



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년07월10일
(11) 등록번호 10-1756417
(24) 등록일자 2017년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7135 (2006.01) A23L 1/304 (2006.01)
A61K 33/24 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/7135 (2013.01)
A23L 33/16 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0116396
(22) 출원일자 2015년08월19일
심사청구일자 2015년08월19일
(65) 공개번호 10-2016-0023574
(43) 공개일자 2016년03월03일
(30) 우선권주장
1020140108907 2014년08월21일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
US7910105 B1
Biochimica et Biophysica Acta 1832 (2013)
989-997
World J Gastroenterol 2006, 12(12), 1918-1923

(73) 특허권자
한국유나이티드제약 주식회사
세종특별자치시 전동면 노장공단길 25-23 ()
(72) 발명자
강건욱
서울특별시 송파구 올림픽로 135, 242동 2803호
(잠실동, 리센즈아파트)
김나연
경기도 수원시 팔달구 권광로 373, 101동 905호(우만동, 월드메르디앙 아파트)
윤경록
경상남도 창원시 성산구 대암로 22, 105동 501호(남양동, 우성아파트)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 이민정

(54) 발명의 명칭 **금제제를 포함하는 간 섬유화 또는 간 경화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

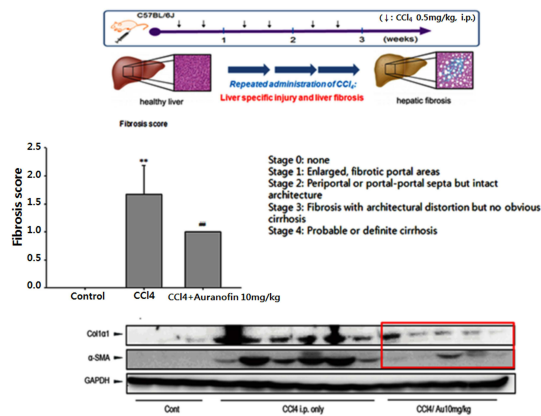
(57) 요약

본 발명은 간 섬유화 또는 간 경화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 금제제를 포함하는 간 섬유화 또는 간 경화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 약학적 조성물은 금(gold)제제를 유효성분으로 포함함으로써, 대식세포의 M2 형질전환을 촉진시킬 뿐만 아니라, TREM-2 발현 증가로 정상세포의 활성화를 억제하여 간 섬유화 또는 간 경화를 예방, 치료 또는 개선하는 약학 조성물, 식품 조성물 등으로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

또한, 금(gold)제제, 특히 오라노핀(auranofin)과 이와 유사한 금티오말산 소듐(sodium aurothiomalate) 또는 금티오글루코오스(aurothioglucose)는 타 용도(류마티스 관절염)로 이미 상당 기간 사용되어 왔기 때문에, 약물들에 의한 부작용 가능성이 낮은 장점도 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 33/24 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014M3A9A8064408

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발 (신약타겟발굴·검증사업)

연구과제명 대식세포 M1/M2 형질전환 조절에 의한 간 섬유화 억제타겟 발굴

기여율 1/1

주관기관 서울대학교

연구기간 2014.10.01 ~ 2016.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

금(gold)제제를 유효성분으로 포함하는 간 섬유화 또는 간 경화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 금제제는 오라노핀(auranofin), 금티오말산 소듐(sodium aurothiomalate), 금티오글루코오스(aurothioglucose), 금티오황산 소듐(sodium aurothiosulfate) 및 금티오말산 이소듐(disodium aurothiomalate)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 M2형 대식세포로의 형질전환을 촉진시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 TREM-2(Triggering receptor expressed on myeloid cells 2) 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 5

금제제를 유효성분으로 포함하는 간 섬유화 또는 간 경화의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 금제제는 오라노핀(auranofin), 금티오말산 소듐(sodium aurothiomalate), 금티오글루코오스(aurothioglucose), 금티오황산 소듐(sodium aurothiosulfate) 및 금티오말산 이소듐(disodium aurothiomalate)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 간 섬유화 또는 간 경화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 금제제를 포함하는 간 섬유화 또는 간 경화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 간은 체외에서 들어온 물질 및 체내의 물질대사에서 중추적인 역할을 담당하며 지속적으로 효소반응 및 에너지 대사가 일어나는 생체기관이다. 현재 국내의 만성적 질병 중에서 간염, 간경화 및 간암이 차지하는 비중은 순환기계 질환과 함께 가장 높은 것으로 나타나고 있으며, 질병으로 인한 사망원인의 큰 비중을 차지하는 실정이다. 특히 선진국에 비하여 음주인구가 상대적으로 높고 폭음에 의한 간 손상 발생 원인이 높은 만큼 이에 대한 관심도 지대한 편이다. 바이러스 감염이나 음주에 의한 지속적인 간조직의 손상은 간 경화나 간암으로 발전되는 질환의 특징을 가진다. 간조직의 생리적 특성 및 중요성을 고려할 때 간 질환의 치료 및 예방은 대단히 중요하며 간 조직손상을 줄이고 궁극적으로 치료에 응용할 수 있는 치료 및 예방용 의약조성물의 개발이 요구된다.

