(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0130500
(43) 공개일자 2024년08월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/70 (2006.01) *A61K 31/277* (2006.01)
A61K 47/10 (2017.01) *A61K 47/12* (2006.01)
A61K 47/36 (2017.01) *A61P 1/16* (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/7023 (2013.01)
A61K 31/277 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0023777
(22) 출원일자 2023년02월22일
심사청구일자 2023년02월22일

(71) 출원인
건양대학교산학협력단
충청남도 논산시 대학로 121 (내동)
(72) 발명자
김도경
대전광역시 서구 관저북로 87 원앙마을1단지아파트 106동 809호
박환우
대전광역시 서구 관저동로90번길 47, 1101동 1303호(관저동, 느리울마을아파트11단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인도담

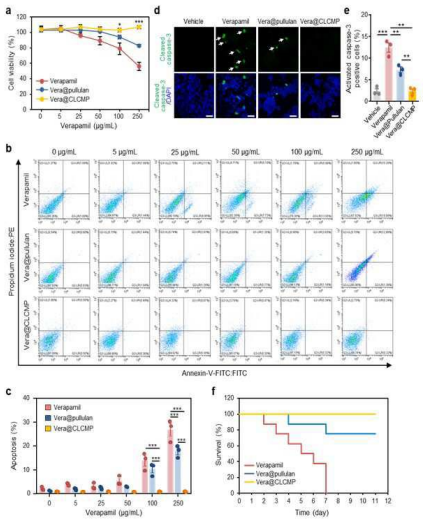
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **베라파밀을 포함하는 대사증후군 치료용 경피약물전달 패치 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 경피약물전달 패치 조성물에 있어서, 베라파밀(Verapamil)이 탑재된 하이드로젤 가교체를 포함하며, 상기 하이드로젤 가교체는 풀루란(Pullulan) 유도체가 시트르산 및 글리세롤을 포함하는 가교제에 의해 가교화된 것을 특징으로 하는, 경피약물전달 패치 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/10 (2013.01)
A61K 47/12 (2013.01)
A61K 47/36 (2013.01)
A61P 1/16 (2018.01)
A61P 3/04 (2018.01)
A61P 3/10 (2018.01)
(72) 발명자
한대원
충청남도 논산시 대림길 7, 103동 508호(부창동, 대림아파트)
정영길
대전광역시 유성구 노은서로172번길 23
이성기
대전광역시 서구 관저동로 190-14(관저동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345352622
과제번호 2017R1A6A1A03015713
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축
연구과제명 명곡의과학연구소
기 여 율 1/2
과제수행기관명 건양대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345347549
과제번호 2018R1D1A3B07045858
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축
연구과제명 대사성 질환 치료를 위한 TBK1 조절약물-나노복합체의 개발 및 오토파지 조절기전 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 건양대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

경피약물전달 패치 조성물에 있어서,

베라파밀(Verapamil)이 탑재된 하이드로젤 가교체를 포함하며,

상기 하이드로젤 가교체는 풀루란(Pullulan) 유도체가 시트르산 및 글리세롤을 포함하는 가교제에 의해 가교화된 것을 특징으로 하는, 경피약물전달 패치 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 풀루란 유도체는 카르복시메틸화 풀루란을 포함하는 것을 특징으로 하는, 경피약물전달 패치 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 풀루란 유도체 100 중량부에 대하여 시트르산 5 내지 30 중량부; 및 글리세롤 2 내지 20 중량부를 포함하는, 경피약물전달 패치 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 하이드로젤 가교체 100 중량부에 대하여, 상기 베라파밀 1 내지 3 중량부를 포함하는, 경피약물전달 패치 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 경피약물전달 패치 조성물은 대사증후군 예방 및 치료용인, 경피약물전달 패치 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 대사증후군은 비만, 지방간 및 당뇨를 포함하는, 경피약물전달 패치 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 경피약물전달 패치 조성물에 관한 것으로, 상세하게, 베라파밀이 탑재되되, 풀루란 유도체를 포함하는 하이드로젤; 및 시트르산과 글리세롤을 포함하는 가교제를 기반으로 하는 하이드로젤 가교체를 포함하도록 구성된, 대사증후군 치료용 경피약물전달 패치 조성물을 제공한다.

배 경 기 술

[0002] 인슐린 저항성, 대사성 염증 및 제2형 당뇨병을 포함한 비만 및 관련 장애는 염증 메커니즘과 연결된 전 세계적으로 주요 공중 보건 문제이다. 대사 기능 장애 관련 지방간 질환(MAFLD)은 단순 지방증에서 섬유증에 이르는 간 상태 그룹을 말하며 간, 지방 조직 및 골격근에서 만성 저등급 염증 상태를 동반하는 경우가 많다. 체중 감량 수술, 지방 흡입 수술, 약물 요법 및 에너지 섭취 감소와 같은 비만에 대한 여러 치료법이 테스트되었지만, 비만 및 MAFLD에 대한 개선된 안전성 및 효능 또는 잠재적인 심각한 부작용을 해결할 수 있는 치료 전략이 시급

히 요구되는 상황이다.

[0003] Autophagy는 간 대사 항상성을 유지하기 위해 세포가 지질 방울(Droplet), 잘못 접힌 단백질 응집체 또는 손상된 세포 소기관과 같은 불필요한 세포 내 구성 요소를 분해하고 재활용할 수 있도록 하는 세포 내 분해 과정이다. Autophagic 과정의 결함은 MAFLD의 발달을 유발할 수 있는 지질 방울, 봉입체 및 독성 단백질 응집체에서 과도한 지질의 제거를 억제하는 것이다. 유비퀴틴 결합 autophagy 수용체 p62/SQSTM1(이하 p62라고 함)은 폴리유비퀴틴화된 기질을 인식하고 이를 autophagosome 막에 고정하여 autophagic 분해를 촉진한다. 특정 병리학적 조건에서 불충분한 자가포식 제거는 단백질 회전율을 손상시켜 p62 및 유비퀴틴화 단백질의 축적에 기여할 수 있게 된다.

[0004] NLR 패밀리 피린 도메인 함유 3(NLRP3) 인플라마좀은 NLRP3, 카스파제 모집 도메인(ASC) 및 카스파제-1을 포함하는 세포사멸 관련 반점 유사 단백질로 구성된 대형 다중단백질 복합체이다. NLRP3 inflammasome은 caspase-1을 자가촉매적으로 활성화하여 전염증성 사이토카인인 interleukin-1β(IL-1β) 및 IL-18의 처리 및 분비를 유도한다. NLRP3 inflammasome을 통한 비만 매개 염증은 MAFLD 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 한편, 티오레독신 상호작용 단백질(TXNIP)은 당뇨병과 비만에서 증가하며 NLRP3 인플라마좀 활성화와 관련이 있다.

[0005] 페닐알킬아민 채널 차단제인 베라파밀은 고혈압, 협심증 및 심장 부정맥을 치료하는 데 사용된다. 본 출원인은 비만 동안 손상된 세포 내 Ca^{2+} 항상성이 간세포에서 p62 및 유비퀴틴화 단백질 포함의 축적을 유도하고 베라파밀 및 Nifedipine과 같은 L-타입 Ca^{2+} 채널 차단제로 치료하면 쥐를 고지방식이(HFD)로부터 유도된 인슐린 저항성 및 간 지방증을 보호한다는 것을 문헌을 통해 입증한 바 있다. 또한 연구에 따르면 베라파밀은 TXNIP/NLRP3 경로를 억제한다. 그러나 Ca^{2+} 채널 차단제는 독성으로 인해 치명적일 수 있으며 짧은 반감기로 인해 짧은 투여 간격이 필요하다. Ca^{2+} 채널 차단제는 경구 투여 후 위장관에서 빠르게 흡수되지만 낮은 용해도와 빠른 초회 통과 대사로 인해 생체이용률이 낮아, 베라파밀의 다양한 투여 경로를 제공하는 약물 전달 시스템이 비만 관련 질병에서 원하는 치료 효과를 달성하기 위해 베라파밀의 제어 방출을 허용한다.

