(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0014719
(43) 공개일자 2015년02월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/47 (2006.01) *A61K 31/015* (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0090303
(22) 출원일자 2013년07월30일
심사청구일자 2013년07월30일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
장기철
경상남도 사천시 대곡1길 85 대곡리 255번지
(74) 대리인
이원희

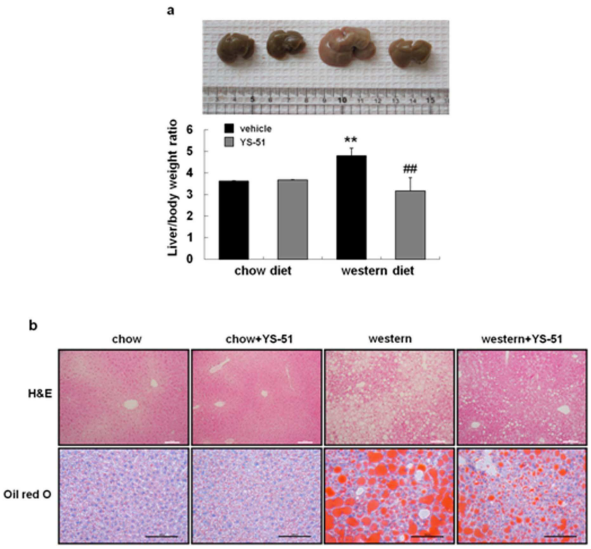
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **테트라하이드로이소퀴놀린 알칼로이드계 화합물 ＹＳ－５１Ｓ를 포함하는 대사성 질환의 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 테트라하이드로이소퀴놀린(tetrahydroisoquinoline) 알칼로이드계 화합물 YS-51S를 포함하는 대사성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물, 및 건강식품에 관한 것으로, 구체적으로, 고지방식이로 인한 지방간에 대한 YS-51S의 활성에 대하여 연구한 결과, 비알코올성 지방간에서 중성지방 함량, 혈액응고 매개인자 발현, 섬유소 침착, 혈중 콜레스테롤, LDH 및 ALT 수치가 모두 증가한 반면, YS-51S를 섭취한 경우에는 이러한 이상 현상이 모두 억제되었을 뿐만 아니라, YS-51S이 간의 섬유화 매개 인자(TGF-β 및 프로콜라겐 유형 1), 유리 지방산 유입 관여 인자(CD36) 및 지방산 합성 매개 인자(SCD-1 및 SREBP-1c)의 발현을 억제하고 인슐린 저항성을 완화함을 확인함으로써, 상기 YS-51S를 대사성 질환의 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다.

대 표 도 - 도1

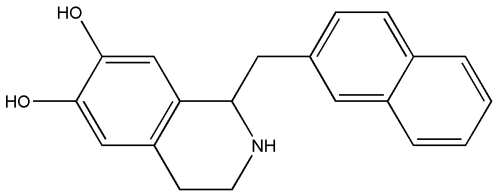


특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 테트라하이드로이소퀴놀린(tetrahydroisoquinoline) 알칼로이드(alkaloid)계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 또는 이의 합병증 예방 및 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 대사성 질환은 지방간, 당뇨, 고지혈증, 동맥경화 및 비만으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 대사성 질환 또는 이의 합병증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 대사성 질환은 비알코올성 지방간인 것을 특징으로 하는 대사성 질환 또는 이의 합병증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

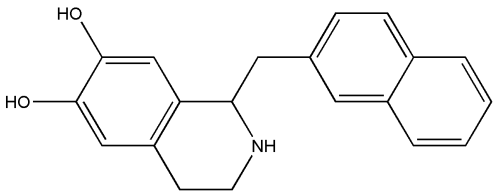
청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 합병증은 관상 동맥 질환, 협심증, 경동맥 질환, 뇌졸증, 뇌동맥경화증, 고콜레스테롤증, 콜레스테롤 결석, 고중성지방혈증, 고혈압, 백내장, 신장질환, 신경장애, 만성 염증성 장애 및 감염증으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 어느 하나인 것을 특징으로 하는 대사성 질환 또는 이의 합병증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 테트라하이드로이소퀴놀린 알칼로이드계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 또는 이의 합병증 예방 및 개선용 건강식품:

[화학식 1]



.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 대사성 질환은 지방간, 당뇨, 고지혈증, 동맥경화 및 비만으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 대사성 질환 또는 이의 합병증 예방 및 개선용 건강식품.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 대사성 질환은 비알코올성 지방간인 것을 특징으로 하는 대사성 질환 또는 이의 합병증 예방 및 개선용 건강식품.

청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 합병증은 관상 동맥 질환, 협심증, 경동맥 질환, 뇌졸증, 뇌동맥경화증, 고콜레스테롤증, 콜레스테롤 결석, 고중성지방혈증, 고혈압, 백내장, 신장질환, 신경장애, 만성 염증성 장애 및 감염증으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 어느 하나인 것을 특징으로 하는 대사성 질환 또는 이의 합병증 예방 및 개선용 건강식품.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 테트라하이드로이소퀴놀린(tetrahydroisoquinoline) 알칼로이드계 화합물 YS-51S를 포함하는 대사성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물, 및 건강식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 지방간 질환(fatty liver disease)은 지방간이라고도 불리며 간세포에 중성지방과 같은 지방이 이상 축적되는 것에 기인하여 간장해를 초래하는 질환이다. 초기 병태는 간세포에 지방 침착만을 인정하는 단순성 지방간이며, 그 후에 간섬유증을 포함하는 지방간염, 또한 간경변이나 간암으로 병태가 진행되는 것이 알려져 있다.

[0003] 일반적으로, 간에 지방이 침착되는 원인은 알코올 섭취, 비만, 당뇨병, 지질대사 이상, 약제(스테로이드, 테트라사이클린 등), 쿠싱(Cushing) 증후군, 중독(황린 등), 고도의 영양 장해 등이 있다. 지방간 질환의 원인은 크게 알코올성과 비알코올성으로 분류하며, 전자는 알코올성 지방간 질환(알코올성 간장해), 후자는 비알코올성 지방간 질환(nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD)이라고 부른다. 알코올성 지방간 질환은 초기의 단순성 지방간으로부터 진행성으로 지방간염, 간경변으로 이행하는 한편, 비알코올성 지방간 질환은 단순성 지방간에 머물며 병태는 진행되지 않는 것으로 생각되고 있었지만, 최근, 비알코올성 지방간 질환에 있어서도 단순성 지방간으로부터 지방간염이나 간경변으로 병태가 진행되는 경우가 있는 것으로 보고되고 있다.

[0004] 구체적으로, 비알코올성 지방간 질환은 간에 유해할 정도로 인정되는 알코올 섭취 병력이 없음에도 불구하고 간조직 검사에서 알코올성 간염의 특징적인 소견인 지방성 변화(fatty change, steatosis)와 소엽성간염(lobular hepatitis, steatohepatitis) 등을 나타내는 경우를 일컫는다. 간의 병리소견은 단순 지방간(Non-Alcoholic Fatty Liver; NAFL)으로부터 지방간염(Non-Alcoholic Steatohepatits; NASH), 지방간염과 동반된 섬유화증, 간경변증 등의 다양한 스펙트럼을 나타내는데, 비알코올성 지방간 질환은 이 모두를 포함하는 의미로 사용된다.

[0005] 비알코올성 지방간 질환을 앓고 있는 환자들 대부분은 인슐린 저항성, 비만, 당뇨병 및 고지혈증을 동반하고 있다. 특히, 비알코올성 지방간 환자의 69~100%는 비만환자이고, 비만환자의 20~40%는 비알코올성 지방간을 동반하며, 특히, 남성 비만환자의 간질환 유병율이 여성 비만자에 비해 더 높게 나타난다. 현재까지 이들 환자에게 사용되고 있는 치료제는 크게 두 가지로, 첫 번째는 비만 치료제(orlistat), 인슐린 저항성 치료제(metformin, pioglitazone, rosiglitazone), 고지혈증 치료제(clofibrate, gemfibrozil, bezafibrate, atorvastatin, simvastatin) 등과 같이 위험인자의 교정을 통해 지방간을 치료 및 개선하는 약제이고, 두 번째는 비알코올성 지방간의 위험인자 교정과는 독립적으로 손상된 간세포 회복시키는 기능을 담당하는 약물로서 간세포보호제

(ursodeoxycholoc acid 및 taurine), 항산화제(vitamin E) 및 nutritional supporter(lecithin, betaine, N-acetylcysteine) 등이 여기에 해당된다. 그러나 현재까지는 비알코올성 지방간 질환에 대한 효과적인 약물치료는 없으나 다만 식사요법, 운동요법 등을 통한 체중감량 등의 기본적인 치료법만이 권고되고 있다. 특히, 비알코올성 지방간염은 간경변 또는 간세포암으로 진전될 가능성이 크기 때문에, 보다 적극적인 약물 치료가 필수적이며, 비알코올성 지방간염의 병태 발증 및 진행에 중요하다고 생각되고 있는 산화 스트레스나 인슐린 저항성 등의 개선을 목표로 한 치료도 시도되고 있지만, 아직까지 충분한 과학적 근거가 확립된 치료법이 없기에 비알코올성 지방간 질환에 대해 유효성이 높은 치료약의 개발이 요구되고 있는 현실이다. 또한, 앞으로 비알코올성 지방간 치료제 시장은 2015년 약 20~30억 달러로 전망되고 있다.

