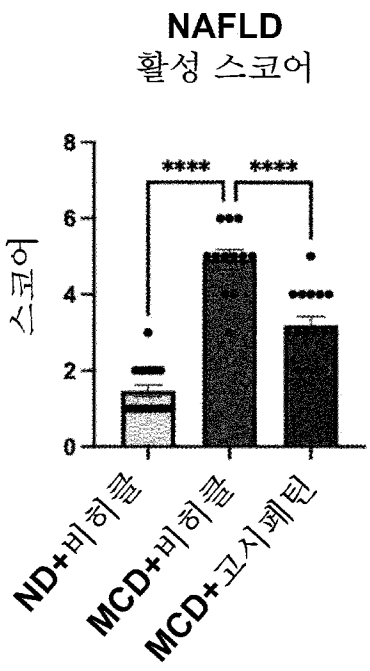
[도7]


ND
MCD
MCD+고시페틴
H&E

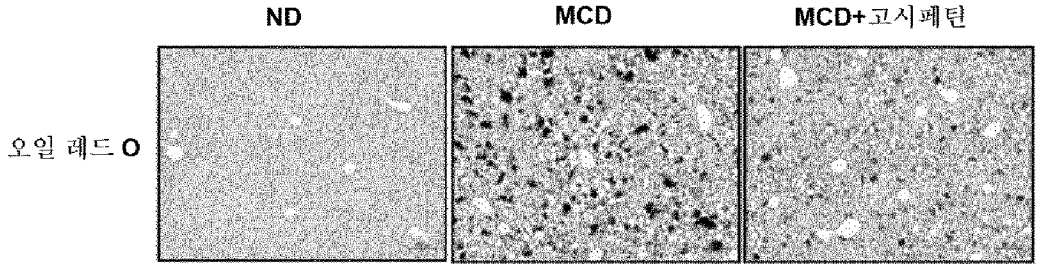
[도8]


지방증
간세포 풍선화
염증
%Area
Number of hepatocyte ballooning
Lobular inflammation
****
**
ND+비히클
MCD+비히클
MCD+고시페틴

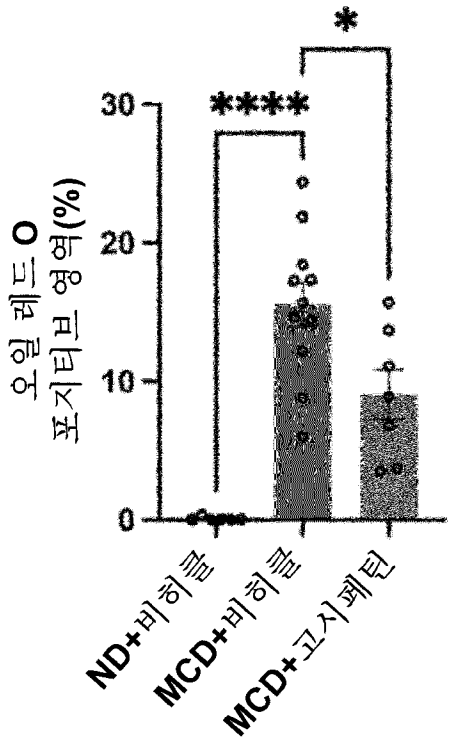
[도9]


NAFLD
활성 스코어
스코어
****
ND+비히클
MCD+비히클
MCD+고시페틴

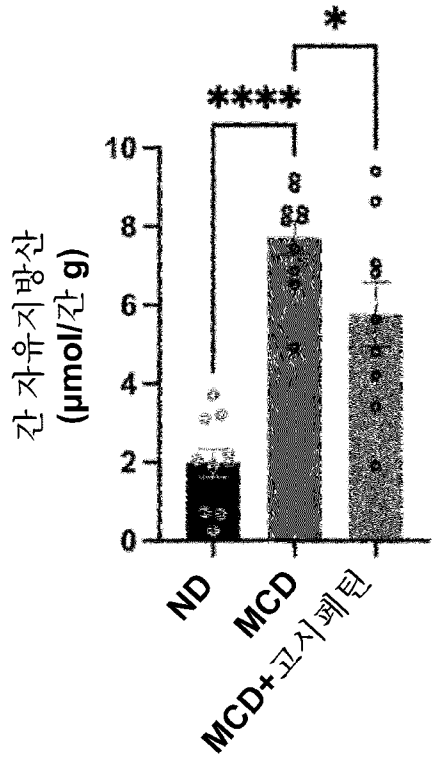
[도10]