[0006] 비만은 즉각적인 생명을 위협하는 질병이 아니며 장기적인 치료가 필요하기 때문에 새로운 치료 옵션은 안전하고 편리하며 견딜 수 있어야 한다. 경피 약물 전달 시스템은 무통 적용, 우수한 투여 용이성, 더 긴 작용 지속 시간, 환자들 사이의 지속성, 위장관 손상과 같은 부작용 감소를 포함하는 수많은 장점으로 인해 매력적인 치료 방법이다. 또한, 경피 약물 전달 시스템은 대사의 초회 통과 효과를 피할 수 있고 약물의 지속적인 방출을 허용한다. 약물 전달을 위한 유망한 후보인 풀루란 기반 경피약물전달 패치는 다공성 친수성 가교 구조로, 천연 또는 합성 고분자로 만들어진다. 풀루란의 다공성 네트워크 구조는 풀루란 기반 경피약물전달 패치의 젤 매트릭스에 치료제를 적재하고 원하는 방출 동역학에서 방출할 수 있게 한다. 우수한 팽윤성 및 생체 적합성으로 인해 풀루란 기반 경피약물전달 패치는 경피 약물 전달 패치를 위한 매력적인 플랫폼 재료로 간주된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2010-0130502호(2010.12.13)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 비침습적으로 통증 및 부작용 없이 경피를 통해 베라파밀을 효과적으로 전달 가능한 경피약물전달 패치 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 생체 모방 혈관 번들형 초분자 풀루란 기반 경피약물전달 패치 조성물을 통해 베라파밀의 생체이용률을 높이고 지속적인 제어 방출이 가능한 경피약물전달 패치 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 비만, 지방간, 당뇨를 포함하는 대사증후군에 대한 예방 및 치료효과가 있는 경피약물전달 패치 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 경피약물전달 패치 조성물에 있어서, 베라파밀(Verapamil)이 탑재된 하이드로젤 가교체를 포함하며, 상기 하이드로젤 가교체는 풀루란(Pullulan) 유도체가 시트르산 및 글리세롤을 포함하는 가교제에 의해 가교화된 것을 특징으로 하는, 경피약물전달 패치 조성물을 제공한다.

[0012] 일 양태에 따르면, 상기 풀루란 유도체는 카르복시메틸화 풀루란을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0013] 일 양태에 따르면, 상기 풀루란 유도체 100 중량부에 대하여 시트르산 5 내지 30 중량부; 및 글리세롤 2 내지 20 중량부를 포함할 수 있다.

[0014] 일 양태에 따르면, 상기 하이드로젤 가교체 100 중량부에 대하여, 상기 베라파밀 1 내지 3 중량부를 포함할 수 있다.

[0015] 일 양태에 따르면, 상기 경피약물전달 패치 조성물은 대사증후군 예방 및 치료용일 수 있다.

[0016] 일 양태에 따르면, 상기 대사증후군은 비만, 지방간 및 당뇨를 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 경피약물전달 패치 조성물은 비침습적으로 통증 및 부작용 없이 경피를 통해 베라파밀을 효과적으로 전달 가능한 장점이 있다.

[0018] 본 발명에 따르면, 생체 모방 혈관 번들형 초분자 구조를 구현할 수 있게 되어 베라파밀의 화학적 구조 변형없이 지속적인 전달이 가능하며 베라파밀의 생체이용률을 향상시킬 수 있는 장점이 있다.

[0019] 또한, 본 발명에 따르면, 체외 및 생체 내 비만모델에서 TXNIP/NLRP3 인플라마좀 경로를 억제하고 인슐린 민감성을 회복시키고 간 지방증을 역전시킬 수 있어 비만, 지방간 및 당뇨를 포함하는 대사증후군 예방 및 치료 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 풀루란 기반 경피약물전달 패치(Vera@CLCMP)에 대한 세포 독성 분석결과를 나타낸 도면으로, (a)는 베라파밀 농도에 따른 세포독성을 나타낸 결과이며, (b) 및 (c)는 세포 사멸효과를 나타낸 결과이고, (d) 및 (e)는 면역 형광 염색결과를 나타낸 것이며, (f)는 마우스의 Kaplan-Meier 생존 곡선 결과를 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명의 실시예에 따른 풀루란 기반 경피약물전달 패치(Vera@CLCMP)에 대한 포도당 내성 및 인슐린 민감성에 대한 영향 분석결과를 나타낸 도면으로, (a) 및 (b)는 각각 실험설계도 및 Vera@CLCMP를 마우스 등쪽 피부에 투여한 이미지를 나타낸 것이며, (c) 내지 (f)는 포도당 내성 및 인슐린 민감성에 대한 평가결과를 나타낸 도면이다.

도 3은 본 발명의 실시예에 따른 풀루란 기반 경피약물전달 패치(Vera@CLCMP)에 대한 생체 내 형광 이미징 및 생체 분포 분석결과를 나타낸 도면으로, (a)는 365 nm 여기파장에 대한 일광 및 UV광하에서 베라파밀 및 Verapamil-FITC 접합 용액의 이미지를 나타낸 결과이며, (b)는 Verapamil-FITC 기반 Vera@CLCMP를 털이 없는 마우스의 등쪽 피부에 적용한 이미지를 나타낸 결과이고, (c)는 Verapamil-FITC 기반 Vera@CLCMP로 치료한 후 마우스의 형광 이미지를 나타낸 결과이며, (d)는 형광각도를 정량화한 결과이고, (e)는 지정된 시점에서 Verapamil-FITC 기반 Vera@CLCMP로 처리된 마우스 등쪽 피부의 조직학적 섹션의 형광 이미지를 나타낸 결과이며, (f)는 표시된 라인을 가로지르는 라인 스캔 결과를 나타낸 것이고, (g)는 Verapamil-FITC 기반 Vera@CLCMP로 치료한 후 1일 및 4일에 심장, 간, 비장, 폐, 신장 및 췌장의 생체외 형광영상을 나타낸 것이며, (h)는 각 장기의 형광강도를 정량화한 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 본 발명의 실시예에 따른 풀루란 기반 경피약물전달 패치(Vera@CLCMP)의 단백질 내포물 축적에 대한 영향 분석결과를 나타낸 도면으로, (a) 및 (c)는 세포 용해물의 Triton X-100-가용성 및 불용성 분획을 항-유비퀴틴 및 항-p62 항체로 면역블롯팅한 결과를 나타낸 도면이며, (b) 및 (d)는 밴드 강도를 정량화하고 정규화한 결과를 나타낸 도면이고, (e) 및 (g)는 지시된 처리로 HepG2 세포에서 유비퀴틴(녹색) 및 p62(적색)에 대한 면역형광 염색 결과를 나타낸 도면이며, (f) 및 (h)는 유비퀴틴 및 p62 응집체의 크기를 정량화한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 본 발명의 실시예에 따른 풀루란 기반 경피약물전달 패치(Vera@CLCMP)에 대한 잠재적 항비만 효과 평가 결과를 나타낸 도면으로, (a)는 HFD를 공급하고 Vera@CLCMP로 치료한 마우스의 체중변화를 나타낸 결과이며, (b)는 치료기간 동안 음식 섭취량을 나타낸 결과이고, (c)는 각 그룹의 간의 형태를 나타낸 결과이며, (d)는 각 그룹의 마우스 총 간의 질량을 표시한 것이고, (e) 내지 (g)는 혈청, ALT, AST 및 ALP 수준을 나타낸 결과이며, (h)는 H&E 염색(위) 및 각 그룹의 마우스 간 절편의 Oil-Red O 염색(아래) 결과를 나타낸 도면이고, (i)는 조직학적 MAFLD 활동 점수(NAS)를 나타낸 결과이며, (j)는 Oil-Red O-stained 영역을 정량화한 결과를 나타낸 도면이고, (k)는 각 그룹의 마우스에서 부고환 백색 지방조직의 H&E 염색결과이며, (l)은 부고환 백색 지방 조직의 평균 지방 세포 면적을 정량화한 결과를 나타낸 도면이다.

도 6은 본 발명의 실시예에 따른 풀루란 기반 경피약물전달 패치(Vera@CLCMP)에 대한 분자 메커니즘 분석결과를 나타낸 도면으로, (a) 및 (c)는 간 조직 용해물의 Triton X-100 가용성 및 불용성 분획을 항-유비퀴틴 및 항-p62 항체로 면역블롯팅한 결과를 나타낸 결과이며, (b) 및 (d)는 밴드 강도를 정량화하고 정규화하여 나타낸 결과이며, (e)는 각 그룹의 마우스 간 조직에서 p62에 대한 면역 조직 화학 염색 결과를 나타낸 결과이고, (f)는 p62 면역 반응성의 광학 밀도를 나타낸 결과이며, (g)는 항-포스포-CaMKII 항체를 사용한 면역블롯팅에 의해 표시된 각 그룹의 마우스로부터 간 조직을 수집하고 분석한 결과이고, (h)는 밴드 강도를 정량화하고 CaMKII 강도로 정규화한 결과를 나타낸 도면이다.