[0003] 특히, 간 섬유화는 간염 등 만성 간질환에 수반되는 생체 적응반응의 일부로서 손상된 간 조직이 정상적인 간세

포로 복구되는 것이 아니라 콜라겐과 같은 섬유조직으로 변형되는 상태를 칭한다. 간 섬유화는 조직손상의 복구 과정에서 발생하는 생체적응 반응이지만 생체 내 물질의 대사 및 담즙분비 등 간의 고유기능을 전혀 수행할 수 없는 섬유조직으로 간이 대체된다는 점에서 간 기능의 저하가 필연적으로 나타난다. 간섬유화 현상이 지속적으로 반복될 때에는 간경화로 발전되어 사망에까지 이르게 한다는 점에서 적절한 치료제의 개발은 의약품 개발의 중요한 과제로 수행되어 왔다. 그러나 현재까지는 간 섬유화의 기전 자체가 명확하게 밝혀져 있지 않으므로 적당한 치료약물이 개발되지 않은 실정이다.

[0004] 최근 간 조직 내의 대식세포와 정상세포에서 유리되는 사이토카인인 Transforming growth factor-beta (TGF-beta)가 간 섬유화의 중요 매개물로 밝혀졌다. 또한, TGF-beta의 항체, antisense RNA, 세포 TGF-beta 수용체 변형을 통하여 TGF-beta의 작용을 차단하였을 때에는 간 섬유화과정이 현저하게 억제된다고 보고된 바 있다. 그러나 이러한 연구는 실험적 차원에서 수행된 것일 뿐이며 현재까지 실제로 임상적으로 활용되는 약물은 없는 실정이다.

[0005] 상기에서 기재된 바와 같이, 간 섬유화 또는 간 경화에 효과적인 치료제를 개발하는 것이 주요한 과제가 되고 있고, 이에 대한 연구가 이루어지고 있으나(한국등록특허 제10-0949417호), 아직 미비한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명은 금(gold)제제를 유효 성분으로 포함하는 간 섬유화 또는 간 경화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[0007] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 금(gold)제제를 유효성분으로 포함하는 간 섬유화 또는 간 경화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명의 일 구현예로, 상기 금제제는 오라노핀(auranofin), 금티오말산 소듐(sodium aurothiomalate), 금티오글루코스(aurothioglucose), 금티오황산 소듐(sodium aurothiosulfate) 및 금티오말산 이소듐(disodium aurothiomalate)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0010] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 조성물은 M2형 대식세포로의 형질전환을 촉진시킬 수 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 TREM-2(Triggering receptor expressed on myeloid cells 2) 발현을 증가시킬 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명은 금(gold)제제를 유효성분으로 포함하는 간 섬유화 또는 간 경화의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 구현예로, 상기 금제제는 오라노핀(auranofin), 금티오말산 소듐(sodium aurothiomalate), 금티오글루코스(aurothioglucose), 금티오황산 소듐(sodium aurothiosulfate) 및 금티오말산 이소듐(disodium aurothiomalate)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0014] 더욱이, 본 발명은 금(gold)제제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 간 섬유화 또는 간 경화 치료방법을 제공한다.

[0015] 뿐만 아니라, 본 발명은 간 섬유화 또는 간 경화를 예방 또는 치료하기 위한 약제를 생산하기 위한 금(gold)제제의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 약학적 조성물은 금(gold)제제를 유효성분으로 포함함으로써, 대식세포의 M2 형질전환을 촉진시킬 뿐만 아니라, TREM-2 발현 증가로 정상세포의 활성화를 억제하여 간 섬유화 또는 간 경화를 예방, 치료 또는 개선하는 약학 조성물, 식품 조성물 등으로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