[0006] 테트라하이드로이소퀴놀린(tetrahydroisoquinoline; THI)계 화합물들은 N-알킬페닐에틸아민이 폐환(ring closing)된 상태의 물질로서, 특히 6,7-디하이드록시테트라하이드로이소퀴놀린들은 카테콜아민(catecholamine)의 기본 골격을 가지고 있다. 즉 에피네프린(epinephrine), 노르에피네프린(norepinephrine), 도파민(dopamine) 등으로 대표되는 카테콜아민의 기본골격인 3,4-디하이드록시페닐에틸아민을 구조상에 가진다. 따라서 많은 THI 계열 화합물들이 각종 아드레날린 수용체(adrenergic receptor)에 친화력을 보이며, 치환기의 종류 및 치환기의 결합 위치에 따라 α- 또는 β-수용체들에 작용하여 항진(agonistic) 효과 또는 길항(antagonistic) 효과를 나타냄으로써 THI 계열 화합물들의 여러 가지 약리 작용이 보고되고 있다.

[0007] 본 발명자는 하이게나민의 구조를 변화시켜 우수한 약리 효과를 나타내는 물질을 얻고자 노력한 결과, 작용 지속 시간이 매우 긴 신규 물질인 (에스)-6,7-디하이드록시-1-(α-나프틸메틸)-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린((S)-6,7-Dihydroxy-1-(α-naphthylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline) 및 (에스)-6,7-디하이드록시-1-(β-나프틸메틸)-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린((S)-6,7-Dihydroxy-1-(β-naphthylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline; YS-51S) 화합물을 합성하고, YS-51S을 함유하는 심부전증 치료제, 항혈전제, iNOS에 의한 조직 손상 억제제, 패혈증 치료제 또는 파종성 혈관 내 응고증 치료용 약학적 조성물로의 이용가능성에 대하여 알려진바 있다(대한민국 공개특허 2000-0028711호). 또한, 대한민국 공개특허 10-2011-0017282호는 YS-51S 화합물을 포함하는 동맥경화증 예방 및 치료용 조성물을 개시한 바 있고, Heo 등(Biochemical pharmacology 74 (2007) 1361-1370)이 YS 51S 화합물의 heme oxygenase-1로부터 유래된 일산화탄소를 통해 과산화수소로 유도된 손상으로부터 내피세포를 보호하는 활성이 보고한 바 있으나, YS-51S의 비알코올성 지방간에 대한 효과는 알려진 바 없다.

[0008] 이에, 본 발명자는, 비알코올성 지방간에 대한 YS-51S((S)-6,7-Dihydroxy-1-(β-naphthylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline)의 활성에 대하여 연구한 결과, 비알코올성 지방간에서 중성지방 함량, 혈액응고 매개 인자 발현, 섬유소 침착, 혈중 콜레스테롤, LDH 및 ALT 수치가 모두 증가한 반면, YS-51S를 섭취한 경우에는 이러한 이상 현상이 모두 억제되었을 뿐만 아니라, YS-51S이 간의 섬유화 매개 인자(TGF-β 및 프로콜라겐 유형 1(procollagen type 1)), 유리 지방산 유입 관여 인자(CD36) 및 지방산 합성 매개 인자(SCD-1 및 SREBP-1c)의 발현을 억제하고 인슐린 저항성을 완화함을 확인함으로써, 상기 YS-51S를 대사성 질환의 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 테트라하이드로이소퀴놀린(tetrahydroisoquinoline) 알칼로이드(alkaloid)계 화합물인 YS-51S((S)-6,7-Dihydroxy-1-(β-naphthylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline), 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 또는 이의 합병증 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 테트라하이드로이소퀴놀린 알칼로이드계 화합물인 YS-51S, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 또는 이의 합병증 예방 및 개선용 건강식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 테트라하이드로이소퀴놀린(tetrahydroisoquinoline) 알칼로이드(alkaloid)계 화합물인 YS-51S((S)-6,7-Dihydroxy-1-(β-naphthylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline), 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 또는 이의 합병증 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 테트라하이드로이소퀴놀린 알칼로이드계 화합물인 YS-51S, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 또는 이의 합병증 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 테트라하이드로이소퀴놀린 알칼로이드계 화합물인 YS-51S는 비알코올성 지방간에서 증가되는 중성지방 함량, 혈액응고 매개인자 발현, 섬유소 침착, 혈중 콜레스테롤, LDH 및 ALT 수치를 유의적으로 억제하고, 간의 섬유화 매개 인자(TGF-β 및 프로콜라겐 유형 1(procollagen type 1)), 유리 지방산 유입 관여 인자(CD36) 및 지방산 합성 매개 인자(SCD-1 및 SREBP-1c)의 발현을 억제하며, 인슐린 저항성을 완화함으로써, 상기 YS-51S를 대사성 질환의 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 1)일반 식단에 비이클(vehicle) 투여군 , 2)일반식단에 YS-51S 투여군, 3)서양식단에 비이클 투여군, 4)서양식단에 YS-51S 화합물 투여군, 총 네 그룹에 대하여 간지방증(hepatic steatosis) 발달에 대한 YS-51S의 효과를 나타내고자 (a) 간 크기 비교 사진 및 전체 체중에 대한 간 무게 및 (b) H&E 및 오일 레드 오(Oil red O)로 염색한 간 조직을 나타낸 도이다:

chow 또는 chow diet: 일반 식이군(비이클 투여 또는 YS51S 투여);

western 또는 western diet: 서양 식이군(비이클 투여 또는 YS51S 투여);

**: 일반 식이군 마우스(chow diet-fed mice)와 비교한 결과 $P < 0.01$인 경우;

$^{\#\#}$: 서양 식이군 마우스(western diet-fed mice)와 비교한 결과 $P < 0.01$인 경우; 및

스케일 바(Scale bar) = 100 μm.

도 2는 상기에서 언급한 실험 4개 군 마우스에서 간 중성지방(Hepatic Triglyceride) 및 혈청 콜레스트롤(Cholesterol) 수준에 대한 YS-51S의 효과를 나타낸 도이다:

chow diet: 일반 식이군(비이클 투여 또는 YS51S 투여);

western diet: 서양 식이군(비이클 투여 또는 YS51S 투여);

**: 일반 식이군 마우스와 비교한 결과 비교한 결과 $P < 0.01$인 경우;

$^{\#}$: 서양 식이군 마우스와 비교한 결과 $P < 0.05$인 경우; 및

vihicle: 비이클, 즉 YS-51S 화합물의 무처리군.

도 3은 상기에서 언급한 실험 4개 군 마우스에서 LDH(serum lactate dehydrogenase) 및 ALT(alanine aminotransferase) 수준에 대한 YS-51S의 효과를 나타낸 도이다:

chow diet: 일반 식이군(비이클 투여 또는 YS51S 투여);

western diet: 서양 식이군(비이클 투여 또는 YS51S 투여);

*: 일반 식이군 마우스와 비교한 결과 $P < 0.05$인 경우;

**: 일반 식이군 마우스와 비교한 결과 $P < 0.01$인 경우; 및

#: 서양 식이군 마우스와 비교한 결과 $P < 0.05$인 경우.

도 4는 상기에서 언급한 실험 4개 군 마우스에서 혈청(serum) 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines) 수준 및 간 대식세포 침투에 대한 YS-51S의 효과를 나타낸 도이다:

vihicle: 비이클, YS-51S의 무처리군;

chow diet: 일반 식이군(비이클 투여 또는 YS51S 투여);

western diet: 서양 식이군(비이클 투여 또는 YS51S 투여);

*: 일반 식이군 마우스와 비교한 결과 $P < 0.05$인 경우;

#: 서양 식이군 마우스와 비교한 결과 $P < 0.05$인 경우; 및

스케일 바 = 100 ㎛.

도 5는 상기에서 언급한 실험 4개 군 마우스에서 전염증성 유전자 발현에 대한 YS-51S의 효과를 나타낸 도이다:

vihicle: 비이클, YS-51S의 무처리군;

chow 또는 chow diet: 일반 식이군(비이클 투여 또는 YS51S 투여);

western 또는 western diet: 서양 식이군(비이클 투여 또는 YS51S 투여);

*: 일반 식이군 마우스와 비교한 결과 $P < 0.05$인 경우; 및

#: 서양 식이군 마우스와 비교한 결과 $P < 0.05$인 경우.