도 7은 본 발명의 실시예에 따른 풀루란 기반 경피약물전달 패치(Vera@CLCMP)에 대한 분자 메커니즘 분석결과를 나타낸 도면으로, (a)는 세포 용해물을 항-NLRP3 및 항-카스파제-1로 면역블롯팅한 결과를 나타낸 것이고, (b)는 밴드 강도를 정량화하고 정규화한 결과를 나타낸 것이고, (c)는 간 조직 용해물을 항-NLRP3 및 항-카스파제-1 항체로 면역블롯팅한 결과를 타나낸 것이며, (d)는 밴드 강도를 정량화하고 정규화한 결과를 나타낸 것이고, (e)는 각 그룹의 마우스 간 조직에서 NLRP3에 대한 면역 조직 화학 염색결과를 나타낸 것이며, (f)는 NLRP3 면역 반응성의 광학 밀도 결과를 나타낸 것이고, (g)는 각 그룹의 마우스 간 조직에서 *Tnfa, Ccl2, Tgfb1, Col1a1* 및 *Emr1* mRNA 수준의 qRT-PCR 분석결과를 나타낸 것이며, (h)는 항-TXNIP 항체로 면역블롯팅한 결과를 나타낸 것이고, (i)는 밴드 강도를 정량화하고 정규화한 결과를 나타낸 것이며, (j)는 간 조직 용해물을 항-TXNIP 항체로 면역블롯팅한 결과를 나타낸 것이고, (k)는 밴드 강도를 정량화하고 정규화한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명의 특징과 장점은 첨부된 도면에 의하여 설명되는 실시 예에 의하여 보다 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[0022] 본 발명의 실시 예에 기재되거나 도면에 도시된 구성요소들의 구성 및 배열에 의해 본 발명의 응용이 제한되는 것은 아니다. 본 발명은 다른 실시 예들로 구현될 수 있고, 다양한 방법으로 수행될 수 있다. 또한, 장치 또는 요소의 방향 등과 같은 용어들에 관하여 실시 예에 사용된 표현 및 술어는 단지 본 발명의 설명을 단순화하기 위해 사용되며, 관련된 장치 또는 요소가 단순히 특정 방향을 가져야 함을 나타내거나 의미하지 않는다.

[0023] 또한, 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정하여 해석되어서는 아니되며, 발명자가 발명의 용어와 개념을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념에 입각하여 기재한 것으로 해석하여야 한다.

[0024] 따라서 본 발명은 제시되는 실시예에 한정되지 않으며, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의하여 본 발명의 기술 사상과 아래에 기재될 특허청구 범위에 기재된 기술상의 균등한 범위 내에서 다양한 수정 및 변경이 가능하다.

[0026] 본 발명은 경피약물전달 패치 조성물에 있어서, 베라파밀(Verapamil)이 탑재된 하이드로젤 가교체를 포함하며, 상기 하이드로젤 가교체는 풀루란(Pullulan) 유도체가 시트르산 및 글리세롤을 포함하는 가교제에 의해 가교화된 것을 특징으로 하는, 경피약물전달 패치 조성물을 제공한다.

[0027] 풀루란(Pullulan)은 효모와 유사한 곰팡이인 *Aureobasidium pullulans*에 의해 생성되는 천연세포외 다당류로, 무자극, 무독성, 무면역성, 생분해성, 피부 친화성, 우수한 패치 형성성 및 점착성을 가진다. 이러한 장점들이 많음에도 불구하고 풀루란의 높은 친수성 및 약한 유연성 등 문제로 널리 사용되지 못하고 있는 상황이다.

[0028] 본 발명에서는 이러한 풀루란의 유도체화된 구조를 가진 풀루란 유도체를 기본구조체로 사용함으로써 높은 수산

기 함량으로 인한 화학적 변형을 효과적으로 억제하였다.

[0029] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 풀루란 유도체는 카르복시메틸화 풀루란을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0030] 이러한 카르복시메틸화된 풀루란을 경피약물전달 패치의 기본구조체로 사용함으로써 상술된 화학적 변형 억제는 물론, 유연성 증가에 따른 연성 구조를 가지며 장벽 성능 및 약물의 적재 용량을 향상시키게 된다.

[0031] 하이드로젤 가교체는 상술된 풀루란 유도체 기반 기본구조체를 시트르산 및 글리세롤을 포함하는 가교제와의 에스테르화 반응을 통해 수득된다.

[0032] 구체적으로, 글리세롤의 수산기(-OH)와 시트르산의 사이클릭 무수물을 사용한 기본구조체의 에스테르화에 의해 새로운 카르복실레이트기(COO-)를 생성하며, 이 그룹은 이웃한 카르복실레이트기(COO-)와 분자 내 무수물 모이어티(Moiety)를 형성하게 된다.

[0033] 본 발명의 일 구현예에 따른 경피약물전달 패치는 상기 풀루란 유도체, 즉 기본구조체 100 중량부에 대하여, 상기 시트르산 5 내지 30 중량부, 바람직하게는 10 내지 25 중량부, 보다 바람직하게는 15 내지 25 중량부; 및 상기 글리세롤 2 내지 20 중량부, 바람직하게는 5 내지 15 중량부, 보다 바람직하게는 6 내지 12 중량부를 포함하도록 구성되는 것이 유리하다.

[0034] 이러한 하이드로젤 가교체를 포함함으로써, 계층적으로 조직화된 비등방성 기공구조를 갖는 3차원 구조의 경피약물전달 패치를 구현할 수 있게 되어 이러한 패치에 탑재되는 약물의 화학적 구조 변형없이 지속적인 약물 전달이 가능하며 약물의 생체 이용률을 향상시킬 수 있게 된다. 본 발명에서 상기 약물은 베라파밀(Verapamil)을 포함하도록 구성된다.

[0035] 베라파밀(Verapamil)은 FDA가 고혈압 치료제로 승인한 L형 칼슘 채널 억제제이다. 상세하게, 베라파밀은 칼슘이온통로와 결합하여 세포 내로 칼슘이온유입을 차단한다.

[0036] 본 발명의 일 구현예에 따른 경피약물전달 패치 조성물은 상기 하이드로젤 가교체 100 중량부에 대하여, 상기 베라파밀 1 내지 3 중량부, 바람직하게는 2 내지 3 중량부가 탑재되도록 구성될 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 바람직한 구현예에 따르면, 농도 15 내지 30 ㎎/㎖의 베라파밀 용액을 하이드로젤 가교체 기반 경피약물전달 패치에 일정 부피만큼 떨어뜨린 후 40 내지 60℃에서 4 내지 6시간 보관 후 진공 건조시킴으로써 베라파밀 탑재 풀루란 기반 경피약물전달 패치(Vera@CLCMP)를 수득할 수 있게 된다. 이러한 베라파밀 탑재 풀루란 기반 경피약물전달 패치(Vera@CLCMP)는 상세하게, 시트르산 및 글리세롤이 가교된 카르복시메틸화 풀루란 기반 하이드로젤 (CarboxyMethyl Pullulan-based patch Cross-Linked with citric acid and glycerol lingakeges, CLCMP)에 베라파밀(Verapamil)이 담지된 구조를 가지게 된다.

[0038] 본 발명의 일 구현예에 따른 경피약물전달 패치 조성물은 비만, 지방간 및 당뇨를 포함하는 대사증후군 예방 및 치료용도로 사용될 수 있다. 구체적으로, 상기 경피약물전달 패치 조성물에 탑재된 베라파밀이 지속적으로 방출되어 각질층을 통과하여 진피에 도달함으로써 TXNIP/NLRP3 경로를 억제하고 자가포식 청소율을 개선함으로써 비만 유발 인슐린 저항성과 간 비장증을 완화하게 된다. 보다 상세한 내용을 하기 실시예를 통해 설명하도록 한다.

[0040] 이하 본 발명의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0042] (실시예)

[0043] 10 g의 풀루란(Tokyo Chemical Industry, Japan)를 탈이온수 40 ㎖에 완전히 용해시킨 후 이소프로필 알코올 12 ㎖를 첨가하였다. 이때 초음파처리와 교반을 동시에 수행하였다.

[0044] 이어서, 9 M NaOH 10 ㎖를 첨가하고 70℃에서 15분 동안 가열하였으며 수득된 혼합물을 3 M ClCH2COOH 10 ㎖ 및 이소프로필 알코올 6 ㎖ 존재하에 70℃에서 4시간 동안 반응시켜 혼합물의 색상이 밝은 갈색에서 어두운 갈색으로 변하도록 하였다. 이러한 과정을 2회 더 반복하여 수행하였으며 각 반복과정은 동일하게 70℃에서 4시간 동안 유지하도록 하여 샘플을 수득하였다.

[0045] 상기 샘플을 MeOH 1 L에 추가하여 교반한 후 상청액을 제거하고 다시 MeOH로 여러 번 세척하였다. 세척 후 수득된 샘플을 탈이온수에 용해시키고 0.1 M HCl에 대해 5시간 동안 투석 한 후, 탈이온수에 대해 5일 동안 투석하여 정제하였다. 다음, 정제된 샘플을 다시 MeOH로 회수하고 진공 농축기에서 건조시켜 카르복시메틸화 풀루란을 제조하였다.

[0046] 제조된 카르복시메틸화 풀루란 100 중량부에 대하여, 시트르산 20 중량부 및 글리세롤 10 중량부를 탈이온수 20 ㎖ 존재하에 상온에서 혼합시킨 후 초음파로 기포를 제거하여 하이드로젤 가교체를 포함하는 용액을 제조하였다.

[0047] 다음, 제조된 하이드로젤 가교체 용액 500 ㎕를 실리콘 몰드로 옮긴 후 50℃에서 24시간 건조시키고 140℃에서 5분 동안 경화시켜 3차원 구조의 하이드로젤 패치(0.2g 중량)를 제조하였다.

[0048] 마지막으로, 상기 제조된 하이드로젤 패치에 25 ㎎/㎖ Verapamil 용액 200 ㎕를 떨어뜨린 후 50에서 5시간 동안 보관한 후 진공건조시켜 베라파밀 탑재 풀루란 기반 경피약물전달 패치(Vera@CLCMP)를 수득하였다.