[0017] 또한, 금(gold)제제, 특히 오라노핀(auranofin)과 이와 유사한 금티오말산 소듐(sodium aurothiomalate) 또는 금티오글루코오스(aurothioglucose)는 타 용도(류마티스 관절염)로 이미 상당 기간 사용되어 왔기 때문에, 약물들에 의한 부작용 가능성이 낮은 장점도 있으며, 더하여 섬유화가 문제가 되는 다른 질환들, 예를 들어 신장 섬유화에도 효과가 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 대식세포의 M1/M2 형질 전환 특성 및 유도 사이토카인을 개략적으로 나타낸 것이다.
- 도 2는 다양한 금제제의 구조식을 나타낸 것이다.
- 도 3a는 인간 간 섬유화 환자 및 사염화탄소 유도 간 섬유화 마우스 모델에서 분리한 간 조직에서 대식세포 M2 표지인자인 TREM-2의 발현의 증감여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3b는 TREM-2 과발현을 시킨 대식세포에서 얻은 배지를 MEF세포에 처리하여 α-SMA 및 collagen-1a1 발현증감을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 RAW264.7 세포에 LPS/IFN-γ을 처리하여 M1 형 대식세포로 분화시키는 조건에서 오라노핀(auranofin)을 처리하고, iNOS 및 TREM-2 발현증감을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 RAW264.7 세포에 오라노핀(auranofin)을 처리한 후, 배지를 MEF 세포에 처리하고, α-SMA 발현 증감을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 사염화탄소 유도 마우스 간 섬유화 모델에 오라노핀(auranofin) 처리 후, 간 조직을 H&E 염색으로 섬유화 수치를 평가하고, 일부 조직은 분쇄하여 α-SMA와 Collagen-1a1을 정량한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7a는 RAW264.7 세포에 LPS/IFN-γ을 처리하여 M1 형 대식세포로 분화시키는 조건에서 금티오말산 소듐(sodium aurothiomalate) 및 금티오글루코오스(aurothioglucose)를 각각 처리하고, iNOS 발현 증감을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7b는 RAW264.7 세포에 IL-4 처리하여 M2 형 대식세포로 분화시키는 조건에서, 금티오말산 소듐(sodium aurothiomalate) 및 금티오글루코오스(aurothioglucose)를 각각 처리하고, arginase-1 발현 증감을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 간 섬유화의 과정에서 다수의 연구자들이 주목한 것은 간세포의 파괴와 콜라겐과 같은 교원질 생성을 통하여 이를 복구하는 정상세포의 작용이었다. 하지만, 본 발명에서는 간 조직 내 대식세포 기능을 하는 쿠퍼세포와 혈류를 타고 침투하는 골수유래 대식세포의 작용에 주목하였다.
- [0020] 대식세포는 분화 과정에 따라서 형질이 크게 두 가지로 분류된다. M1 형 대식세포는 주로 박테리아 기원 내독소인 lipopolysaccharide(LPS)와 interferon-gamma(IFN-gamma) 자극에 의하여 형성되며, 이는 tumor necrosis factor-alpha(TNF-alpha), interleukin-6(IL-6), inducible nitric oxide synthase(iNOS) 유도를 통하여 대식세포 고유 기능인 탐식 및 이에 수반되는 염증반응의 증폭에 관여하며, M2 형 대식세포는 interleukin-4(IL-4) 및 TGF-beta 등의 분비에 의하여 형성되어 IL-10과 같은 anti-cytokine과 arginase 유도를 일으킨다고 알려져 있으며, 이는 조직 복구 등의 반응에 관여한다고 알려진 바 있다 (도 1 참조).
- [0021] 최근 연구에 의하면, M1/M2 형질 전환은 섬유화 신호에 영향을 미친다고 밝혀진 바 있다. M1 대식세포의 염증진행 악화는 섬유화를 악화시킨다고 보고되었으며, M2 대식세포는 arginase-1 발현을 통하여 Th2 염증반응과 신장 섬유화를 억제한다는 보고가 있다. 따라서, M1/M2 형질 전환을 적절하게 조절하는 약물을 간 섬유화 및 간 경화의 예방 및 치료목적으로 사용하는 것이 가능할 수 있다.
- [0022] 이에, 본 발명자들은 M1/M2 형질 전환을 적절하게 조절하는 약물 개발에 대하여 연구 노력한 결과, 타 용도로 사용되던 금(gold)제제가 대식세포의 M2로의 형질전환과 TREM-2(Triggering receptor expressed on myeloid cells 2)라는 수용체 발현 증가를 일으켜서 간 섬유화를 억제한다는 것을 최초로 새롭게 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0026] 본 발명은 금(gold)제제를 유효성분으로 포함하는 간 섬유화 또는 간 경화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을

제공한다.

- [0027] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 간 섬유화 또는 간 경화를 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0028] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 간 섬유화 또는 간 경화에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0029] 본 발명의 약학적 조성물에 유효성분으로 포함되는 "금제제"란 금(gold)과 다른 원소(성분)가 일정 비율로 구성된 화합물 즉, 금의 화합물(gold compound)을 의미하여, 여기에는 금(I) 화합물 및 금(III) 화합물을 모두 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 상기 금제제의 예로는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 오라노핀(auranofin)(2, 3, 4, 6-tetra-O-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranosato-S-[triethylphosphine] gold), 금티오말산 소듐(sodium aurothiomalate), 금티오글루코오스(aurothioglucose), 금티오황산 소듐(sodium aurothiosulfate), 금티오말산 이소듐(disodium aurothiomalate) 등이 있고(도 2 참조), 바람직하게는 오라노핀(auranofin), 금티오말산 소듐(sodium aurothiomalate) 또는 금티오글루코오스(aurothioglucose)를 사용할 수 있고, 가장 바람직하게는 오라노핀(auranofin)을 사용할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 약학적 조성물은 금제제를 유효성분으로 포함함으로써, 대식세포의 M2 형질전환을 촉진시킬 뿐만 아니라, TREM-2 발현 증가로 정상세포의 활성화를 억제하여 간 섬유화 또는 간 경화를 예방, 치료 또는 개선할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에서는, 금(gold)제제가 M2형 대식세포로의 형질전환을 일으키는지 여부를 확인한 결과, 금(gold)제제 처리 시, α-SMA 및 iNOS 발현이 억제되고, TREM-2 발현 및 arginase-1 발현이 증가되어 결과적으로 M1형 대식세포로의 형질전환을 억제함과 동시에, M2형 대식세포로의 형질전환을 촉진함을 확인하였다(실시예 3, 4 및 6 참조).
- [0032] 본 발명의 다른 실시예에서는, 금(gold)제제 투여에 의한 간 섬유화의 억제를 확인한 결과, 금(gold)제제 처리 시, 정상세포 활성화 지표인 α-SMA와 Collagen 1a1의 발현을 뚜렷이 낮추며, 실제 간섬유화 수치도 10 mg/kg에서 유의성 있게 저하시킴을 확인하였다(실시예 5 참조).
- [0033] 한편, 본 발명의 약학적 조성물은 상기 금(gold)제제와 함께 간 섬유화 또는 간 경화 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 경구투여에 적합한 단위투여형의 제제로 제형화시켜 사용될 수 있다.
- [0035] 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 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 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0036] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁액, 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 또한, 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0037] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용

량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0038] 구체적으로, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에서 활성 성분의 흡수율, 불활성을 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 0.01mg/kg/일 내지 대략 100mg/kg/일으로, 바람직하게는 0.1 mg/kg/일 내지 30 mg/kg/일의 양으로 투여할 수 있으며, 하루에 한번 또는 수 회 나누어 투여할 수도 있다.

[0039] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.