도 6은 상기에서 언급한 실험 4개 군 마우스에서 전 섬유 형성(fibrogenic) 유전자(TGF-β 및 Procollagen type 1) 발현에 대한 YS-51S의 효과를 나타낸 도이다:

GAPDH: 양성 대조군;

vihicle: 비이클, YS-51S의 무처리군;

chow 또는 chow diet: 일반 식이군(비이클 투여 또는 YS51S 투여);

western 또는 western diet: 서양 식이군(비이클 투여 또는 YS51S 투여);

*: 일반 식이군 마우스와 비교한 결과 $P < 0.05$인 경우; 및

#: 서양 식이군 마우스와 비교한 결과 $P < 0.05$인 경우.

도 7은 상기에서 언급한 실험 4개 군 마우스에서 응고(coagulation) 관련 유전자 발현(Tissue factor; TF) 및 섬유소 침착(fibrin deposition) 관련 유전자 발현(PAI-1)에 대한 YS-51S의 효과를 나타낸 도이다:

GAPDH: 양성 대조군;

vihicle: 비이클, YS-51S의 무처리군;

chow 또는 chow diet: 일반 식이군(비이클 투여 또는 YS51S 투여);

western 또는 western diet: 서양 식이군(비이클 투여 또는 YS51S 투여);

*: 일반 식이군 마우스와 비교한 결과 $P < 0.05$인 경우;

#: 서양 식이군 마우스와 비교한 결과 $P < 0.05$인 경우; 및

스케일 바 = 100 ㎛.

도 8은 상기에서 언급한 실험 4개 군 마우스에서 PAR-1 유전자 발현에 대한 YS-51S의 효과를 나타낸 도이다:

GAPDH: 양성 대조군;

vihicle: 비이클, YS-51S의 무처리군;

chow 또는 chow diet: 일반 식이군(비이클 투여 또는 YS51S 투여);

western 또는 western diet: 서양 식이군(비이클 투여 또는 YS51S 투여);

*: 일반 식이군 마우스와 비교한 결과 $P < 0.05$인 경우; 및

#: 서양 식이군 마우스와 비교한 결과 $P < 0.05$인 경우.

도 9는 상기에서 언급한 실험 4개 군 마우스의 간에서 리포제닉(lipogenic) 유전자 발현(CD36, SCD-1, SREBP-1c)에 대한 YS-51S의 효과를 나타낸 도이다:

GAPDH: 양성 대조군;

vihicle: 비이클, YS-51S의 무처리군;

chow 또는 chow diet: 일반 식이군(비이클 투여 또는 YS51S 투여);

western 또는 western diet: 서양 식이군(비이클 투여 또는 YS51S 투여);

*: 일반 식이군 마우스와 비교한 결과 $P < 0.05$인 경우; 및

#: 서양 식이군 마우스와 비교한 결과 $P < 0.05$인 경우.

도 10은 상기에서 언급한 실험 4개 군 마우스에서 물질 대사 지표(GTT 및 ITT)에 대한 YS-51S의 효과(x축: 주입 후 시간(단위: 분), y축: 혈액 내 글루코스 수준)를 나타낸 도이다:

chow 또는 chow diet: 일반 식이군(비이클 투여 또는 YS51S 투여);

western 또는 western diet: 서양 식이군(비이클 투여 또는 YS51S 투여);

*: 일반 식이군 마우스와 비교한 결과 $P < 0.05$인 경우;

**: 일반 식이군 마우스와 비교한 결과 $P < 0.01$인 경우;

#: 서양 식이군 마우스와 비교한 결과 $P < 0.05$인 경우;

##: 서양 식이군 마우스와 비교한 결과 $P < 0.01$인 경우; 및

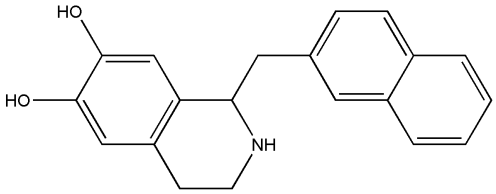
스케일 바 = 100 μm.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0016] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 테트라하이드로이소퀴놀린(tetrahydroisoquinoline) 알칼로이드(alkaloid)계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 또는 이의 합병증 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[0017] [화학식 1]

[0018] 

.

[0019] 상기 테트라하이드로이소퀴놀린 알칼로이드계 화합물계 화합물은 (S)-6,7-디하이드록시-1-(베타-나프틸메틸)-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린((S)-6,7-Dihydroxy-1-(β-naphthylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline; YS-51S; YS51S)이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 상기 대사성 질환은 지방간, 당뇨, 고지혈증, 동맥경화 및 비만으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 상기 지방간은 비알코올성 지방간인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 상기 합병증은 관상 동맥 질환, 협심증, 경동맥 질환, 뇌졸증, 뇌동맥경화증, 고콜레스테롤증, 콜레스테롤 결석, 고중성지방혈증, 고혈압, 백내장, 신장질환, 신경장애, 만성 염증성 장애 및 감염증으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 고지방성분으로 구성된 서양 식단을 섭취하여 비알콜성 지방간이 발달한 마우스에서 테트라하이드로이소퀴놀린 알칼로이드계 화합물인 YS51S의 활성을 확인한 결과, 본 발명의 YS51S가 간의 크기 및 무게 감소와 같은 물리적 효과뿐만 아니라 혈청 내 중성지방 및 콜레스트롤 함량, LDH 및 ALT 수치도 감소시킴을 확인하였다(도 1 내지 도 3 참조). 또한, 비알코올성 지방간이 발달한 마우스의 간에서 염증 및 응고에 대한 본 발명의 YS51S의 효과를 확인한 결과, 화합물 YS51S가 전염증성 사이토카인의 발현 수준 및 대식세포 침투(infiltration)를 억제하고(도 4 및 도 5 참조), 섬유 형성 및 응고 관련 유전자의 발현 및 섬유소 침착을 억제함을 확인하였다(도 6 내지 도 8 참조). 게다가, 본 발명의 YS51S가 지방간 세포에서 증가한 리포제닉 유전자의 발현의 감소 및 인슐린 저항성 증가 효과를 지님을 확인하였다(도 9 및 도 10 참조).

[0024] 따라서, 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 테트라하이드로이소퀴놀린 알칼로이드계 화합물인 YS-51S, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 고지방식이로 인한 비알코올성 지방간에서 중성지방 함량, 혈액응고 매개인자 발현, 섬유소 침착, 혈중 콜레스테롤, LDH 및 ALT 수치가 모두 억제되었을 뿐만 아니라, 상기 YS-51S이 간의 섬유화 매개 인자(TGF-β 및 프로콜라겐 유형 1), 유리 지방산 유입 관여 인자(CD36) 및 지방산 합성 매개 인자(SCD-1 및 SREBP-1c)의 발현을 억제하고 인슐린 저항성을 완화함을 확인함으로써, 본 발명의 YS-51S를 대사성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다.

[0025] 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 테트라하이드로이소퀴놀린 알칼로이드계 화합물은 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다.

[0026] 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이

트를 포함한다.

[0027] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 화학식 1의 테트라하이드로이소퀴놀린 알칼로이드계 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토나이트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다.

[0028] 동량의 화학식 1의 테트라하이드로이소퀴놀린 알칼로이드계 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0029] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속 염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0030] 본 발명의 약학적 조성물은 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염, 완충제 등의 약학적 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 함유할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화할 수 있다.

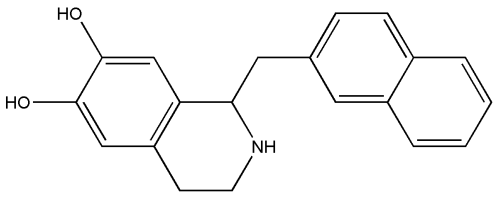
[0031] 경구 투여용 제형으로는 예를 들어 정제, 환제, 경질 및 연질 캅셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로오스 및 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및 폴리에틸렌 글리콜)를 함유하고 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제, 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제 등의 약학적 첨가제를 함유할 수 있다. 정제는 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다. 또한 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다.

[0032] 또한, 본 발명의 조성물은 기존의 치료제와 병합 투여될 수 있으며, 이 경우 동시 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 표면에 전달하는 임의의 방식으로 개체에게 투여될 수 있다. 적합한 비경구 투여경로는 혈관 내 투여(예: 정맥 내 볼루스 주사, 정맥 내 주입, 동맥 내 볼루스 주사, 동맥 내 주입, 맥관 내로의 카테터 점적 주입), 피하 주입을 포함하는 피하 주사 또는 침착(deposition)(예: 삼투압 펌프 이용), 조직 주위 및 조직 내 투여 또는 침착 등을 포함한다.

[0033] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 성별, 연령, 건강상태, 체중, 투여 방법과 횟수, 표적 조직이나 세포 등 다양한 요인을 고려하여 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 각 치료에 요구되는 총 용량은 수회 용량 또는 일회량으로 투여될 수 있다.