[0050] 평가예 1: *In vitro* and *in vivo* 세포독성 분석

[0051] 상기 실시예에 따라 제조된 풀루란 기반 경피약물전달 패치(Vera@CLCMP)에 대해 세포 독성 분석을 하였으며, 그 결과를 도 1에 나타내었다. (a)는 베라파밀 농도에 따른 세포독성을 나타낸 결과이며, (b) 및 (c)는 세포 사멸 효과를 나타낸 결과이고, (d) 및 (e)는 면역 형광 염색결과를 나타낸 도면이며, (f)는 마우스의 Kaplan-Meier 생존 곡선 결과를 나타낸 것이다.

[0052] 구체적으로, WST-8 분석 키트(Daeil Lab Service, Korea)를 사용하여 HepG2 세포 생존율을 평가하였다. 이를 위해 HepG2 세포를 웰당 1 x 104 세포로 96-웰 플레이트에 도말하고 PBS(Phosphate buffered saline, pH 7.4), Vera@pullulan 및 Vera@CLCMP에 용해된 지시된 농도의 베라파밀로 24시간 동안 처리하였다. 이어서 WST-8 시약 10 μL를 각 웰에 첨가하고 5 % CO_2 인큐베이터(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)에서 37 ° C에서 30분 동안 인큐베이션한 후, Epoch2 마이크로플레이트 판독기(Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA)를 사용하여 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 이에 따른 세포독성 결과를 도 1(a)에 나타내었다. 여기서 Vera@pullulan는 풀루란의 카르복시메틸화 및 가교과정이 적용되지 않은 베라파밀 탑재 풀루란 기반 경피약물전달 패치를 지칭한다.

[0053] 또한, 유동 세포 계측법을 이용하여 Annexin V-FITC 및 propidium iodide 염색을 사용하여 HepG2 세포에서의 세포 사멸효과를 관찰하였으며, 그 결과를 도 1(b) 및 도 1(c)에 나타내었다.

[0054] 상기 사멸효과를 더 확인하기 위해 면역 형광 염색법을 사용하여 caspase-3의 활성 형태 발현을 평가하였으며, 그 결과를 도 1(d) 및 도 1(e)에 나타내었다.

[0055] 마지막으로, 마우스의 Kaplan-Meier 생존 곡선을 이용하여 안전성 및 독성을 평가하였다. 구체적으로, 50 mg/kg Vera@CLCMP 및 Vera@pullulan로 마우스의 등쪽 피부에 매일 적용한 경우; 및 대조군 마우스에게 50 mg/kg 베라파밀을 복강 내 주사한 경우에 대한 마우스의 Kaplan-Meier 생존 곡선 평가하였으며, 그 결과를 도 1(f)에 나타내었다.

[0056] 도 1(a)에서 확인할 수 있듯이, Vera@CLCMP의 경우 동일한 농도의 베라파밀(250 μg/mL)까지 매우 낮은 세포 독성을 나타낸 반면, 유리 베라파밀(Verapamil) 및 Vera@pullulan의 경우 고농도에서 세포독성을 나타내었다.

[0057] 또한, 도 1(b) 및 (c)에서 확인할 수 있듯이, 유리 베라파밀(Verapamil) 및 Vera@pullulan으로 24시간 동안 처리한 경우 용량 의존적으로 세포자살이 유의하게 유도되는 반면, Vera@CLCMP의 경우 HepG2 세포에서 세포자멸사에 영향을 미치지 않았다.

[0058] 도 1 (d) 및 (e)에서 확인할 수 있듯이, 유리 베라파밀(Verapamil) 및 Vera@pullulan으로 처리된 HepG2 세포에서 활성 caspase-3 양성 세포의 수가 유의하게 증가한 반면, Vera@CLCMP의 경우 활성 caspase-3 양성 세포의 수에 변화가 없었다.

[0059] 도 1 (f)에서 확인할 수 있듯이, 7일 째 Vera@pullulan로 처리된 마우스의 경우 80%가 여전히 살아있는 반면, 유리 베라파밀(Verapamil)로 처리된 마우스의 경우 모두 사망하였다. 또한, Vera@CLCMP로 처리된 마우스의 경우 생존율이 크게 향상된 것을 확인할 수 있다.

[0060] 상술된 결과들은 Vera@CLCMP가 시험관 내 또는 생체 내에서 눈의 띄는 독성을 유발하지 않음을 시사한다.

[0062] 평가예 2: 포도당 내성 및 인슐린 민감성에 대한 영향 분석

[0063] 상기 실시예에 따라 제조된 풀루란 기반 경피약물전달 패치(Vera@CLCMP)의 경피 투여가 HFD 유도 비만 마우스에서 포도당 내성 및 인슐린 민감성에 영향을 미치는지 여부를 평가하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2(a) 및 도 2(b)는 각각 실험설계도 및 Vera@CLCMP를 마우스 등쪽 피부에 투여한 이미지를 나타낸 것이며, 도 2(c) 내지 (f)는 포도당 내성 및 인슐린 민감성에 대한 평가결과를 나타낸 도면이다.

[0064] 구체적으로, 도 2(a) 및 (b)에 도시된 바와 같이, 수컷 마우스를 무작위로 4개 그룹으로 분류한 후 9주 동안 HFD 고지방 식이(HFD)를 먹인 HFD 마우스 그룹에 대해 Vera@CLCMP로 치료하였다. 포도당 내성 검사(GTT)의 경우 6시간 금식 후 마우스에게 D-포도당(1g/kg-1 체중)을 복강 내 주사하였으며, 인슐린 내성 검사(ITT)의 경우 6시간 금식 후 마우스에게 인슐린(0.65 U kg-1 체중)을 복강 내 주사하였다. 표시된 시점에서 꼬리 닉에서 혈액을 채취하고 Accu-Chek 혈당 모니터링 시스템(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)을 사용하여 혈당을 측정하였으며, 그 결과를 도 2(c) 내지 (f)에 나타내었다. 한편, 저지방 식이(LFD)를 먹인 마우스를 대조군으로 사용하였다.

[0065] 도 2(c) 내지 (f)에서 확인할 수 있듯이, 포도당 및 인슐린 내성 시험결과는 HFD를 먹인 마우스가 LFD를 먹인 마우스 대비 포도당 내성 및 인슐린 저항성이 손상된 것으로 나타내었다.

[0066] 특히 도 2(c) 및 (e)에서 확인할 수 있듯이, Vera@CLCMP 치료 그룹에서 포도당 내성이 현저하게 개선되었다. 또한 도 2(d) 및 (f)에서 확인할 수 있듯이, Vera@CLCMP 치료 그룹의 경우 대조군 그룹 대비 인슐린 저항성이 낮았으며, Vera@CLCMP 치료 그룹의 경우 대조군 그룹보다 포도당 곡선 아래에서 훨씬 더 작은 영역을 보여줬다. 이러한 결과는 Vera@CLCMP를 사용한 치료가 HFD로 유발된 포도당 불내성과 인슐린 저항성을 역전시킴을 시사한다.

[0068] 평가예 3: 생체 내 형광 이미징 및 생체 분포 분석

[0069] 상기 실시예에 따라 제조된 풀루란 기반 경피약물전달 패치(Vera@CLCMP)를 이용하여 베라파밀의 피부장벽 통과 여부를 조사하였으며, 그 결과를 도 3에 도시하였다.

[0070] 구체적으로, FITC(Fluorescein isothiocyanate)이 접합된 베라파밀(Verapamil-FITC)이 탑재된 풀루란 기반 경피약물전달 패치(Vera@CLCMP)를 사용하여 생체 내 형광 이미징 및 생체 분포를 분석하였다. 도 3(a)는 365 nm 여기파장에 대한 일광 및 UV광하에서 베라파밀 및 Verapamil-FITC 접합 용액의 이미지를 나타낸 결과이며, 도 3(b)는 Verapamil-FITC 기반 Vera@CLCMP를 털이 없는 마우스의 등쪽 피부에 적용한 이미지를 나타낸 결과이고, 도 3(c)는 Verapamil-FITC 기반 Vera@CLCMP로 치료한 후 마우스의 형광 이미지를 나타낸 결과이며, 도 3(d)는 형광각도를 정량화한 결과이고, 도 3(e)는 지정된 시점에서 Verapamil-FITC 기반 Vera@CLCMP로 처리된 마우스 등쪽 피부의 조직학적 섹션의 형광 이미지를 나타낸 결과이며, 도 3(f)는 표시된 라인을 가로지르는 라인 스캔 결과를 나타낸 것이고, 도 3(g)는 Verapamil-FITC 기반 Vera@CLCMP로 치료한 후 1일 및 4일에 심장, 간, 비장, 폐, 신장 및 췌장의 생체외 형광영상을 나타낸 것이며, 도 3(h)는 각 장기의 형광강도를 정량화한 결과를 나타낸 것이다.

[0071] 도 3(a) 및 (b)에서 확인할 수 있듯이, Verapamil-FITC에서 파생된 강한 녹색 형광이 물에서 관찰되었다.