[0040] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 간 섬유화 또는 간 경화 치료방법을 제공한다. 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[0041] 더욱이, 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 금(gold)제제를 유효성분으로 포함하는 간 섬유화 또는 간 경화 예방 또는 개선용 건강기능 식품 조성물을 제공한다.

[0042] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"이란 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다. 이때 상기 기능성 식품 조성물은 간 섬유화 또는 간 경화 예방 또는 개선을 위하여 해당 질환의 발병 단계 이전 또는 발병 후, 치료를 위한 약제와 동시에 또는 별개로 사용될 수 있다.

[0043] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 유효성분을 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.

[0044] 본 발명의 건강기능 식품 조성물에서 유효성분을 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, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있다.

[0045] 본 발명의 건강기능 식품 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 유효성분을 함유하는 것 외에 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 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

[0046] 상기 외에 본 발명의 건강기능 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(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. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.

[0048] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0050] [실시예]

- [0051] **실시예 1 : 실험준비 및 방법**
- [0052] 1-1. 실험준비
- [0053] 가. 인간 간 섬유화 환자의 간 조직 준비
- [0054] 인간의 정상 및 간 섬유화 조직은 조선대학교 의과대학 병리학교실에서 임상시험 승인(CHOSUN 2013-04-005)을 거쳐서 36 증례의 간암조직에서 분리된 시료를 사용하였다.
- [0056] 나. 사염화탄소 유도 간 섬유화 마우스 모델 준비
- [0057] 사염화탄소 유도 마우스 간 섬유화 모델은 C57BL/6J 마우스에 0.5 ml/kg의 사염화탄소를 주 2회 3주간 반복 복강 내 투여하여 제작하였다.
- [0059] 1-2. 실험방법
- [0060] 가. 웨스턴 블롯(Western blot)
- [0061] 램리의 방법에 따라 겔 전기영동 장치(Mighty Small SE 250, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco)를 사용하여 SDS-PAGE(sodium dodecylsulfate-polyacrylamidegel electrophoresis)를 수행하였다. 세포의 용해 분획을 시료 희석 완충용액[63 mM Tris(pH.6.8), 10 % 글리세롤, 2 % SDS, 0.0013 % 브로모페놀 블루, 5 % β-머캅토에탄올]에 희석한 후 8 %, 10 % 겔을 사용하여 전극 완충용액(1 ℓ 용액 중 Tris 15 g, 글리세린 72 g, SDS 5 g 함유) 내에서 전기영동을 수행하였다. 전기영동이 끝난 겔을 전이용 전기영동 장치를 이용하여 전이완충용액(25 mM Tris, 192 mM 글리세린, 20 % v/v 메탄올(pH.8.3)] 내에서 40 mAmps로 3시간 동안 나이트로셀룰로오즈 막에 단백질을 전이시켰다. 항-TREM-2, 항-Arginase-1, 항-iNOS, 항-α-SMA, 항-collagen-1a1 각각을 1차 항체로서 상기 나이트로셀룰로오즈 막에 반응시킨 후 여기에 2차 항체로 양고추냉이 퍼옥시다제-접합 염소 항-토끼IgG(horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG)와 양고추냉이 퍼옥시다제-접합 염소 항-마우스(anti-mouse) IgG를 1시간 동안 반응시키고 ECL 검출 시스템(ECL chemiluminescence system, Amersham, Gaitesberg, MA)을 사용하여 발색하였다. 시료 중 단백질 함량의 동질성은 항-β-액틴(anti-β-actin) 항체, 항-LaminA/C을 사용하여 확인하였다. 단백질 발현량 변화는 블롯 중 발색강도를 농도계측기(densitometry)를 이용하여 도출하였는데, 농도계측기 스캔은 이미지 스캔 & 분석 시스템(Image Scan & Analysis System, Alpha-Innotech Co.)을 사용하였다. 각 레인은 AlphaEase™ 버전 5.5 소프트웨어를 사용하여 배경의 강도를 제하고 계산하였다.
- [0062] 간 조직의 경우, 막자 사발에 일정량의 간조직을 액체질소 및 세포 용해 버퍼와 함께 균질화 시킨 후, 조직액을 새 튜브에 옮겨 불텍싱하였다. 14,000 rpm, 4 °C에서 20분간 원심분리한 후 가운데 층을 취하고 브래드포트법에 의해 단백질을 정량하였다. 30 μg의 단백질량을 SDS 폴리아크릴아마이드 겔에 전기영동 시킨 후 α-SMA 단백질의 발현 변화를 웨스턴 블롯(Western blot)을 이용하여 측정하였다.
- [0064] 나. 섬유화 수치 평가
- [0065] 섬유화수치는 병리학 전공의가 이중맹검으로 각 조직시료의 최소 10부의 정도를 검경하여 수행하였으며, 그 기준은 다음과 같다. Stage 0: none; Stage 1: Enlarged, fibrotic portal areas; Stage 2: Periportal or portal-portal septa but intact architecture; Stage 3: Fibrosis with architectural distortion but no obvious cirrhosis; Stage 4: Probable or definite cirrhosis.
- [0067] **실시예 2 : 대식세포 M2 표지인자인 TREM-2의 간 섬유화 억제 확인**
- [0068] 2-1. 간 섬유화 조직에서 TREM-2의 발현 증감 확인
- [0069] 실시예 1-1을 통해 인간 간 섬유화 환자 및 사염화탄소 유도 간 섬유화 마우스에서 분리한 간 조직에서 대식세포 M2 표지인자인 TREM-2의 발현의 증감여부를 웨스턴블롯으로 확인하였고, 그 결과를 도 3a에 나타내었다.
- [0070] 도 3a에 나타낸 바와 같이, 인간 간 섬유화 환자 및 사염화탄소 유도 간 섬유화 마우스에서 분리한 간 조직에서 M2 표지인자인 TREM-2의 발현이 현저히 증가함을 확인할 수 있었다.
- [0072] 2-2. TREM-2의 간 섬유화 억제 확인
- [0073] 간 섬유화 원인물질인 콜라겐과 섬유화 핵심인자인 transforming growth factor-β (TGF-β)등의 유리는 간의 성상세포 (stellate cell) 활성화에 기인한다.