ND
MCD
MCD+고시페틴
오일 레드 O

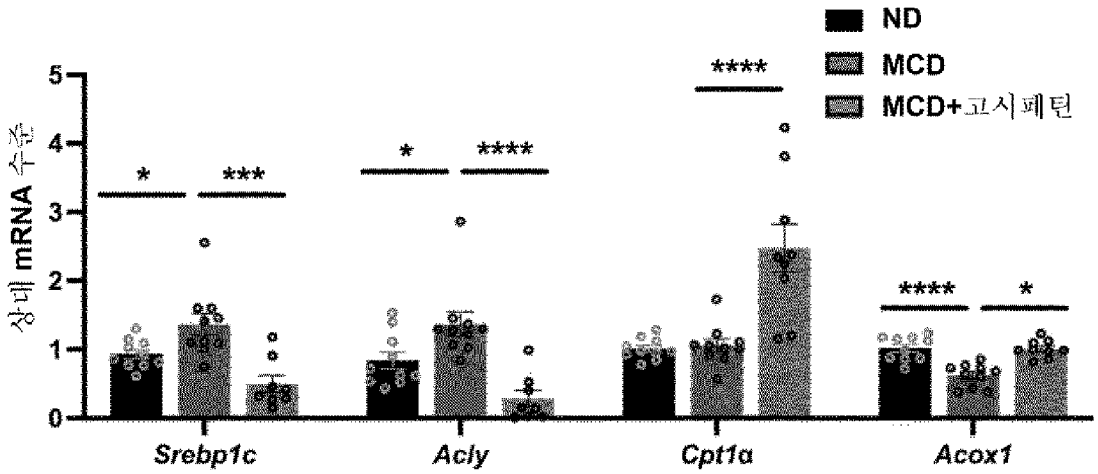
[도11]


오일 레드 O
포지티브 영역(%)
30
20
10
0
****
*
ND+비히클
MCD+비히클
MCD+고시페틴

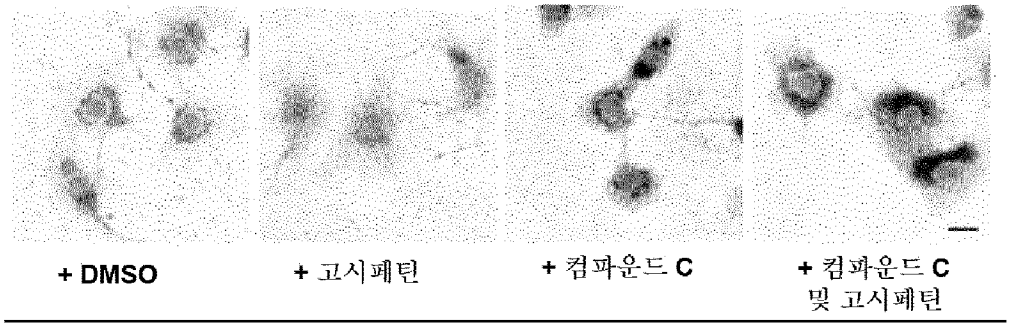
[도12]