[0072] 또한, 도 (c) 및 (d)에서 확인할 수 있듯이, 생체 내 형광 이미지는 마우스 등 피부에 있는 Verapamil-FITC 기반 Vera@CLCMP의 FITC 형광신호가 적용 후 적어도 4일 동안 지속된 반면, Verapamil-FITC 기반 Vera@pullulan의 경우 1일 이상 지속되지 못하였다. 또한, 자가형광 수준 이상의 FITC 형광 신호는 대조군 마우스의 등쪽 피부에서 검출되지 않았다.

[0073] 도 (e) 및 (f)에서 확인할 수 있듯이, Verapamil-FITC는 Verapamil-FITC 기반 Vera@CLCMP로 처리된 마우스이 적용 부위에서 고정된 등 피부의 조직학적 분석에 따라 적용 24시간 이내에 각질층을 관통하여 진피에 도달하였다.

[0074] 또한, 도 (g) 및 (h)에서 확인할 수 있듯이 Verapamil-FITC 기반 Vera@CLCMP의 경피 투여 후 Verapamil-FITC(형광으로 표시됨)는 적어도 4일 동안 간에서 유지된 반면, Verapamil-FITC의 복강 투여 및 Verapamil-

FITC 기반 Vera@pullulan의 경피 투여의 경우 FITC 신호가 마우스의 간에서 1일 이상 지속되지 못하였다.

[0076] 평가예 4: 단백질 내포물의 축적에 대한 영향 분석

[0077] 상기 실시예에 따라 제조된 풀루란 기반 경피약물전달 패치(Vera@CLCMP)가 포화 지방산에 의해 유도된 단백질 내포물의 축적에 영향을 미치는지 여부를 조사하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0078] 구체적으로, HepG2 세포를 방출 배지의 존재 또는 부재 하에 12시간 동안 500 μM 팔미테이트 또는 BSA(비히클)로 처리하고 표시된 기간 동안 37 ℃에서 38.35 μg/mL 베라파밀이 탑재된 Vera@CLCMP와 함께 배양하였다. 도 4 (a) 및 (c)는 세포 용해물의 Triton X-100-가용성 및 불용성 분획을 항-유비퀴틴 및 항-p62 항체로 면역블롯팅한 결과를 나타낸 도면이며, 도 4(b) 및 (d)는 밴드 강도를 정량화하고 정규화한 결과를 나타낸 도면이고, 도 4(e) 및 (g)는 지시된 처리로 HepG2 세포에서 유비퀴틴(녹색) 및 p62(적색)에 대한 면역형광 염색 결과를 나타낸 도면이며, 도 4 (f) 및 (h)는 유비퀴틴 및 p62 응집체의 크기를 정량화한 결과를 나타낸 도면이다.

[0079] 도 4(a) 및 (b)에서 확인할 수 있듯이, Vera@CLCMP의 방출 매질로 처리된 HepG2 세포의 세제-가용성 분획에서 유비퀴틴화 단백질 및 p62의 수준에서 어떤 시점에서도 감지할 수 있는 변화가 관찰되지 않았다.

[0080] 그러나, 도 4(c) 및 (d)에서 확인할 수 있듯이, 시간 의존적 방식으로 Vera@CLCMP의 방출매질로의 전처리는 HepG2 세포의 세제-불용성 분획에서 상당히 팔미틴산 유도된 폴리유비퀴틴화 단백질 및 p62 패치를 패치하였다.

[0081] 또한, 도 4(e) 및 (f)에서 확인할 수 있듯이, Vera@CLCMP의 방출 매체가 폴리유비퀴틴화 응집체의 크기를 시간 의존적 방식으로 감소시켰다. 도 4(g) 및 (h)에서 확인할 수 있듯이, Vera@CLCMP의 방출 매체로 전처리하면 팔미테이트 유도 p62 양성 단백질 응집체가 감소하였다. 이러한 결과는 Vera@CLCMP에서 베라파밀의 지속적인 방출이 자가포식 청소율을 향상시킴을 시사한다.

[0083] 평가예 5: 잠재적 항비만 효과 평가

[0084] 상기 실시예에 따라 제조된 풀루란 기반 경피약물전달 패치(Vera@CLCMP)의 잠재적 항비만 효과를 조사하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0085] 구체적으로, HFD를 C57BL/6 마우스에 먹이고 50 mg/kg Vera@CLCMP를 2주 동안 주 3회 등 피부에 적용하면서 체중을 모니터링하였다.

[0086] 도 5(a)는 HFD를 공급하고 Vera@CLCMP로 치료한 마우스의 체중변화를 나타낸 결과이며, 도 5(b)는 치료기간 동안 음식 섭취량을 나타낸 결과이고, 도 5(c)는 각 그룹의 간의 형태를 나타낸 결과이며, 도 5(d)는 각 그룹의 마우스 총 간의 질량을 표시한 것이고, 도 5(e) 내지 (g)는 혈청, ALT, AST 및 ALP 수준을 나타낸 결과이며, 도 5 (h)는 H&E 염색(위) 및 각 그룹의 마우스 간 절편의 Oil-Red O 염색(아래) 결과를 나타낸 도면이고, 도 5(i)는 조직학적 MAFLD 활동 점수(NAS)를 나타낸 결과이며, 도 5(j)는 Oil-Red O-stained 영역을 정량화한 결과를 나타낸 도면이고, 도 5(k)는 각 그룹의 마우스에서 부고환 백색 지방조직의 H&E 염색결과이며, 도 5(l)은 부고환 백색 지방 조직의 평균 지방 세포 면적을 정량화한 결과를 나타낸 것이다.

[0087] 도 5(a) 및 (b)에서 확인할 수 있듯이, Vera@CLCMP로 치료하면 HFD를 먹인 비만 마우스에서 단 1주일 만에 체중이 7.7g 감소했으며 그 이후에는 더 이상 효과가 없었다. 이에 반해, 음식 섭취량은 비만 마우스의 두 그룹 간에 비슷하였다. 이러한 결과는 투여 빈도가 낮은 Vera@CLCMP가 비만 마우스의 체중을 줄이기에 충분하다는 것을 시사한다.

[0088] 또한, 도 5(c)에서 확인할 수 있듯이, 거시적으로, 비히클 처리된 비만 마우스의 간은 창백한 반면, Vera@CLCMP 처리된 비만 마우스의 간은 적갈색을 나타내었다. 도 5(d)에서 확인할 수 있듯이, Vera@CLCMP 처리된 비만 마우스는 비히클 처리된 비만 마우스에 비해 간 중량이 현저하게 감소하였다.

[0089] 도 5(e) 내지 (g)에서 확인할 수 있듯이, ALT, AST 및 ALP의 혈청 수준도 Vera@CLCMP로 치료한 후 유의하게 낮았다.

[0090] 도 5(h) 및 (i)에서 확인할 수 있듯이, CLCMP 처리된 HFD 공급 마우스는 간세포 팽창, 소엽 염증 및 지방증의 징후를 나타낸 반면, Vera@CLCMP로 치료하면 CLCMP 처리된 HFD 공급 마우스와 비교하여 간세포 지방증, 팽창 및

소엽 염증이 크게 감소하였다. 도 5(j)에서 확인할 수 있듯이, Vera@CLCMP로 치료하면 비히클 처리된 HFD 공급 마우스 대비 간 지질수준의 극적인 감소를 나타내었다.

[0091] 도 5(k) 및 (l)에서 확인할 수 있듯이, Vera@CLCMP 처리 마우스의 부고환 백색 지방 조직의 지방세포 크기는 HFD 공급 후 비히클 처리 마우스의 크기보다 훨씬 작았다.

[0092] 이러한 결과는 Vera@CLCMP로 치료하면 식이 유발성 비만과 간 지방증을 예방할 수 있음을 시사한다.

[0094] 평가예 6: 분자 메커니즘 분석

[0095] 상기 실시예에 따라 제조된 풀루란 기반 경피약물전달 패치(Vera@CLCMP)의 치료 효과를 뒷받침하는 분자 메커니즘 분석을 하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0096] 구체적으로, Immunoblotting 및 immunohistochemistry 분석법을 사용하여 HFD 공급 마우스의 간에서 Autophagy 제거에 대한 Vera@CLCMP의 효과를 조사하였다. 도 6(a) 및 (c)는 간 조직 용해물의 Triton X-100 가용성 및 불용성 분획을 항-유비퀴틴 및 항-p62 항체로 면역블롯팅한 결과를 나타낸 결과이며, 도 6 (b) 및 (d)는 밴드 강도를 정량화하고 정규화하여 나타낸 결과이며, 도 6(e)는 각 그룹의 마우스 간 조직에서 p62에 대한 면역 조직화학 염색 결과를 나타낸 결과이고, 도 6(f)는 p62 면역 반응성의 광학 밀도를 나타낸 결과이며, 도 6(g)는 항-포스포-CaMKII 항체를 사용한 면역블롯팅에 의해 표시된 각 그룹의 마우스로부터 간 조직을 수집하고 분석한 결과이고, 도 6(h)는 밴드 강도를 정량화하고 CaMKII 강도로 정규화한 결과를 나타낸 도면이다.