[0034] 또한 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 테트라하이드로이소퀴놀린 알칼로이드계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 또는 이의 합병증 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다:

[0035] [화학식 1]

[0036] 

.

[0037] 상기 대사성 질환은 지방간, 당뇨, 고지혈증, 동맥경화 및 비만으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 상기 지방간은 비알코올성 지방간인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 상기 합병증은 관상 동맥 질환, 협심증, 경동맥 질환, 뇌졸증, 뇌동맥경화증, 고콜레스테롤증, 콜레스테롤

결석, 고중성지방혈증, 고혈압, 백내장, 신장질환, 신경장애, 만성 염증성 장애 및 감염증으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 테트라하이드로이소퀴놀린 알칼로이드계 화합물인 YS-51S, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 고지방식이로 인한 비알코올성 지방간에서 중성지방 함량, 혈액응고 매개인자 발현, 섬유소 침착, 혈중 콜레스테롤, LDH 및 ALT 수치가 모두 억제되었을 뿐만 아니라, 상기 YS-51S이 간의 섬유화 매개 인자(TGF-β 및 프로콜라겐 유형 1), 유리 지방산 유입 관여 인자(CD36) 및 지방산 합성 매개 인자(SCD-1 및 SREBP-1c)의 발현을 억제하고 인슐린 저항성을 완화함을 확인함으로써, 본 발명의 YS-51S를 대사성 질환의 예방 및 개선용 건강식품으로 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다.

[0041] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0042] 본 발명의 테트라하이드로이소퀴놀린 알칼로이드계 화합물인 YS-51S는 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0043] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 g 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0044] 상기 외에 본 발명의 테트라하이드로이소퀴놀린 알칼로이드계 화합물인 YS-51S는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 테트라하이드로이소퀴놀린 알칼로이드계 화합물인 YS-51S는 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0045] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 테트라하이드로이소퀴놀린 알칼로이드계 화합물인 YS-51S은 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0046] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0047] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것을 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0048] **<실시예 1> 마우스 사육 조건**

[0049] 수컷 C57BL/6N 마우스는 KOATECH(평택, 대한민국)으로부터 제공받았고, 국립 경상대학교 동물 보호 위원회(Institutional Animal Care Committee)로부터 승인받았다. 실험군은 네 군으로 나누어 1) 일반 식이군(chow diet) 및 비이클 투여군, 2) 일반 식이 및 YS-51S 투여군, 3) 서양 식이군(western diet) 및 비이클 투여군, 4) 서양 식이 및 YS-51S 투여군이며, 수컷 마우스(7 주 생)을 사용하였다. 16 주 동안 복강 내(intraperitoneal) 주입을 통해서 약물 투여군(일반식이군 및 서양식이군)에는 매일 YS-51S(10 mg/kg)을, 대조

군(일반식이군 및 서양식이군)에는 비이클(vihicle)을 처리하였다. 테트라하이드로이소퀴놀린 알칼로이드계 화합물인 YS-51S는 Yun-Choi 등, 대한민국 공개특허 10-0512184호에 설명된 것에 따라 합성하였다. 상기 일반 식단을 Harlan 연구실(서울, 한국)으로부터 구입하였고, 이는 지방 18%, 단백질 24%, 및 탄수화물 58%을 함유한다. 상기 서양 식단을 Research diets(New Brunswick, NJ)로부터 구입하였고, 이는 지방 60, 단백질 20%, 및 탄수화물 20%을 함유한다.

[0050] **<실시예 2> 서양 식이군 마우스에서 YS-51S의 간지방증(hepatic steatosis)의 억제 활성 확인**

[0051] **<2-1> 간 크기 및 무게 측정**

[0052] 서양 식단을 섭취함으로써 발달하는 간지방증에 대하여 YS-51S 화합물의 효과를 알아보기 위하여, 간의 크기 및 무게에 대한 정량적 분석을 수행하였다.

[0053] 구체적으로, C57BL/6N 마우스는 상기 <실시예 1>와 같이 일반 식단 또는 서양 식단을 각각 섭취하도록 하였고, 그룹 당 15 마리씩으로 하고, 비이클(vehicle) 또는 YS-51S((S)-6,7-Dihydroxy-1-(β-naphthylmethyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline) 화합물 10 mg/kg을 복강 내 주입을 통해서 16 주 동안 처리하였다. 각 그룹에 대하여 대표 간 크기, 및 체중에 대한 간 무게의 비율을 측정하고, 측정한 데이터를 통계학적으로 분석하였고, 통계학적인 분석은 시그마플롯(SigmaPlot) 소프트웨어를 사용하였다(Systat Software, Inc., San Jose, CA). 또한 일반 식이군 및 서양 식이군의 데이터 세트 간 차이를 Newman-Keuls 테스트에 의한 분산의 한 방향 분석법(one-way analysis)으로 분석하였다. 데이터는 평균 + 표준편차로 제시하였고, $P<0.05$인 경우 통계학적으로 유의미한 것으로 간주하였다.

[0054] 그 결과, 도 1a에 나타낸 바와 같이, 서양 식이에 의해 유도된 비만은 일반 식이군 마우스의 간에 비해 간지방증의 뚜렷한 발달을 초래함을 확인하였다. 또한, 서양 식단만을 투여한 마우스와 비교하여 서양 식단 및 YS-51S을 투여한 마우스는 체중에 대한 간 무게의 비율이 상당히 감소됨을 확인하였다(도 1a).

[0055] **<2-2> 간 조직 염색을 통한 지방 발달 정도 확인**

[0056] 간 조직의 지방 발달에 대한 YS-51S의 효과를 분석하기 위해, 간 조직 부분에 헤마톡실린(hematoxylin) 및 에오신(eosin) 및 오일 레드 오 염색(Oil red O staining)을 수행하였다.

[0057] 구체적으로, 상기 실시예 <2-1>과 동일한 방법으로 마우스 5 마리씩을 한 그룹으로 하여 각각 일반 식단+비이클, 일반 식단+YS-51S, 서양 식단+비이클 또는 서양 식단+YS-51S을 섭취하도록 하였다. 이들의 간 조직에 지방 발달을 확인하고자 H&E(헤마톡실린 및 에오신) 염색을 수행하기 위해, 먼저 파라핀에 간 조직을 고정시킨 다음 5 μm으로 잘랐다. 파라핀에서 분리한 다음, 슬라이드는 헤마톡실린(Sigma-Aldrich)으로 상온에서 15분 동안 염색하였다. 세척한 다음, 상기 슬라이드를 1% HCl에서 3 초, 그리고 나서 에오신(Sigma-Aldrich)으로 1분 동안 염색하였다. 상기 슬라이드 위에 Permount(Sigma-Aldrich)를 올리고, CKX41 광학 현미경(Olympus)을 이용하여 시각화하였다. 또한, 오일 레드 오 염색을 실시하기 위해, 먼저 동결 간 조직을 8 μm으로 자른 다음 포르말린 10%로 고정시켰다. 60% 이소프로판올로 헹군 다음, 0.35% 오일 레드 오(Sigma-Aldrich)로 상온에서 10 분 동안 염색하고, 그 후 메이어스 헤마톡실린(Mayer's Hematoxylin)으로 5분 동안 염색하였다. 슬라이드를 수용성 마운턴트(mountant)(Biomeda corp., Foster city, CA)에 올리고 CKX41 광학 현미경에서 시각화하였다.

[0058] 그 결과, 도 1b에 나타낸 바와 같이, 조직학적(Histological) 분석을 통해, YS-51S와 함께 서양 식단을 섭취한 마우스의 간에서 큰 액포(vacuole) 생산 및 지질 축적이 감소한 것을 확인하였다(도 1b).

[0059]

[0060] **<실시예 3> 간 중성지방(triglyceride) 함량 및 상처 정도에 대한 YS-51S 활성 확인**

[0061] **<3-1> 간 중성지방 및 혈청 내 콜레스테롤 함량 확인**

[0062] 상기 <실시예 2>의 조직학적 분석 결과에 따라, 간 조직 내의 지방 성분을 확인하기 위하여, 간 중성지방 및 혈청 콜레스테롤 함량을 측정하였다.

[0063] 구체적으로, 간지방증(steatosis)의 마커인 간 중성지방 및 혈청 콜레스테롤 함량을 측정하기 위하여, 상기 <실

시예 2>에서 사용한 마우스 네 그룹(일반 식단+비이클, 일반 식단+YS-51S, 서양 식단+비이클, 및 서양 식단+YS-51S)에서 4 내지 5 마리의 마우스로부터 수득한 간 조직 용해물(lysate)을 시료로 준비하였다. Salmon 등(Int J Obes. 9(6):443-449)이 사용한 방법을 따라 에탄올성(ethanolic) KOH에서 비누화(saponification)를 수행하였으며, $MgCl_2$을 포함한 중성화된(neutralized) 간 추출물을 사용하여 글리세롤(Sigma-Aldrich) 함량을 분석하였다. 간 중성지방 함량은 글리세롤 분석 방법을 따라 비누화를 수행하였다. 또한, 혈청 내 콜레스트롤 수치 측정은 콜레스테롤 검사 키트를 사용하여 표준 분광광도법적 절차를 따라 수행하였다.