간 자유지방산
(μmol/간 g)
10
8
6
4
2
0
****
*
ND
MCD
MCD+고시페틴

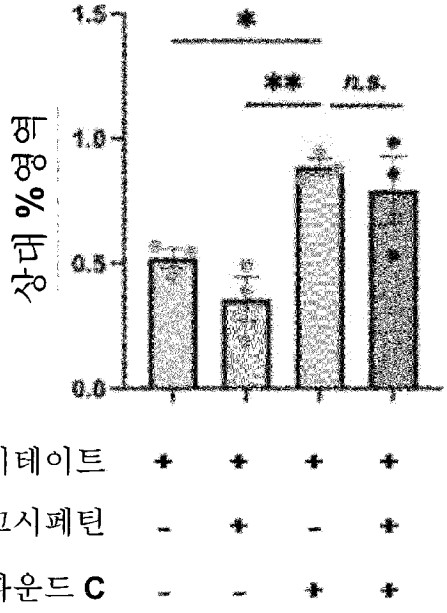
[도13]


ND
MCD
MCD+고시페틴
상대 mRNA 수준
0
1
2
3
4
5
*
***
*
****
****
****
*
Srebp1c
Acly
Cpt1α
Acox1

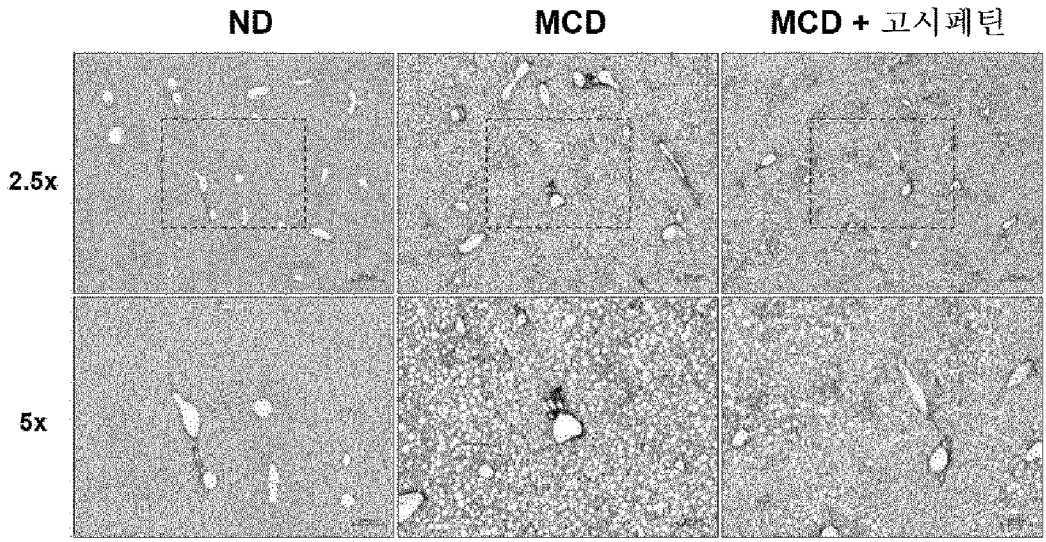
[도14]


+ DMSO
+ 고시페틴
+ 컴파운드 C
+ 컴파운드 C
및 고시페틴
+ 팔미테이트 (350 μM)

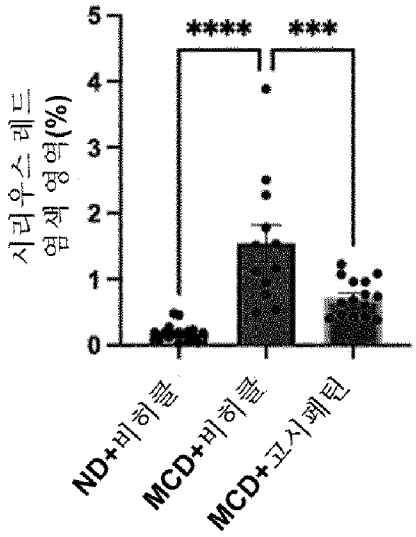
[도15]


상대 %영역
0.0
0.5
1.0
1.5
*
**
n.s.
팔미테이트 + + + +
고시페틴 - + - +
컴파운드 C - - + +

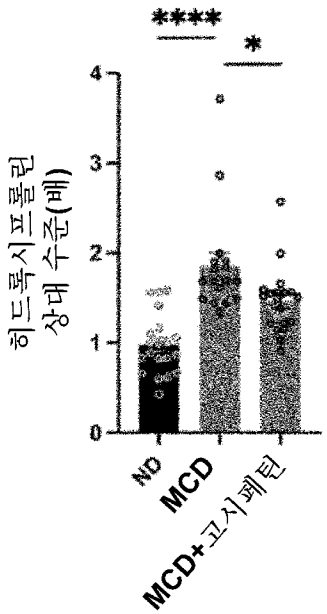
[도16]