[0097] 도 6(a) 및 (b)에서 확인할 수 있듯이, Vera@CLCMP 처리 HFD 공급 마우스와 비히클 처리 HFD 공급 마우스의 간에서 얻은 세제 가용성 분획의 유비퀴틴화 단백질 및 p62 수준에는 유의한 차이가 없었다.

[0098] 도 6(c) 및 (d)에서 확인할 수 있듯이, 세제 불용성 분획된 유비퀴틴화 단백질 및 p62 수준은 HFD 공급 마우스 간 조직에서 증가하였다. 이러한 증가는 Vera@CLCMP 처리된 HFD 공급 마우스에서 억제되었다. 이는 HFD로 유도된 단백질 포함 형성의 감소를 나타낸다.

[0099] 도 6(e) 및 (f)에서 확인할 수 있듯이, 간세포의 세포질에서 p62 염색이 Vera@CLCMP 처리 HFD 공급 마우스에서 비히클 처리 HFD 공급 마우스 대비 유의하게 감소되었다.

[0100] 도 6(g) 및 (h)에서 확인할 수 있듯이, CaMKII 인산화가 Vera@CLCMP 처리 HFD 공급 마우스에서 비히클 처리 HFD 공급 마우스 대비 유의하게 하향조절되었다. 이는 CaMKII 신호 전달 경로가 간 지방증에서 Vera@CLCMP의 치료적 이점이 있음을 의미한다.

[0102] 또한, 상기 실시예에 따라 제조된 풀루란 기반 경피약물전달 패치 (Vera@CLCMP)의 투여가 간 NLRP3 인플라마좀 활성화에 영향을 미치는지 여부를 평가하기 위해 팔미틴산염으로 유도된 HepG2 세포와 HFD를 먹인 쥐의 간에서 NLRP3 인플라마좀 마커의 발현 수준을 측정하였으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0103] 구체적으로, HepG2 세포를 37℃에서 6일 동안 38.35 ㎍/㎖ Vera@CLCMP와 함께 배양된 방출 배지의 존재 또는 부재 하에 24시간 동안 100 μM 팔미테이트 또는 BSA(비히클)로 처리하였다. 세포 용해물을 항-NLRP3 및 항-카스파제-1로 면역블롯팅한 결과를 도 7(a)에 나타내었으며, 밴드 강도를 정량화하고 정규화한 결과를 도 7(b)에 나타내었고, 항-TXNIP 항체로 면역블롯팅한 결과를 도 7 (h)에 나타내었으며, 밴드 강도를 정량화하고 정규화한 결과를 도 7(i)에 나타내었다. 이때 GAPDH 또는 α-tubulin은 로딩 컨트롤로 사용되었다.

[0104] 또한, 9주 동안 HFD를 유지한 C57BL/6 수컷 마우스의 등쪽 피부에 Vera@CLCMP를 적용하였으며, 같은 나이의 LFD 공급 마우스를 음성 대조군으로 사용하였다. 간 조직 용해물을 항-NLRP3 및 항-카스파제-1 항체로 면역블롯팅한 결과를 도 7(c)에 나타내었으며, 밴드 강도를 정량화하고 정규화한 결과를 도 7(d)에 나타내었다. 각 그룹의 마우스 간 조직에서 NLRP3에 대한 면역 조직 화학 염색결과를 도 7(e)에 나타내었으며, NLRP3 면역 반응성의 광학 밀도 결과를 도 7(f)에 나타내었고, 각 그룹의 마우스 간 조직에서 *Tnfa, Ccl2, Tgfb1, Col1a1* 및 *Emr1* mRNA 수준의 qRT-PCR 분석결과를 도 7(g)에 나타내었으며, 간 조직 용해물을 항-TXNIP 항체로 면역블롯팅한 결과를 도 7(j)에 나타내었고, 밴드 강도를 정량화하고 정규화한 결과를 도 7(k)에 나타내었다.

[0105] 도 7(a) 및 (b)에서 확인할 수 있듯이, NLRP3 및 cleaved caspase-1 단백질 수준은 palmitate 처리에 의해 증가되었으며 Vera@CLCMP의 방출 매질에 의해 역전되었다. 또한, 도 7(c) 및 (d)에서 확인할 수 있듯이,

Vera@CLCMP의 경피 투여는 HFD 공급 마우스 간에서 NLRP3 및 절단된 caspase-1 단백질 수준을 감소시켰다.

[0106] 도 7(e) 및 (f)에서 확인할 수 있듯이, 면역조직화학 분석에서도 간세포의 세포질에 Vera@CLCMP를 경피투여하면 *NLRP3* 발현이 유의하게 감소되었다.

[0107] 도 7(g)에서 확인할 수 있듯이, 단백질 발현 데이터와 일관되게 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR)은 비히클 처리된 것보다 Vera@CLCMP 처리된 HFD 공급 마우스의 간에서 *Nlrp3, Casp1 및 Il-1*β의 mRNA 발현이 HFD를 먹인 마우스와 비교하여 현저히 낮음을 보여주었다. 또한, Vera@CLCMP로 처리된 마우스는 비히클 처리된 대조군 마우스와 비교하여 *Tnfa, Ccl2*(*Mcp1*이라고도 함), *Tgfb1, Col1a1* 및 *Emr1*(*F4/80*이라고도 함)을 포함한 여러 염증 유전자의 발현이 낮았다.

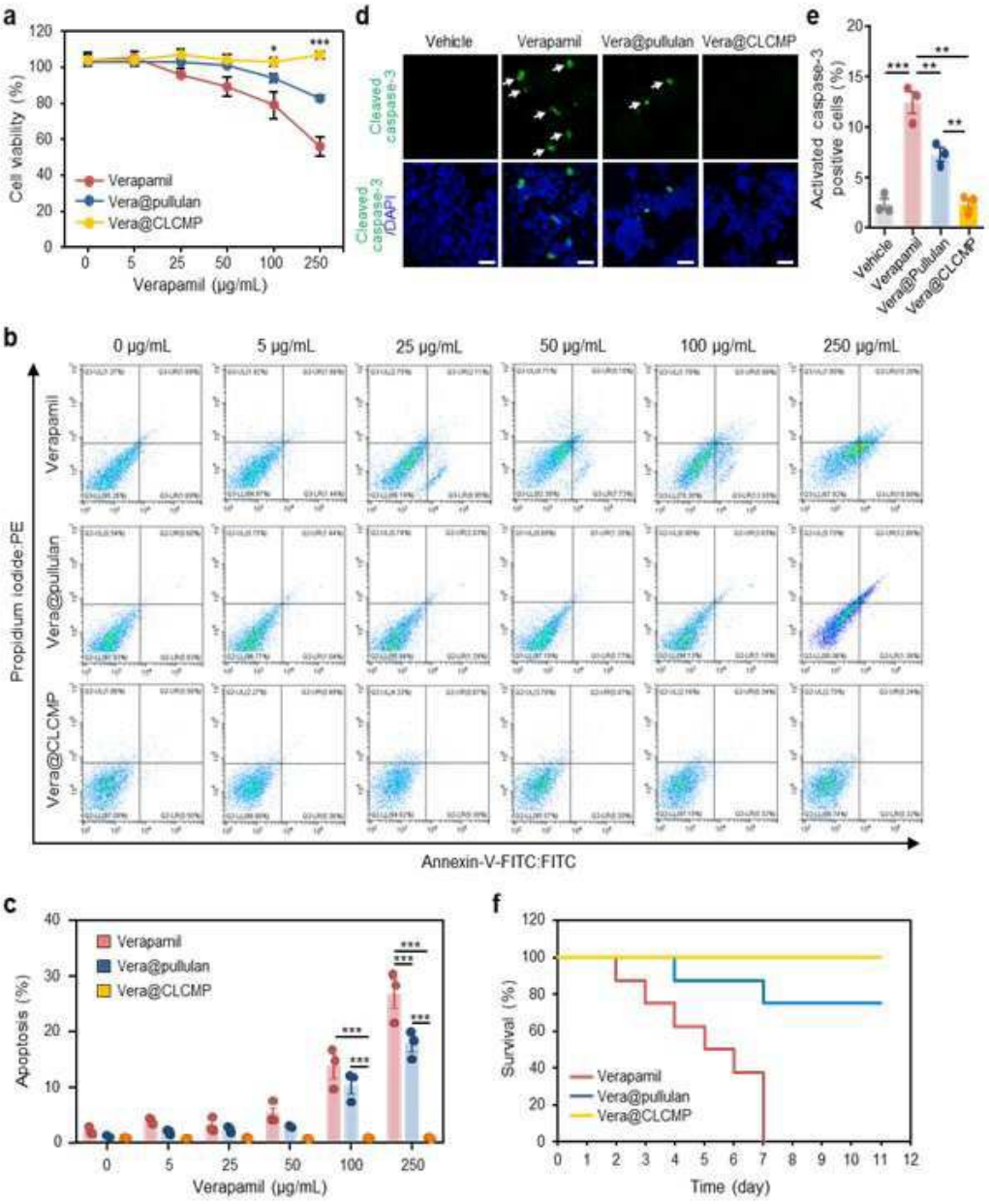
[0108] 또한 도 7(h) 및 (i)에서 확인할 수 있듯이, TXNIP 단백질 발현 수준은 Vera@CLCMP의 방출 매체로 전처리한 후 감소하는 것으로 나타났다. 유사하게, 도 7(j) 및 (k)에서 확인할 수 있듯이, Vera@CLCMP로 처리된 HFD 공급 마우스는 비히클 처리 대조군 마우스에 비해 TXNIP 단백질 발현 수준이 상당히 감소하였다.