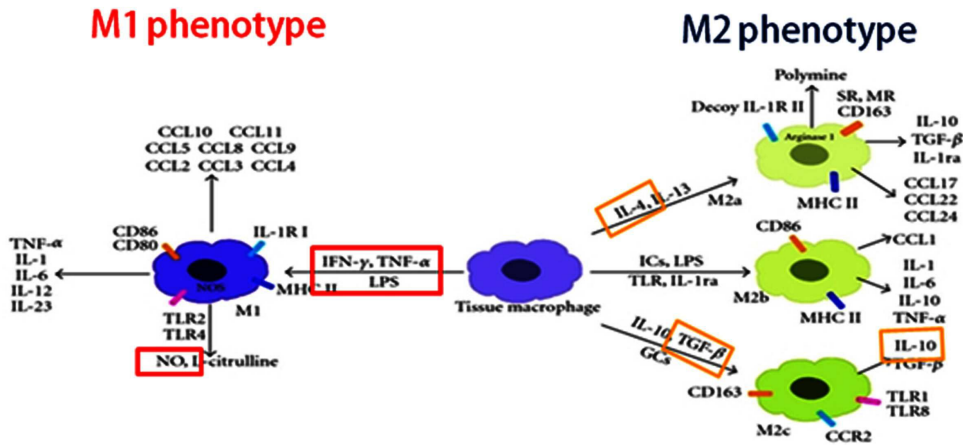
- [0074] 이에, TREM-2 과발현을 시킨 대식세포에서 얻은 배지를 활성화성상세포 유사성격의 마우스 배아 섬유아세포(mouse embryonic fibroblast, MEF)에 처리하여 성상세포 활성화의 지표로 널리 이용되는 지표단백질인 alpha-smooth muscle actin (α -SMA, fibroblast 형으로 분화된 성상세포 특이 단백질) 및 대표 섬유유원질인 collagen-1a1 발현증감여부를 웨스턴블롯으로 확인하였고, 그 결과를 도 3b에 나타내었다.
- [0075] 도 3b에 나타낸 바와 같이, TREM-2 과발현을 시킨 대식세포에서 얻은 배지를 처리 시, α -SMA 및 collagen-1a1 발현이 억제됨을 확인할 수 있었다. 상기 결과로부터, M2 표지인자인 TREM-2 수용체가 간 섬유화를 효과적으로 억제함을 알 수 있었다.
- [0077] **실시예 3 : 금(gold)제제 처리에 의한 대식세포 M2 항섬유화인자인 TREM-2 발현의 증가확인**
- [0078] 금(gold)제제가 M2형 대식세포로의 형질전환을 일으키는 지 여부를 확인하기 위하여, 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포에 lipopolysaccharide(LPS)/interferon-gamma(IFN- γ)을 처리하여 M1 형 대식세포로 분화시키는 조건에서 오라노핀(auranofin)을 처리하고, iNOS 및 TREM-2 발현을 증감 여부를 웨스턴블롯으로 확인하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0079] 도 4에 나타낸 바와 같이, 오라노핀(auranofin) 처리 시, iNOS 발현이 억제되고, TREM-2 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다. 상기 결과로부터, 금(gold)제제, 특히 오라노핀(auranofin)은 M1형 대식세포로의 형질전환을 억제함과 동시에, M2형 대식세포로의 형질전환을 촉진시킨다는 것을 알 수 있었다.
- [0081] **실시예 4 : 금(gold)제제 전 처리 대식세포 배지의 성상세포 노출에 의한 성상세포 활성화의 억제 확인**
- [0082] 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포에 오라노핀(auranofin)을 처리한 후, 배지를 활성화성상세포 유사성격의 MEF 세포에 처리하고, 성상세포 활성화 지표인 α -SMA 발현 증감을 웨스턴블롯으로 확인하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0083] 도 5에 나타낸 바와 같이, 오라노핀(auranofin) 처리 시, α -SMA 발현이 억제됨을 확인할 수 있었다. 상기 결과로부터, 금(gold)제제, 특히 오라노핀(auranofin)은 대식세포의 M2 형질전환 촉진과 TREM-2 발현 증가로 성상세포의 활성화를 억제한다는 것을 알 수 있었다.
- [0085] **실시예 5 : 금(gold)제제 투여에 의한 간 섬유화의 억제 확인**
- [0086] 실시예 1-1을 통해 준비된 사염화탄소 유도 마우스 간 섬유화 모델에 오라노핀(auranofin)을 기존 관절염에 효과가 있다고 알려진 용량을 기준으로 1, 3, 10 mg/kg을 설정하여 주 5회 3주간 경구투약하였다. 투약 종료 후 간 조직을 H&E 염색으로 섬유화 수치를 평가하였으며, 일부 조직은 분쇄하여 성상세포 활성화 지표인 α -SMA와 콜라겐 축적 지표로서 Collagen-1a1을 정량하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0087] 도 6에 나타낸 바와 같이, 오라노핀(auranofin) 처리 시, 성상세포 활성화 지표인 α -SMA와 Collagen 1a1의 발현을 뚜렷이 낮추며, 실제 간 섬유화 수치도 10 mg/kg에서 유의성 있게 저하시킴을 확인할 수 있었다.
- [0089] **실시예 6. 금(gold)제제 처리에 의한 대식세포의 M1 형질전환 억제 및 M2 형질 전환 촉진 효과 확인**
- [0090] 오라노핀(auranofin) 외에 다른 금제제 처리에 의한 대식세포의 M1 형질전환 억제 및 M2 형질 전환 촉진 효과를 추가로 확인하였다.
- [0091] 먼저, 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포에 lipopolysaccharide(LPS)/interferon-gamma(IFN-gamma)을 처리하여 M1 형 대식세포로 분화시키는 조건에서 오라노핀(auranofin)과 유사한 금티오말산 소듐(sodium aurothiomalate) 및 금티오글루코오스(aurothioglucose)를 각각 처리하고, iNOS 발현 증감을 웨스턴블롯으로 확인하였다.
- [0092] 그 결과, 도 7a에 나타낸 바와 같이, 금티오말산 소듐(sodium aurothiomalate) 및 금티오글루코오스(aurothioglucose) 처리 시, iNOS 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0094] 또한, 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포에 IL-4 처리하여 M2 형 대식세포로 분화시키는 조건에서, 오라노핀(auranofin)과 유사한 금티오말산 소듐(sodium aurothiomalate) 및 금티오글루코오스(aurothioglucose)를 각각 처리하고, arginase-1 발현 증감을 웨스턴블롯으로 확인하였다.
- [0095] 그 결과, 도 7b 나타낸 바와 같이, 금티오말산 소듐(sodium aurothiomalate) 및 금티오글루코오스(aurothioglucose) 처리 시, arginase-1 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