ND
MCD
MCD + 고시페틴
2.5x
5x

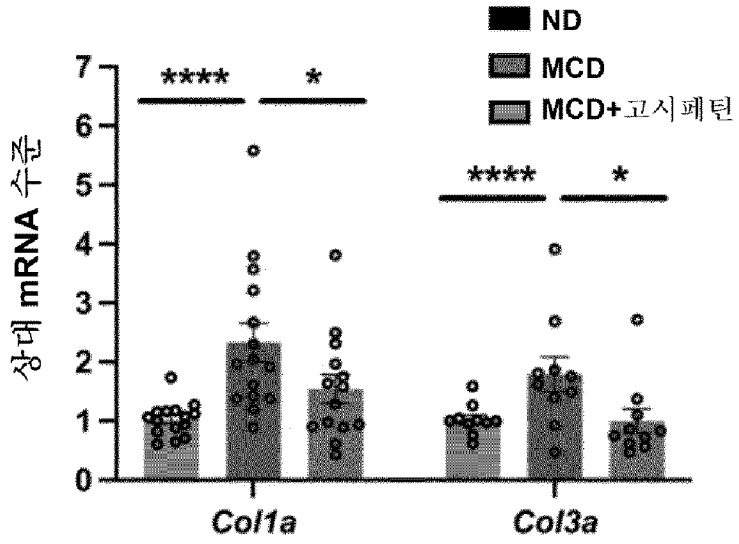
[도17]


****
***
시리우스 레드 염색 영역(%)
0
1
2
3
4
5
ND+비히클
MCD+비히클
MCD+고시페틴

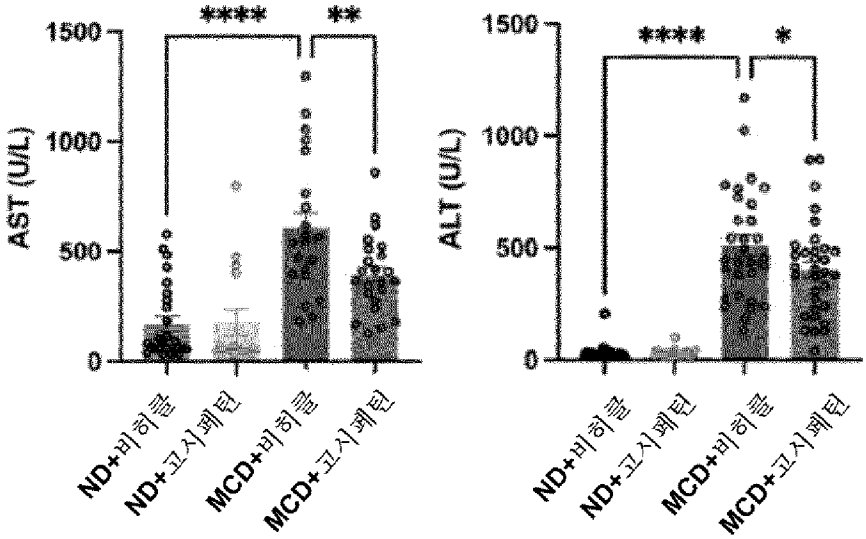
[도18]


****
*
히드록시프롤린 상대 수준(배)
0
1
2
3
4
ND
MCD
MCD+고시페틴

[도19]


ND
MCD
MCD+고시페틴
상대 mRNA 수준
0
1
2
3
4
5
6
7
****
*
****
*
Col1a
Col3a

[도20]


AST (U/L)
0
500
1000
1500
****
**
ALT (U/L)
0
500
1000
1500
****
*
ND+비히클
ND+고시페틴
MCD+비히클
MCD+고시페틴