[0109] 전반적으로, 연구결과는 Vera@CLCMP의 경피 투여가 HFD 유발 MAFLD 동안 간 TXNIP/NLRP3 경로를 억제할 수 있음을 시사한다.

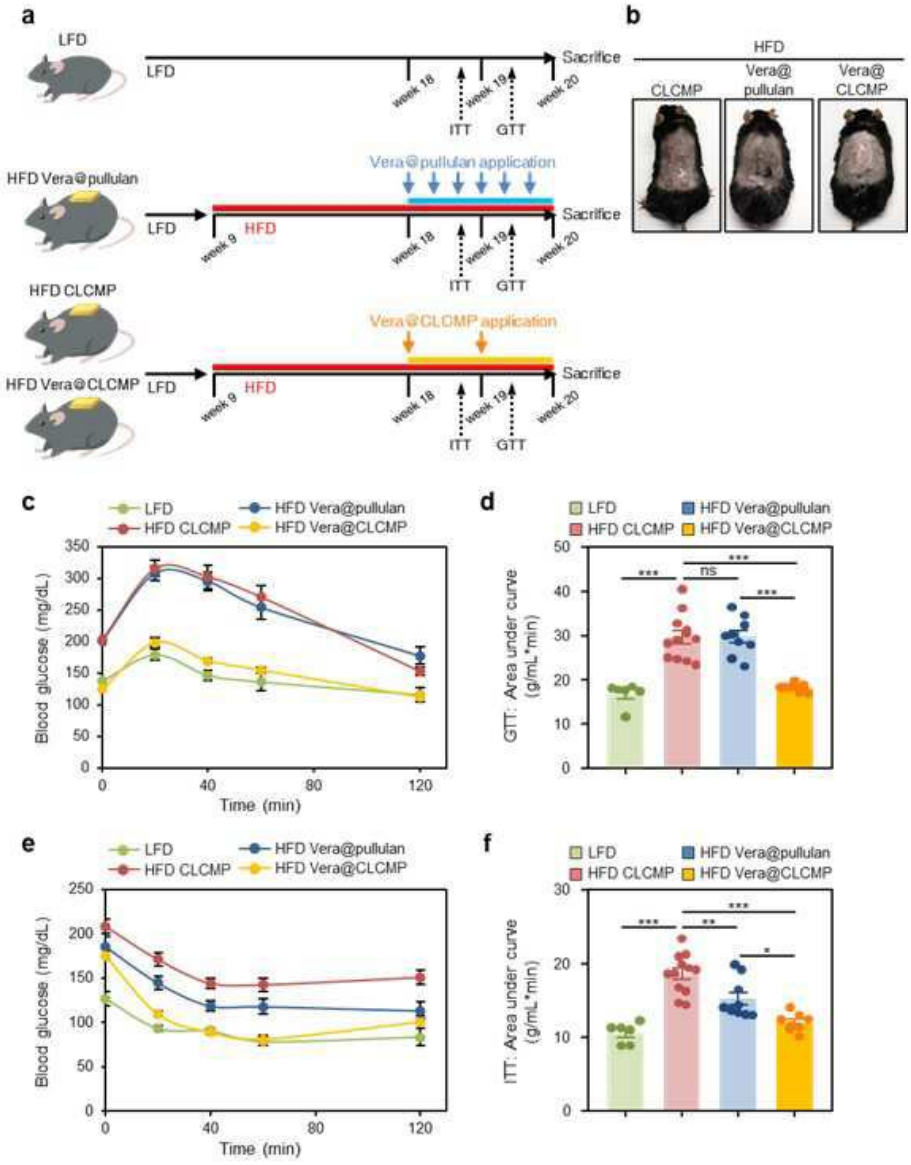
[0111] 이상에서와 같이 본 발명의 권리는 위에서 설명된 실시예에 한정되지 않고 청구범위에 기재된 바에 의해 정의되며, 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 청구범위에 기재된 권리범위 내에서 다양한 변형과 개작을 할 수 있다는 것은 자명하다.

도면

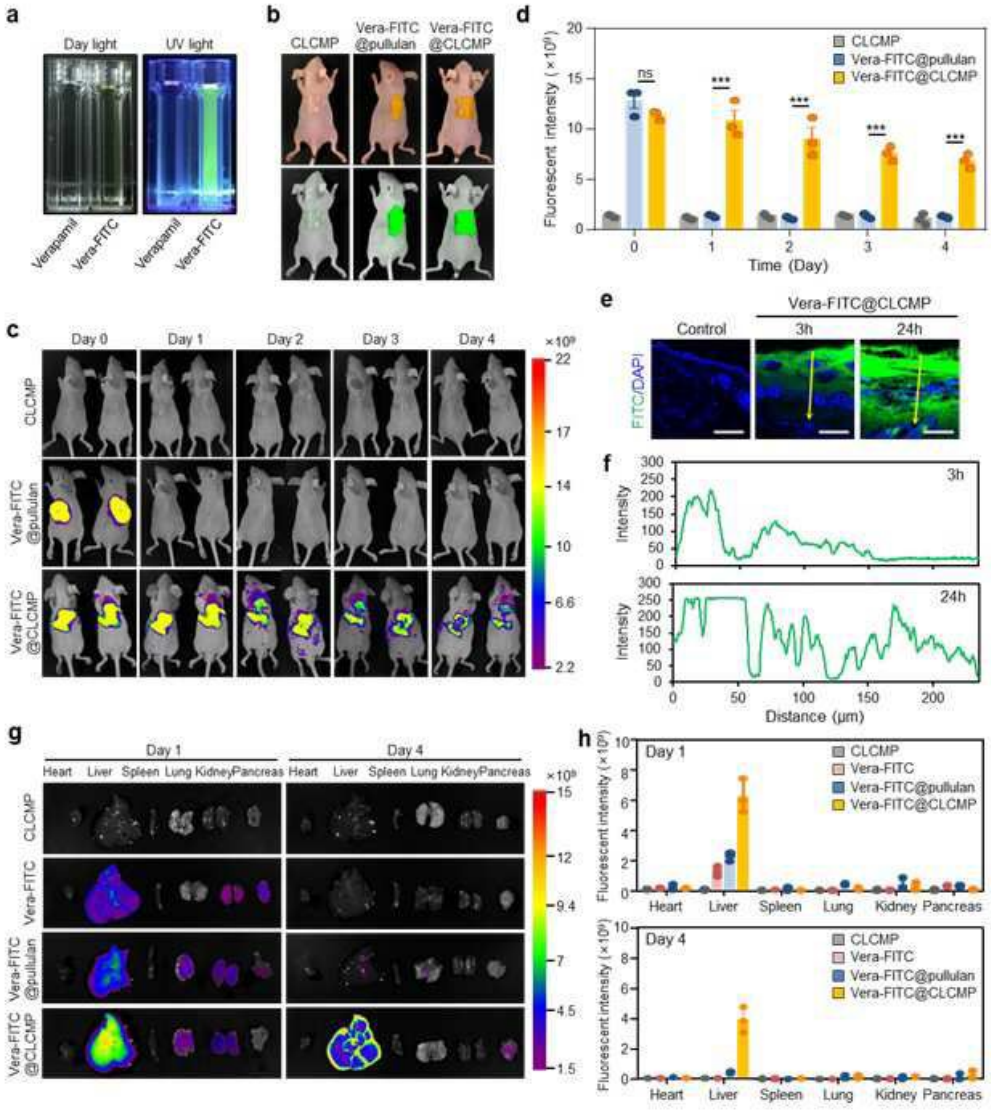
도면1


a
Cell viability (%)
Verapamil
Vera@pullulan
Vera@CLCMP
Verapamil (μg/mL)
d
Vehicle
Verapamil
Vera@pullulan
Vera@CLCMP
Cleaved caspase-3
Cleaved caspase-3 /DAPI
e
Activated caspase-3 positive cells (%)
Vehicle
Verapamil
Vera@Pullulan
Vera@CLCMP
b
0 μg/mL
5 μg/mL
25 μg/mL
50 μg/mL
100 μg/mL
250 μg/mL
Verapamil
Vera@pullulan
Vera@CLCMP
Propidium iodide:PE
Annexin-V-FITC:FITC
c
Apoptosis (%)
Verapamil
Vera@pullulan
Vera@CLCMP
Verapamil (μg/mL)
f
Survival (%)
Verapamil
Vera@pullulan
Vera@CLCMP
Time (day)