[0064] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 간 중성지방 및 혈청 콜레스테롤 수준은 둘 다 서양 식단을 섭취한 마우스에서 유의적으로 그 수치가 증가하였으나, YS-51S 화합물과 함께 서양 식단을 섭취한 경우, 그 증가 정도가 감소하는 것을 확인함으로써, YS-51S 화합물이 지방증 발달을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다(도 2a 및 도 2b).

[0065] **<3-2> 혈청 내 LDH(serum lactate dehydrogenase) 및 ALT(alanine aminotransferase) 수준 확인**

[0066] 서양 식이군 마우스에서 지방증이 발달한 간의 상처(injury) 정도를 판단하기 위하여, 혈청 내 LDH 및 ALT 수준을 ChemiLab LDH, ALT 및 cholesterol 분석 키트(IVD Lab Co, Ltd, Uiwang, Korea)를 이용하여 확인하였다.

[0067] 구체적으로, 상기 <실시예 3>에서 이용한 네 그룹의 마우스로부터 각각 혈액 시료를 수집하여 준비하였다. 혈청 내 LDH 및 ALT 수준은 ChemiLab LDH, ALT 및 콜레스트롤 분석 키트(IVD Lab Co, Ltd, Uiwang, Korea)를 제조사의 지시에 따라 표준 분광광도법적(spetrophotometric) 절차를 수행하여 준비한 혈액 시료를 이용하여 측정하였다.

[0068] 그 결과, 간 중성지방 및 혈청 콜레스테롤 결과(도 2의)와 유사하게, 도 3에 나타낸 바와 같이, 서양 식이군 마우스와 비교하여 추가적으로 YS-51S도 함께 섭취한 그룹에서 혈청 내 LDH 및 ALT 수준도 유의적으로 감소함으로써 YS-51S의 간 상처에 대한 억제 효과를 확인하였다(도 3a 및 도 3b).

[0069]

[0070] **<실시예 4> 고지방식이에 따른 지방간손상에 관여하는 염증인자에 대한 YS-51S의 활성 확인**

[0071] **<4-1> 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines) 발현 및 대식세포 침투 여부 확인**

[0072] 상기 <실시예 3>에서 간지방증의 발달로 간에 손상 정도가 심해진 서양 식단을 섭취한 마우스에 YS-51S가 유의적인 효과를 보인 결과를 바탕으로, 실제 혈청 내 전염증성 사이토카인 발현 수준 및 간 대식세포 침투에 대한 YS-51S의 효과를 확인하고자, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 검사 및 대식세포의 마커인 F4/80 염색을 통한 면역조직화학적(Immunohistochemistry) 관찰을 수행하였다.

[0073] 구체적으로, 간지방증이 발달한 서양 식이군 마우스의 간 손상이 전염증성 인자의 변화에 따른 염증에 기인한 것인지를 확인하기 위해 대표적인 MCP-1(monocyte chemotactic protein-1) 및 TNF-α(Tumor necrosis factor alpha)의 mRNA 발현 수준을 ELISA 키트(R&D systems, Inc)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 측정하였다. 또한, 간 조직의 대식세포의 침착을 관찰하기 위해, 먼저, 파라핀에 간 및 췌장(pancreas) 조직을 임베드(embedded)한 다음, 5 μm로 자른 후, 탈파라틴화 시키고 과산화수소 1% 조건에서 10 분 동안 유지하였다. 슬라이드를 상온에서 1 시간 동안 5% 블락킹 혈청으로 처리한 다음, 밤새 4℃에서 항-토끼-섬유소(1:50; Dako), 항-토끼-F4/80(간 대식세포의 마커)(1:50; santa cruz biotechnology) 및 항-기니아 피그(guinea pig)-인슐린(1:100; Abcam)과 함께 인큐베이션(incubation)하였다. 상기 슬라이드를 세척한 다음, 2차 항체(1:100; Vector Lab, Burlingame, CA)를 상온에서 1 시간 동안 처리하였고, 0.05% 과산화수소를 함유하는 디아미노벤지딘(diaminobenzidine, Sigma-Aldrich)로 디벨롭(develop)하여 CKX41 광학현미경으로 시각화하여 관찰하였다.

[0074] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 고지방의 서양 식이군 마우스에서 MCP-1 및 TNF-α mRNA의 발현량이 증가하였으나, YS-51S를 함께 섭취한 서양 식이군에서는 정상 수준으로 유의적으로 감소함을 확인하였다(도 4a 및 도 4b). 또한, 도 4c에 나타낸 바와 같이, 지방간에서 증가한 대식세포가 YS-51S 처리로 감소함을 확인하였다.

[0075] **<4-2> 전염증성 유전자 발현 확인**

[0076] 혈청 내 전염증성 유전자인 MCP-1 및 TNF-α의 발현에 대한 YS-51S의 효과를 확인하고자, 역전사 PCR 및 실시간

(real time) PCR을 수행하였다.

[0077] 구체적으로, TRIzol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여, 제조사의 절차에 따라 동결 간 조직으로부터 총 RNA를 분리하였다. 상기 RNA 1 μg으로 부터 *AccuPower* RT PreMix(Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 제조사의 절차에 따라 역전사하여 cDNA를 합성하였다. 그런 다음, mRNA 100 ng과 동량인 cDNA를 이용하여 PCR 증폭을 실시하였다. 이때, PCR PreMix(Enzynomics, Daejeon, Korea) 및 표 1에 나타낸 올리고뉴클레오티드 프라이머들을 이용하여 PCR을 수행하였다(표 1). PCR 산물은 ETBR(ethidium bromide)이 함유된 1 내지 2% 아가로스 젤에서 시각화하여 젤닥 시스템(GelDoc XR, BiRad Inc., Hercules, CA)으로 확인하였다. 하우스키핑(housekeeping) 유전자인 GAPDH를 양성대조군으로 사용하였다.

[0078] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 일반 식단+비이클, 일반 식단+YS-51S, 서양 식단+비이클, 및 서양 식단+YS-51S을 각각 섭취한 마우스의 간 조직에서 TNF-α, MCP-1 및 ICAM-1 mRNA 발현 수준을 확인한 결과 TNF-α, MCP-1 및 ICAM-1 mRNA 수준이 지방 함량이 높은 서양 식이군에서 더 많이 발현함을 확인하였고(도 5a), 이를 실시간 RT-PCR을 통해 TNF-α(도 5b), MCP-1(도 5b) 및 ICAM-1(도 5c) mRNA 발현 수준을 정량적으로 비교하여 확인하였다.

표 1

[0079]

프라이머명	서열번호	서열(5'->3')
Tissue factor forward	1	GAGACGGAGACCAACTTGTG
Tissue factor reverse	2	GGCTGTCCGAGGTTTGTG
PAI-1 forward	3	GATGGCTCAGAGCAACAAGT
PAI-1 reverse	4	GCTGAGATGACAAAGGCTGT
PAR-1 forward	5	CTGATTGGCAGTTCGGGTC
PAR-1 reverse	6	GAACAAAGCCCGCGACTTC
TNF-α forward	7	TACTGAACTTCGGGGTGATTGGTCC
TNF-α reverse	8	CAGCCTTGTCCCTTGAAGAGAACC
MCP-1 forward	9	ACCTGCTGCTACTCATTCAC
MCP-1 reverse	10	TTGAGGTGGTTGTGGAAAAG
ICAM-1 forward	11	TGTTTCCTGCCTCTGAAGC
ICAM-1 reverse	12	CTTCGTTTGTGATCCTCCG
TGF-β forward	13	ATCGACATGGAGCTGGTGA
TGF-β reverse	14	TTGGCATGGTAGCCCTTGG
Procollagen type 1 forward	15	AAGAAGGCGGCAAAG
Procollagen type 1 reverse	16	GGACCTTGTTTGCCAGGT
CD36 forward	17	AGGTCCTTACACATACAGAGTTCG
CD36 reverse	18	GGACTTGCATGTAGGAAATGTGGA
SCD-1 forward	19	CTGCCTCTTCGGGATTTTCTACT
SCD-1 reverse	20	GCCCATTCGTACACGTGATTC
SREBP-1c forward	21	GCAGTCTGCTTTGGAACCTC
SREBP-1c reverse	22	CCACAAAGAAACGGTGACCT

[0080] **<실시예 5> 섬유소 함량 측정을 통한 응고 반응에 대한 YS-51S의 활성 확인**

[0081] **<5-1> TGF-β 및 프로콜라겐 종류 1(procollagen type 1)의 mRNA 발현량 확인**

[0082] 비알코올성 지방간 질환(NAFLD) 마우스에서 간지방증이 섬유증(fibrosis) 발달을 일으키는 과정에서 YS-51S의 활성을 확인하고자, 역전사 PCR 및 실시간 PCR을 통해 관련 유전자의 발현 수준을 확인하였다.