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/012007

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/352(2006.01)i; **A61P 1/16**(2006.01)i; **A23L 33/10**(2016.01)i; **A23K 20/121**(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 31/352(2006.01); A61K 31/353(2006.01); A61K 31/455(2006.01); A61K 36/18(2006.01); A61K 38/47(2006.01); A61K 8/97(2006.01); A61P 25/16(2006.01); C07H 1/08(2006.01); C07H 17/00(2006.01); C07H 17/07(2006.01); C12N 1/20(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) & keywords: 고시페틴(gossypetin), 플라보노이드(flavonoid), AMPK(AMP-activated protein kinase), 지방간(fatty liver disease), 비알코올성 지방간(nonalcoholic fatty liver disease), 예방(prevention), 치료(treatment), 제약(drug), 식품(food), 사료(feed)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2014-070056 A (ORIZA YUKA KK) 21 April 2014 (2014-04-21) See abstract, claim 1, and paragraphs [0001]-[0002], [0007], [0021], [0024] and [0081].	1-8
A	CN 103880900 A (SHANDONG HERBAL TONE BIO-TECHNOLOGY CO., LTD.) 25 June 2014 (2014-06-25) See entire document.	1-8
A	KR 10-2009-0020697 A (LIBRAGEN) 26 February 2009 (2009-02-26) See entire document.	1-8
A	US 2012-0052053 A1 (MANNING-BOG, A. B. et al.) 01 March 2012 (2012-03-01) See entire document.	1-8

☑ 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
14 November 2023	**15 November 2023**

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.
A	US 2017-0216272 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE et al.) 03 August 2017 (2017-08-03) See entire document.	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2023/012007

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2014-070056 A	21 April 2014	None	
CN 103880900 A	25 June 2014	CN 103880900 B	30 March 2016
KR 10-2009-0020697 A	26 February 2009	CN 101611148 A	23 December 2009
		CN 101611148 B	16 March 2016
		CN 105838758 A	10 August 2016
		CN 105838758 B	06 March 2020
		EP 1867729 A1	19 December 2007
		EP 2027279 A2	25 February 2009
		EP 2027279 B1	18 April 2012
		JP 2009-540800 A	26 November 2009
		JP 5607925 B2	15 October 2014
		US 2009-0233876 A1	17 September 2009
		US 2011-0183930 A1	28 July 2011
		US 2014-0088030 A1	27 March 2014
		US 9828407 B2	28 November 2017
		WO 2007-144368 A2	21 December 2007
		WO 2007-144368 A3	18 June 2009
US 2012-0052053 A1	01 March 2012	CN 102245180 A	16 November 2011
		EP 2361089 A1	31 August 2011
		JP 2012-508740 A	12 April 2012
		JP 2015-127343 A	09 July 2015
		US 2015-0044193 A1	12 February 2015
		WO 2010-056413 A2	20 May 2010
US 2017-0216272 A1	03 August 2017	CN 101247793 A	20 August 2008
		CN 101247793 B	10 April 2013
		EP 1708689 A2	11 October 2006
		EP 1912632 A2	23 April 2008
		EP 2361618 A2	31 August 2011
		EP 2361618 A3	28 December 2011
		EP 3031461 A1	15 June 2016
		JP 2007-527418 A	27 September 2007
		JP 2009-500331 A	08 January 2009
		JP 2013-035867 A	21 February 2013
		JP 2015-187141 A	29 October 2015
		US 2005-0171027 A1	04 August 2005
		US 2006-0111435 A1	25 May 2006
		US 2010-0316679 A1	16 December 2010
		US 2012-0029065 A1	02 February 2012
		US 2015-0133396 A1	14 May 2015
		US 8017634 B2	13 September 2011
		US 8242171 B2	14 August 2012
		US 8846724 B2	30 September 2014
		US 9597347 B2	21 March 2017
		WO 2005-065667 A2	21 July 2005
		WO 2005-065667 A3	17 January 2008
		WO 2007-005453 A2	11 January 2007
		WO 2007-005453 A3	14 June 2007