[0096] 상기 결과들로부터, 금(gold)제제는 M1형 대식세포로의 형질전환을 억제함과 동시에, M2형 대식세포로의 형질전환을 촉진시킨다는 것을 알 수 있었다.

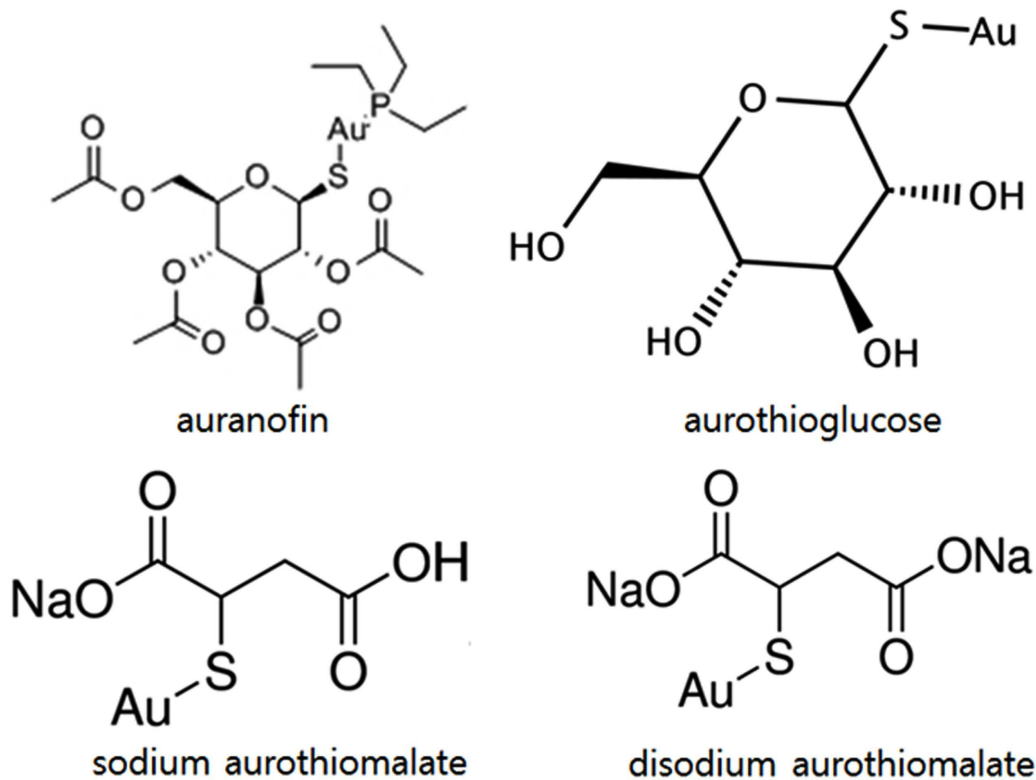
[0098] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