[0083] 구체적으로, 상기 실시예 <4-2>와 동일한 방법으로 역전사 PCR 및 실시간 PCR을 수행하였다.

[0084] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, 고지방식이를 통해 지방간이 증가한 서양 식이군에서 TGF-β 및 프로콜라겐 종류 1의 mRNA 발현량이 모두 유의적으로 증가하였으나, 이 증가를 YS-51S가 억제하는 활성을 지님을 확인하였다(도 6a). 또한, TGF-β 및 프로콜라겐 종류 1의 mRNA 발현 수준을 정량적으로 확인한 결과 도 6a와 동일한 양상으로 발현함을 확인하였다(도 6b 및 도 6c).

[0085] **<5-2> 응고 관련 유전자 발현 및 섬유소 침착에 대한 YS-51S의 활성 확인**

[0086] 간 조직에서의 응고 관련 유전자인 조직 인자(Tissue factor; TF) 및 플라스미노겐 활성물질 억제제-1(plasminogen activator inhibitor-1; PAI-1) mRNA 발현 수준을 확인하고자, 역전사 PCR 및 실시간 PCR을 통해 관련 유전자의 발현 수준을 확인하였다.

[0087] 구체적으로, 상기 실시예 <4-2>와 동일한 방법으로 역전사 PCR 및 실시간 PCR을 수행하였다.

[0088] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, TF 및 PAI-1 mRNA 수준에서도 YS-51S 화합물의 효과가 분명히 나타남을 확인하였다(도 7a 내지 도 7c). 또한, 섬유소 침착 역시 서양 식이군 단독투여와 비교하여 YS-51S 화합물도 함께 섭취할 경우, 섬유소 침착 수준이 낮아짐을 확인함으로써(도 7d), YS-51S가 간지방증의 혈액 응고뿐만 아니라 섬유소 침착 현상을 억제하는 효과를 지님을 확인하였다.

[0089]

[0090] **<실시예 6> 응고 및 염증의 매개 인자인 PAR-1(Protease activated receptor-1)의 발현 여부 확인**

[0091] 고지방을 함유한 서양 식이군 마우스에서 혈액 응고 및 염증 사이의 연결을 담당하는 것으로 알려진 PAR-1 유전자의 발현량을 알아보고자 역전사 PCR을 수행하였다.

[0092] 구체적으로, 상기 실시예 <4-2>와 동일한 방법으로 역전사 PCR 및 실시간 PCR을 수행하였다.

[0093] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, 일반 식이를 한 그룹과 비교하여 서양식 고지방 식이 그룹에서 PAR-1 mRNA 발현량이 유의적으로 증가하였으나 서양식이+ YS51S군에서 감소한 것을 확인하였다(도 8).

[0094]

[0095] **<실시예 7> 리포제닉(lipogenic) 유전자의 발현에 대한 YS-51S의 활성 확인**

[0096] 간 조직에서 아세틸코에이(Acetyl-CoA)가 지방산으로 발달하는 것과 관련된 리포제닉 유전자의 발현에 YS-51S가 미치는 영향을 확인하기 위하여, 역전사 PCR 및 실시간 PCR을 통해 관련 유전자의 발현 수준을 확인하였다.

[0097] 구체적으로, 상기 실시예 <4-2>와 동일한 방법으로 역전사 PCR 및 실시간 PCR을 수행하였다.

[0098] 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, 지방간에서 증가했던 CD36, SCD-1 및 SREBP-1c mRNA 발현량이 YS-51S에 의해 감소함을 확인함으로써, YS-51S 화합물이 과다 탄수화물의 지방산 전환에 대한 억제 효과가 있음을 확인하였다(도 9a). 또한, 실시간 PCR 결과, CD36(도 9b), SCD-1(도 9c) 및 SREBP-1c(도 9d)의 mRNA 상대적 발현량이 도 9a와 동일한 양상으로 나타남을 정량적으로 확인하였다.

[0099]

[0100] **<실시예 8> YS-51S의 인슐린 저항성 증가 효과 확인**

[0101] 상기 <실시예 7>에서 리포제닉 유전자들의 발현에 대한 YS-51S의 조절 활성을 바탕으로, 인슐린 저항성에 대한 활성 여부를 확인하고자, 글루코스 내성 검사(glucose tolerance test; GTT) 및 인슐린 내성 검사(insulin tolerance test; ITT)를 수행하였다.

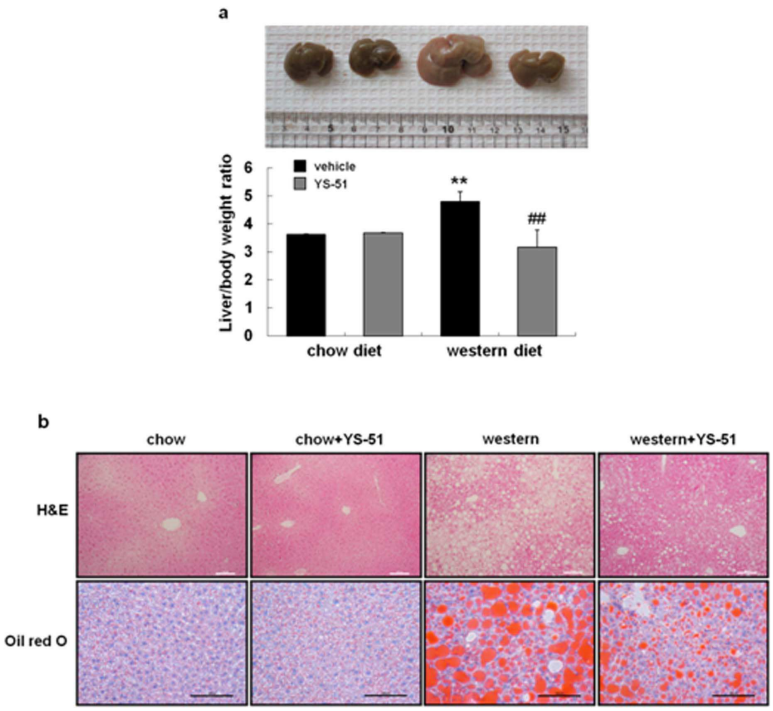
[0102] 구체적으로, 글루코스 내성 검사(Glucose tolerance test; GTT)를 실시하였다. 우선, 밤새 단식시킨 마우스에 D-글루코스(Sigma-Aldrich) 2 g/kg를 복강내(intraperitoneally; IP)에 주입시켰다. 그 후, 0, 30, 60, 90 및 120 분에 각각 혈액 시료를 단미(cut tail)로 채취하였다. 체내 글루코스 수치는 Accu-Check sensor(Roche Diagnostics GmbH)로 측정하였다. 또한, 인슐린 내성 검사(Insulin tolerance test; ITT)를 위해, 우선 인슐린(0. 75 U/kg; Humulin-F; Eli Lilly and company)을 함유하는 0.1 ml 0.9% NaCl을 준비한 다음, 오후 2시에 복강 내 주입을 한 후 0, 30, 60, 90 및 120 분에 Accu-Check sensor로 그 수치를 측정하였다. 혈청의 인슐린 농도는 Millipore사(290 Concord Road, Billerica)의 ELISA 키트를 이용하여 제조사의 방법에 따라 실험을 수행하였다.