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/012007

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/352(2006.01)i; **A61P 1/16**(2006.01)i; **A23L 33/10**(2016.01)i; **A23K 20/121**(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/352(2006.01); A61K 31/353(2006.01); A61K 31/455(2006.01); A61K 36/18(2006.01); A61K 38/47(2006.01); A61K 8/97(2006.01); A61P 25/16(2006.01); C07H 1/08(2006.01); C07H 17/00(2006.01); C07H 17/07(2006.01); C12N 1/20(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 내부 검색시스템) & 키워드: 고시페틴(gossypetin), 플라보노이드(flavonoid), AMPK(AMP-activated protein kinase), 지방간(fatty liver disease), 비알코올성 지방간(nonalcoholic fatty liver disease), 예방(prevention), 치료(treatment), 제약(drug), 식품(food), 사료(feed)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	JP 2014-070056 A (ORIZA YUKA KK) 2014.04.21 요약, 청구항 1, 단락 [0001]-[0002], [0007], [0021], [0024], [0081]	1-8
A	CN 103880900 A (SHANDONG HERBAL TONE BIO-TECHNOLOGY CO., LTD.) 2014.06.25 전체 문헌	1-8
A	KR 10-2009-0020697 A (리브라겐) 2009.02.26 전체 문헌	1-8
A	US 2012-0052053 A1 (MANNING-BOG, A. B. 등) 2012.03.01 전체 문헌	1-8
A	US 2017-0216272 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE 등) 2017.08.03 전체 문헌	1-8

☐ 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 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2023년11월14일(14.11.2023)	**2023년11월15일(15.11.2023)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2023/012007

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2014-070056 A	2014/04/21	없음	
CN 103880900 A	2014/06/25	CN 103880900 B	2016/03/30
KR 10-2009-0020697 A	2009/02/26	CN 101611148 A	2009/12/23
		CN 101611148 B	2016/03/16
		CN 105838758 A	2016/08/10
		CN 105838758 B	2020/03/06
		EP 1867729 A1	2007/12/19
		EP 2027279 A2	2009/02/25
		EP 2027279 B1	2012/04/18
		JP 2009-540800 A	2009/11/26
		JP 5607925 B2	2014/10/15
		US 2009-0233876 A1	2009/09/17
		US 2011-0183930 A1	2011/07/28
		US 2014-0088030 A1	2014/03/27
		US 9828407 B2	2017/11/28
		WO 2007-144368 A2	2007/12/21
		WO 2007-144368 A3	2009/06/18
US 2012-0052053 A1	2012/03/01	CN 102245180 A	2011/11/16
		EP 2361089 A1	2011/08/31
		JP 2012-508740 A	2012/04/12
		JP 2015-127343 A	2015/07/09
		US 2015-0044193 A1	2015/02/12
		WO 2010-056413 A2	2010/05/20
US 2017-0216272 A1	2017/08/03	CN 101247793 A	2008/08/20
		CN 101247793 B	2013/04/10
		EP 1708689 A2	2006/10/11
		EP 1912632 A2	2008/04/23
		EP 2361618 A2	2011/08/31
		EP 2361618 A3	2011/12/28
		EP 3031461 A1	2016/06/15
		JP 2007-527418 A	2007/09/27
		JP 2009-500331 A	2009/01/08
		JP 2013-035867 A	2013/02/21
		JP 2015-187141 A	2015/10/29
		US 2005-0171027 A1	2005/08/04
		US 2006-0111435 A1	2006/05/25
		US 2010-0316679 A1	2010/12/16
		US 2012-0029065 A1	2012/02/02
		US 2015-0133396 A1	2015/05/14
		US 8017634 B2	2011/09/13
		US 8242171 B2	2012/08/14
		US 8846724 B2	2014/09/30
		US 9597347 B2	2017/03/21
		WO 2005-065667 A2	2005/07/21
		WO 2005-065667 A3	2008/01/17
		WO 2007-005453 A2	2007/01/11
		WO 2007-005453 A3	2007/06/14