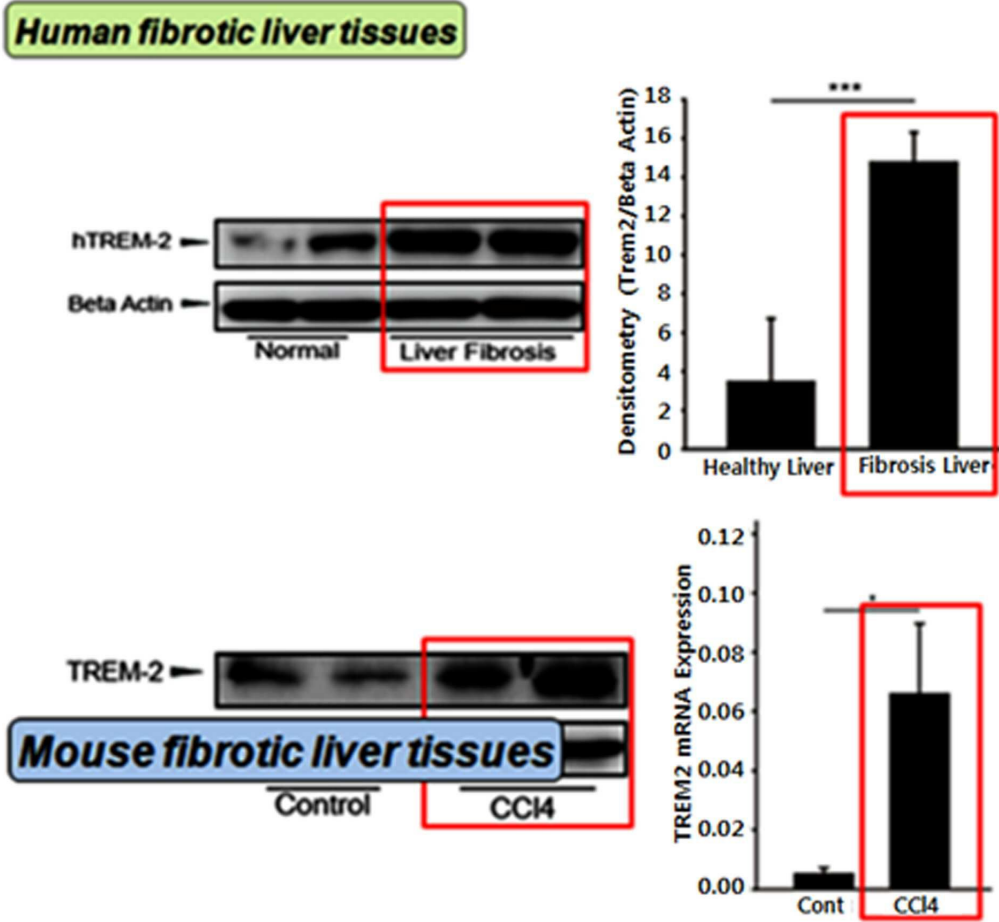
도면1



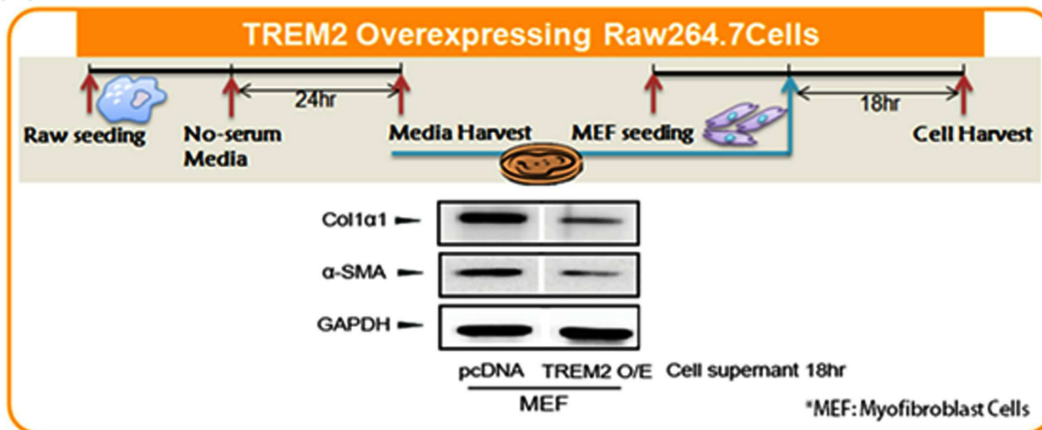
도면2



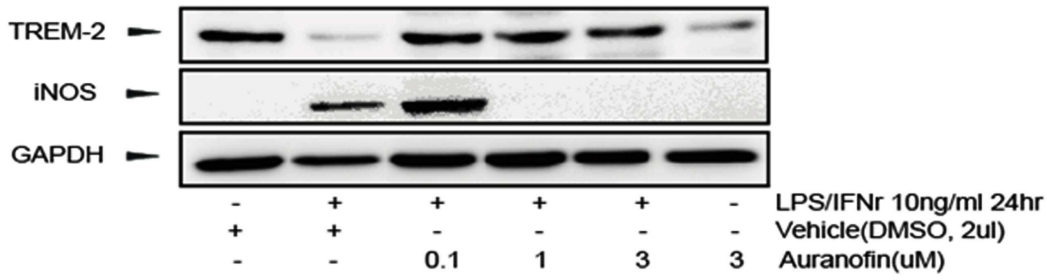
도면3a



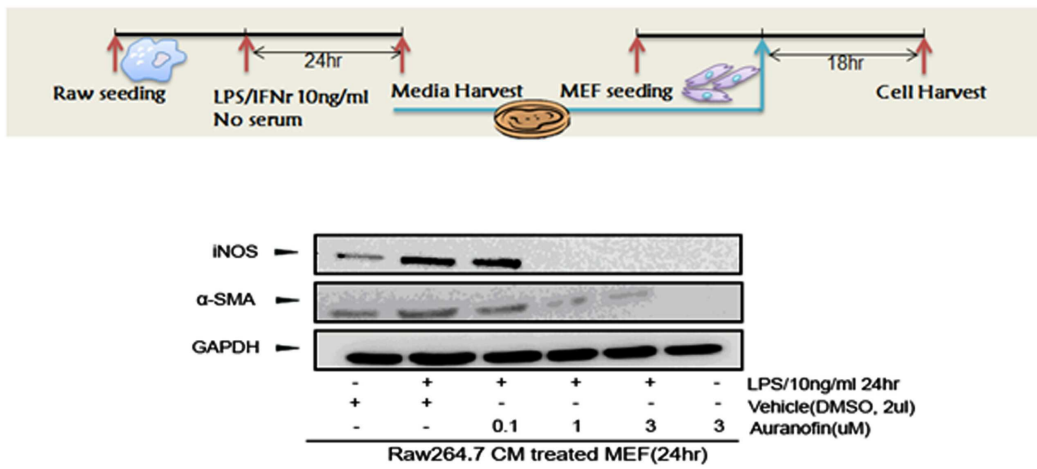