[0103] 그 결과, 도 10a 및 도 10b에 나타낸 바와 같이, 서양 식이군의 경우, 글루코스를 주입한 이후 혈액 내 글루코스 농도가 유의적으로 증가한 반면, YS-51S 처리시 감소하는 것을 확인하였고(도 10a), ITT 결과도 역시 GTT 결과와 유사한 경향을 보임을 확인하였다(도 10b). 또한, 도 10c에 나타낸 바와 같이, 췌장에서 인슐린 생산 정도를 면역 염색으로 확인한 결과, 췌장도(pancreatic islets)의 직경이 서양 식이군의 경우 상대적으로 증가

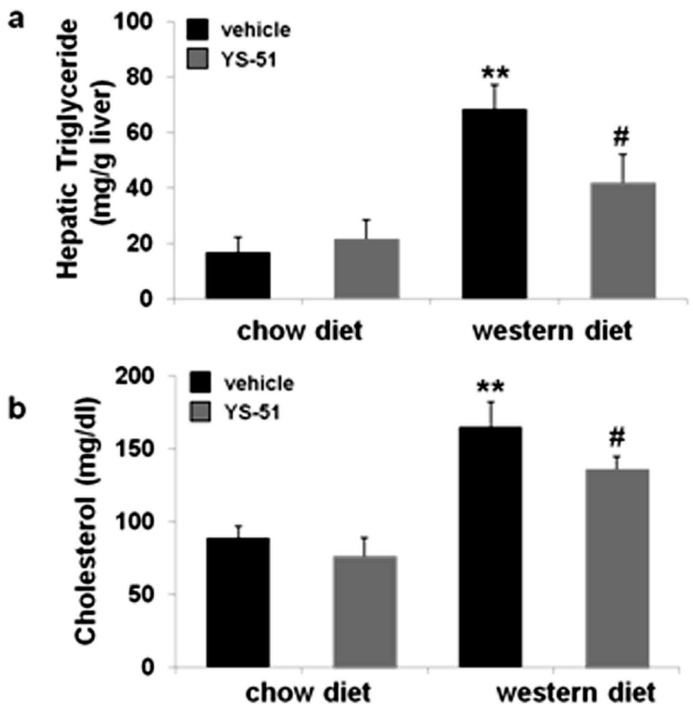
함을 유의적으로 확인하였고, YS-51S도 함께 처리한 그룹의 경우 그 크기가 감소함을 확인하였다(도 10c). 혈청 내 인슐린 농도 역시 ELISA 결과를 통해 지방간에서 증가하지만, YS-51S 화합물이 인슐린 내성 억제 활성이 있음을 확인하였다(도 10d).

도면

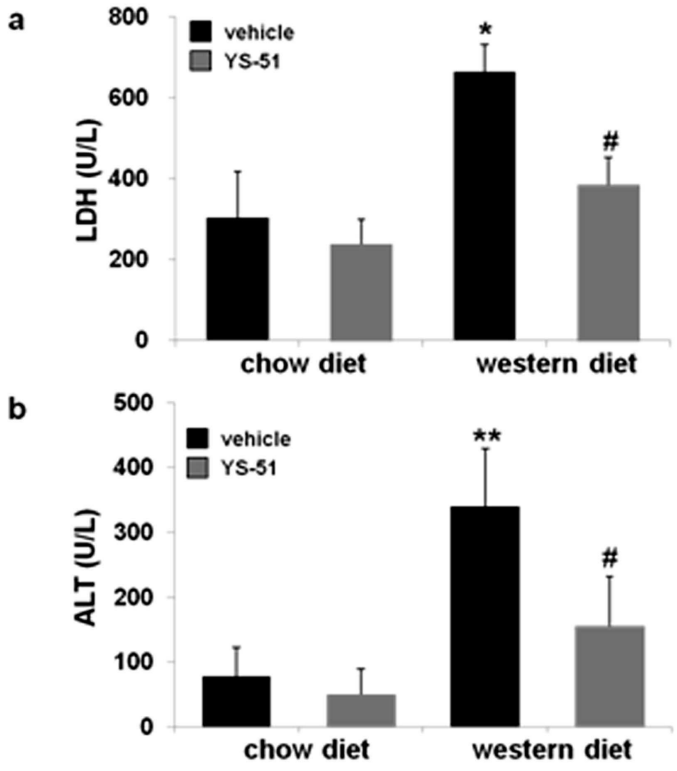
도면1



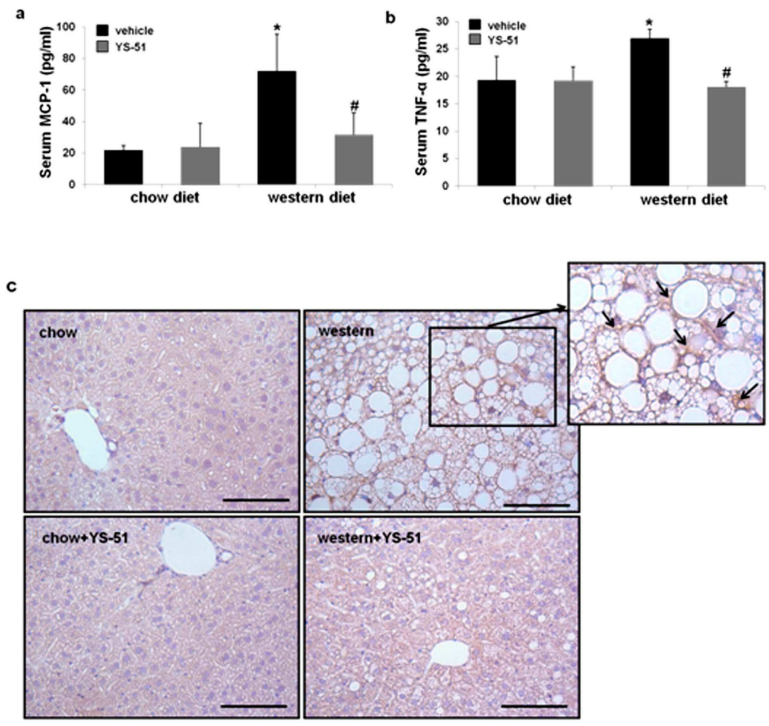
도면2


a
Hepatic Triglyceride (mg/g liver)
100
80
60
40
20
0
vehicle
YS-51
**
#
chow diet
western diet
b
Cholesterol (mg/dl)
200
150
100
50
0
vehicle
YS-51
**
#
chow diet
western diet

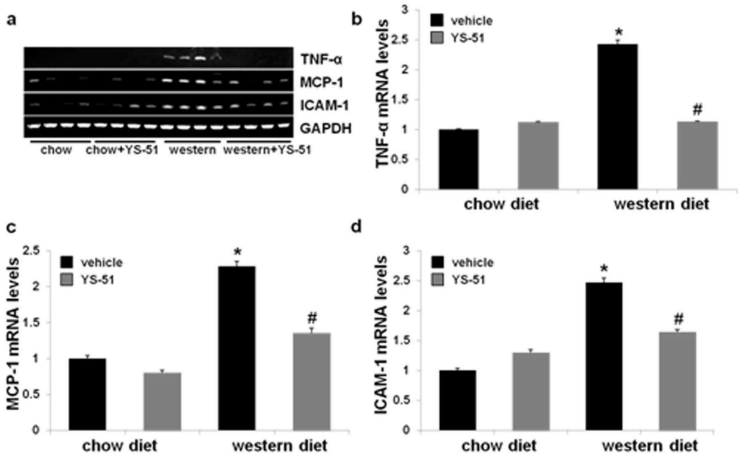
도면3


a
LDH (U/L)
800
600
400
200
0
vehicle
YS-51
*
#
chow diet
western diet
b
ALT (U/L)
500
400
300
200
100
0
vehicle
YS-51
**
#
chow diet
western diet

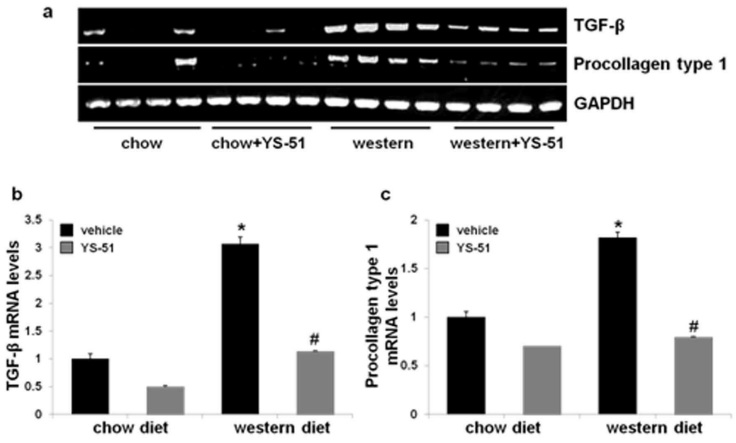
도면4


a
Serum MCP-1 (pg/ml)
vehicle
YS-51
chow diet
western diet
b
Serum TNF-α (pg/ml)
vehicle
YS-51
chow diet
western diet
c
chow
western
chow+YS-51
western+YS-51