도면3b



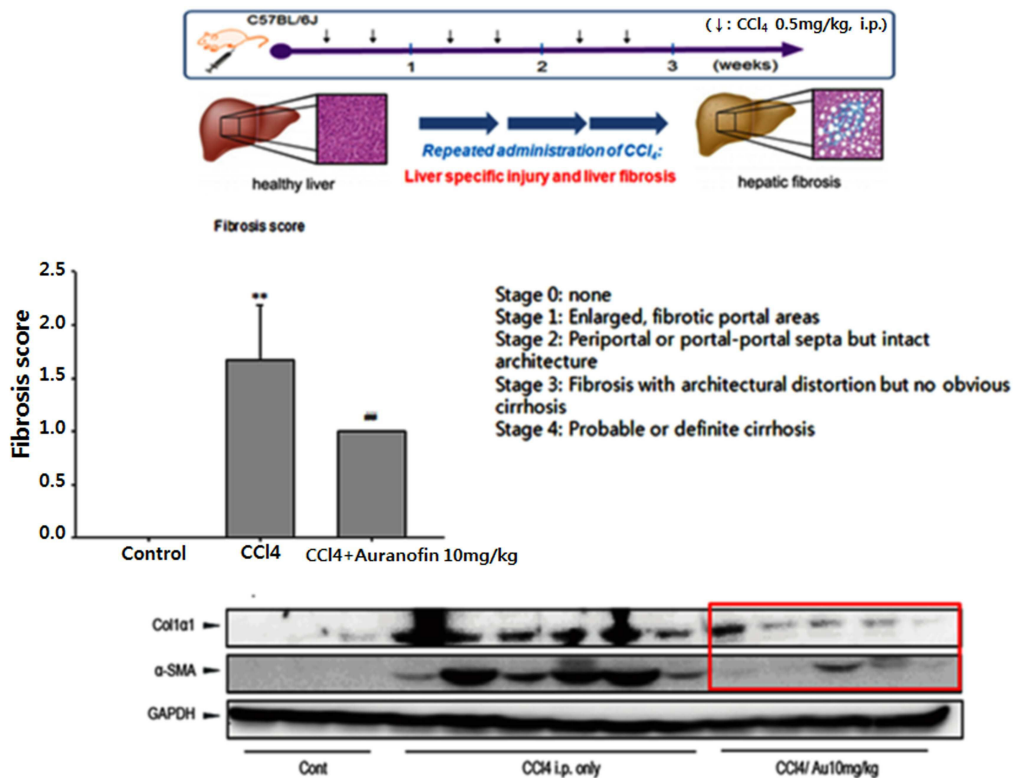
도면4



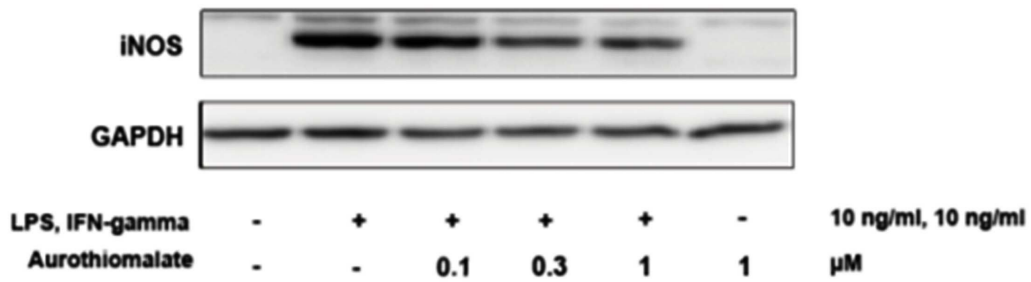
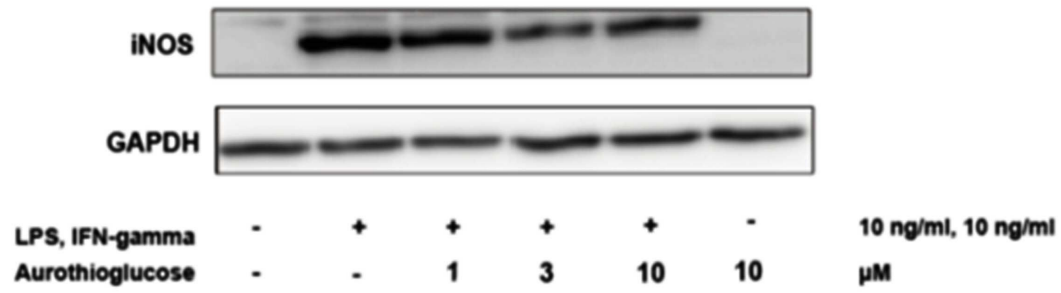
도면5



도면6



도면7a



도면7b