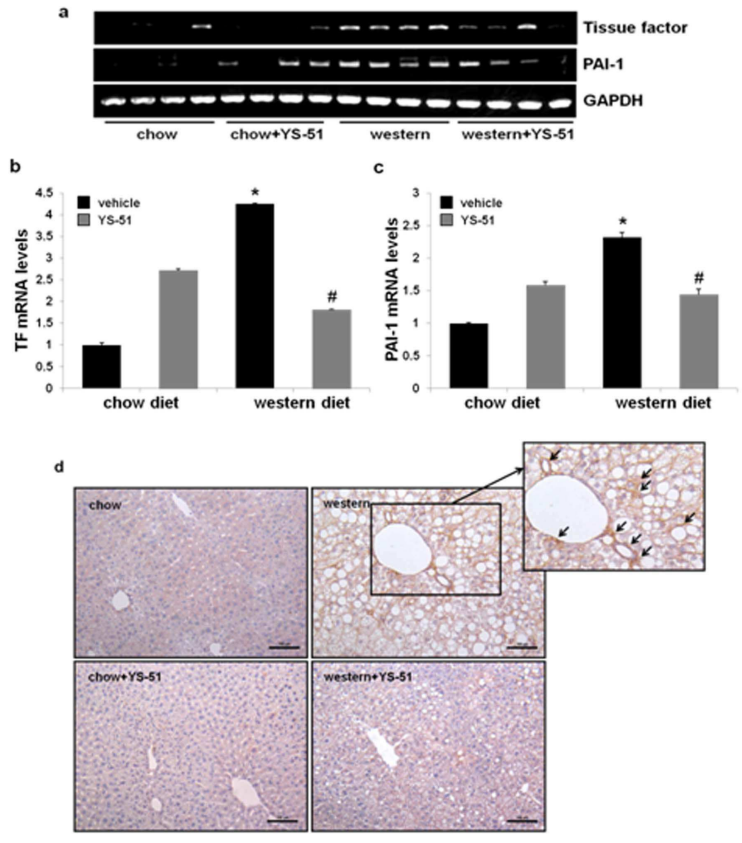
도면5


a
TNF-α
MCP-1
ICAM-1
GAPDH
chow
chow+YS-51
western
western+YS-51
b
TNF-α mRNA levels
vehicle
YS-51
chow diet
western diet
c
MCP-1 mRNA levels
vehicle
YS-51
chow diet
western diet
d
ICAM-1 mRNA levels
vehicle
YS-51
chow diet
western diet

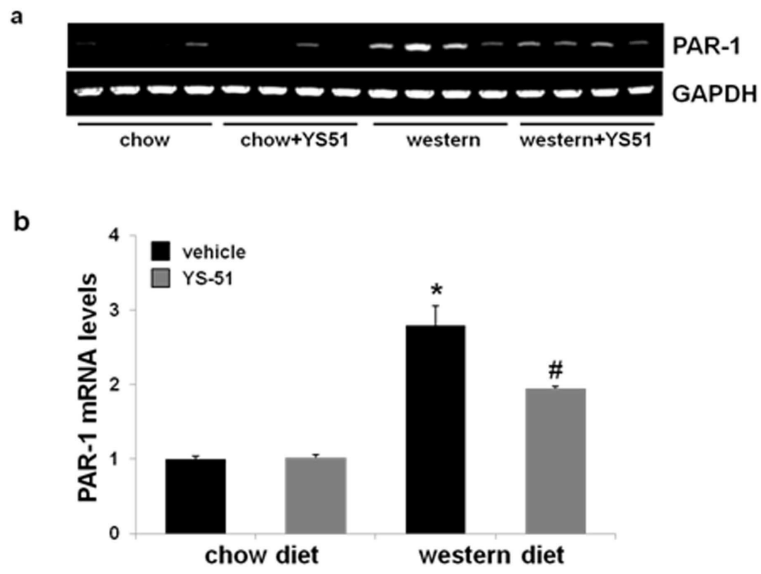
도면6


a
TGF-β
Procollagen type 1
GAPDH
chow
chow+YS-51
western
western+YS-51
b
TGF-β mRNA levels
vehicle
YS-51
chow diet
western diet
c
Procollagen type 1 mRNA levels
vehicle
YS-51
chow diet
western diet

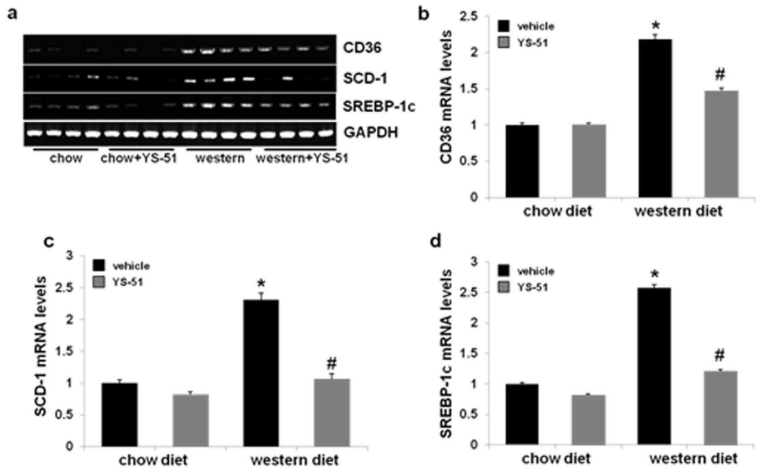
도면7


a
Tissue factor
PAI-1
GAPDH
chow
chow+YS-51
western
western+YS-51
b
TF mRNA levels
vehicle
YS-51
chow diet
western diet
c
PAI-1 mRNA levels
vehicle
YS-51
chow diet
western diet
d
chow
western
chow+YS-51
western+YS-51

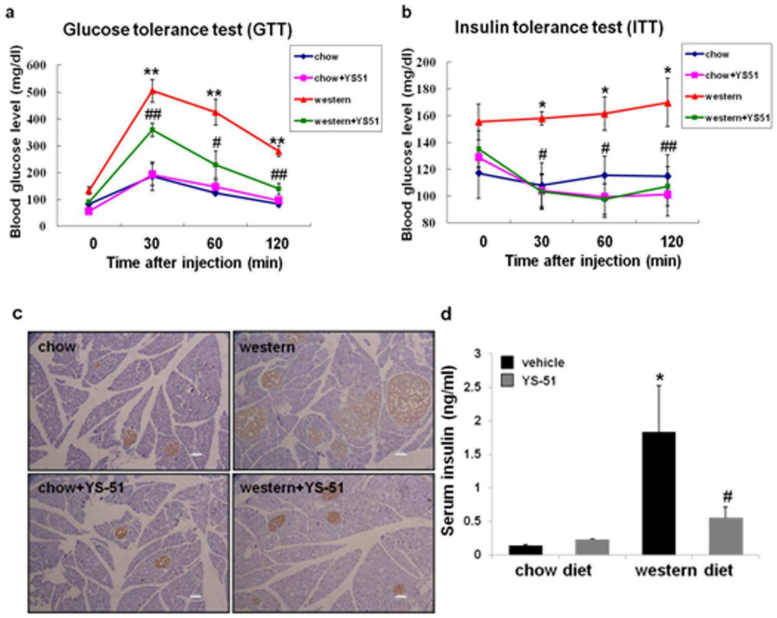
도면8


a
PAR-1
GAPDH
chow
chow+YS51
western
western+YS51
b
vehicle
YS-51
PAR-1 mRNA levels
chow diet
western diet

도면9


a
CD36
SCD-1
SREBP-1c
GAPDH
chow
chow+YS-51
western
western+YS-51
b
CD36 mRNA levels
c
SCD-1 mRNA levels
d
SREBP-1c mRNA levels
vehicle
YS-51
chow diet
western diet

도면10



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> The composition for preventing and treating nonalcoholic fatty liver disease containing tetrahydroisoquinoline alkaloid YS-51S

<130> 13p-06-57

<160> 22

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tissue factor forward

<400> 1

gagacggaga ccaacttgtg 20

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tissue factor reverse

<400> 2

ggctgtccga ggtttgtg 18

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAI-1 forward

<400> 3

gatggctcag agcaacaagt 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAI-1 reverse

<400> 4

gctgagatga caaaggctgt 20

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAR-1 forward

<400> 5

ctgattggca gttcgggtc 19

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PAR-1 reverse

<400> 6

gaacaaagcc cgcgacttc 19

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF-alpha forward

<400> 7

tactgaactt cggggtgatt ggtcc 25

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNF-alpha reverse

<400> 8

cagccttgtc ccttgaagag aacc 24

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MCP-1 forward

<400> 9

acctgctgct actcattcac 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MCP-1 reverse

<400> 10

ttgaggtggt tgtggaaaag 20

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ICAM-1 forward

<400> 11

tgtttcctgc ctctgaagc 19

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ICAM-1 reverse

<400> 12

cttcgtttgt gatcctccg 19

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TGF-beta forward

<400> 13

atcgacatgg agctggtga 19

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TGF-beta reverse

<400> 14

ttggcatggt agcccttgg 19

<210> 15

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Procollagen type 1 forward

<400> 15

aagaaggcgg caaag 15

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Procollagen type 1 reverse

<400> 16

ggaccttgtt tgccaggt 18

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD36 forward

<400> 17

aggtccttac acatacagag ttcg 24

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD36 reverse

<400> 18

ggacttgcat gtaggaaatg tgga 24

<210> 19

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SCD-1 forward

<400> 19

ctgcctcttc gggattttct act 23

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SCD-1 reverse

<400> 20

gcccattcgt acacgtgatt c 21

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SREBP-1c forward

<400> 21

gcagtctgct ttggaacctc 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SREBP-1c reverse

<400> 22

ccacaaagaa acggtgacct 20