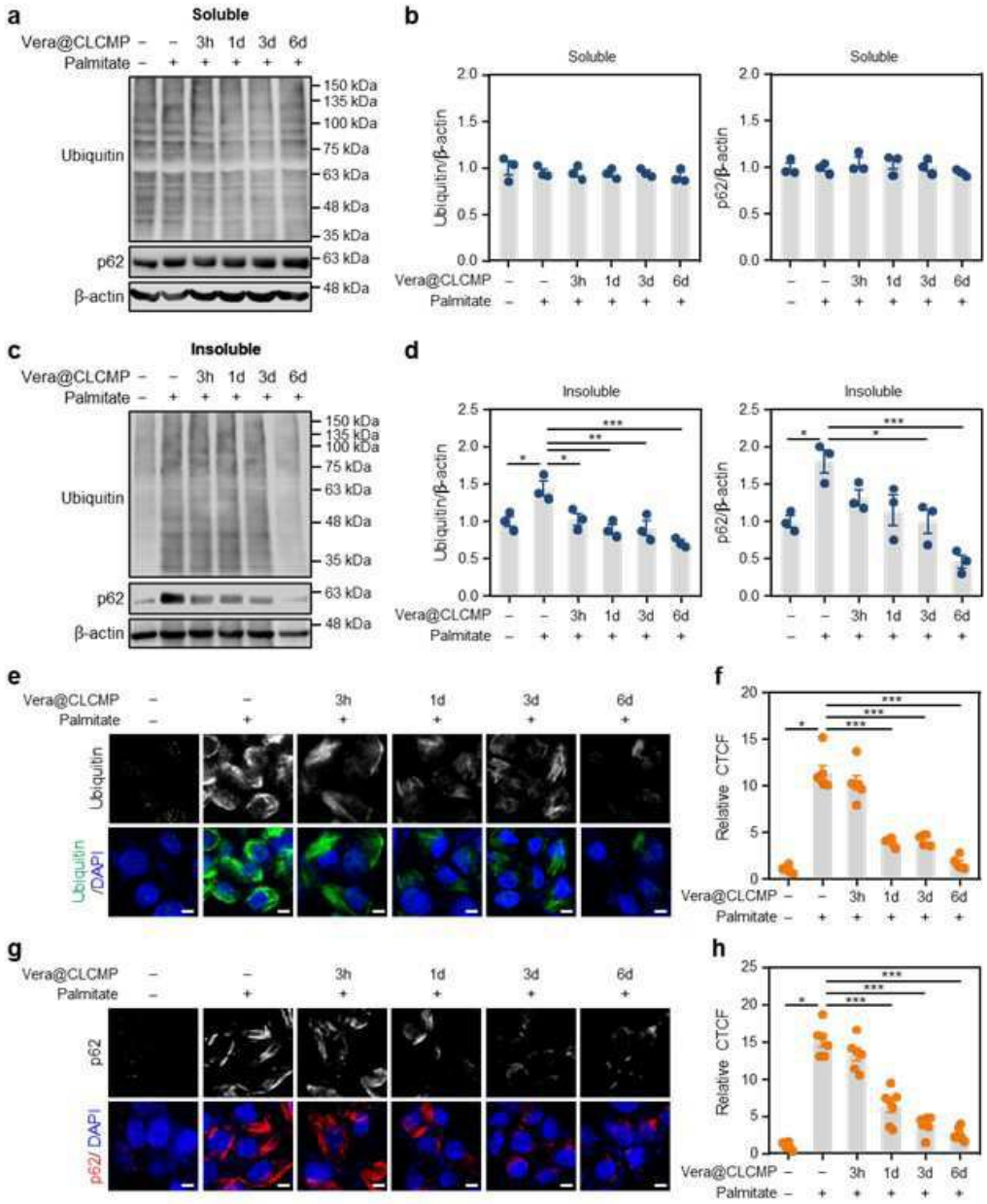
도면2


a
LFD
LFD
Sacrifice
week 18
week 19
week 20
ITT
GTT
HFD Vera@pullulan
Vera@pullulan application
HFD
HFD CLCMP
Vera@CLCMP application
HFD Vera@CLCMP
b
HFD
CLCMP
Vera@ pullulan
Vera@ CLCMP
c
LFD
HFD Vera@pullulan
HFD CLCMP
HFD Vera@CLCMP
Blood glucose (mg/dL)
Time (min)
d
GTT: Area under curve (g/mL*min)
ns
e
f
ITT: Area under curve (g/mL*min)

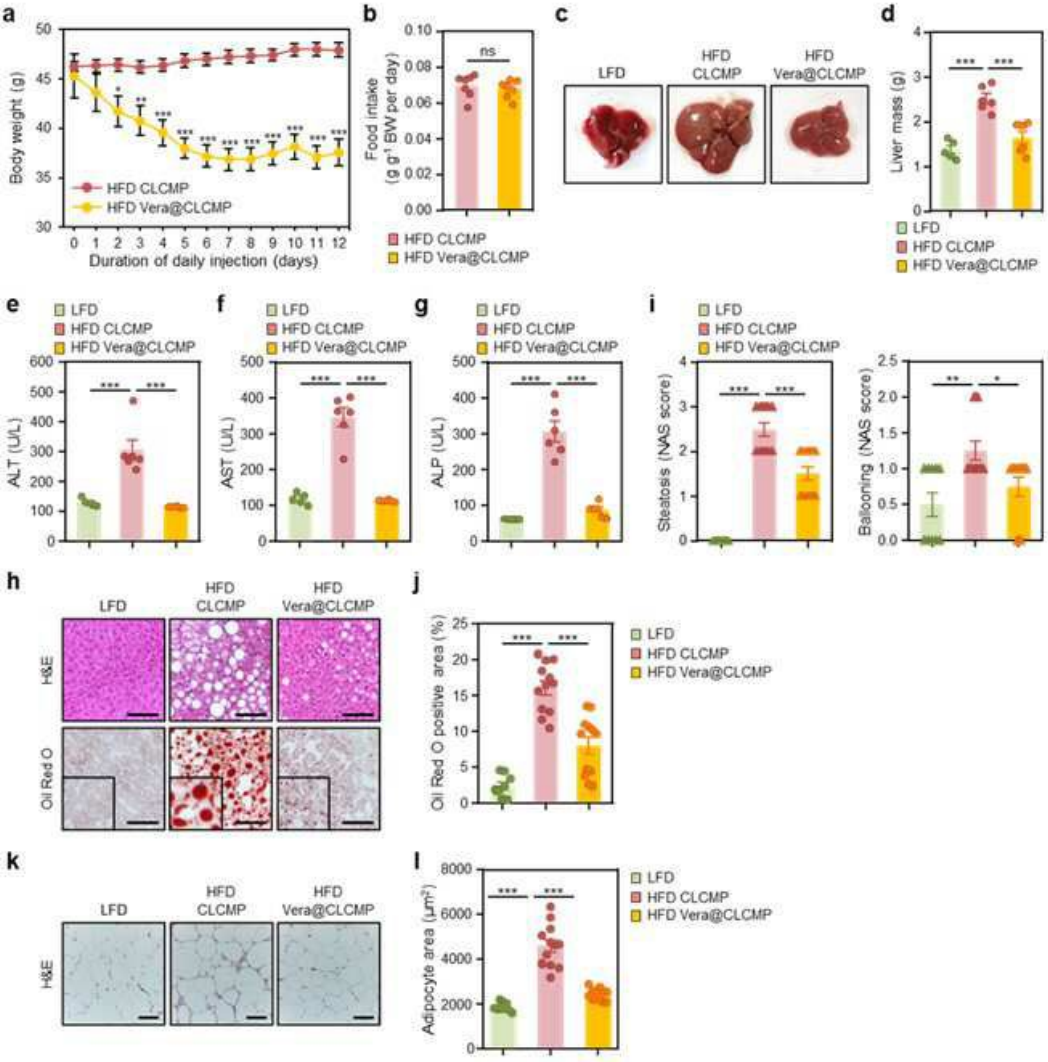
도면3


a
Day light
UV light
Verapamil
Vera-FITC
Verapamil
Vera-FITC
b
CLCMP
Vera-FITC @pullulan
Vera-FITC @CLCMP
d
Fluorescent intensity (×10⁹)
CLCMP
Vera-FITC@pullulan
Vera-FITC@CLCMP
ns
***
Time (Day)
c
Day 0
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
×10⁹
22
17
14
10
6.6
2.2
CLCMP
Vera-FITC @pullulan
Vera-FITC @CLCMP
e
Control
Vera-FITC@CLCMP
3h
24h
FITC/DAPI
f
3h
24h
Intensity
Distance (μm)
g
Day 1
Day 4
Heart
Liver
Spleen
Lung
Kidney
Pancreas
×10⁹
15
12
9.4
7
4.5
1.5
CLCMP
Vera-FITC
Vera-FITC @pullulan
Vera-FITC @CLCMP
h
Day 1
Day 4
Fluorescent intensity (×10⁹)
CLCMP
Vera-FITC
Vera-FITC@pullulan
Vera-FITC@CLCMP
Heart
Liver
Spleen
Lung
Kidney
Pancreas

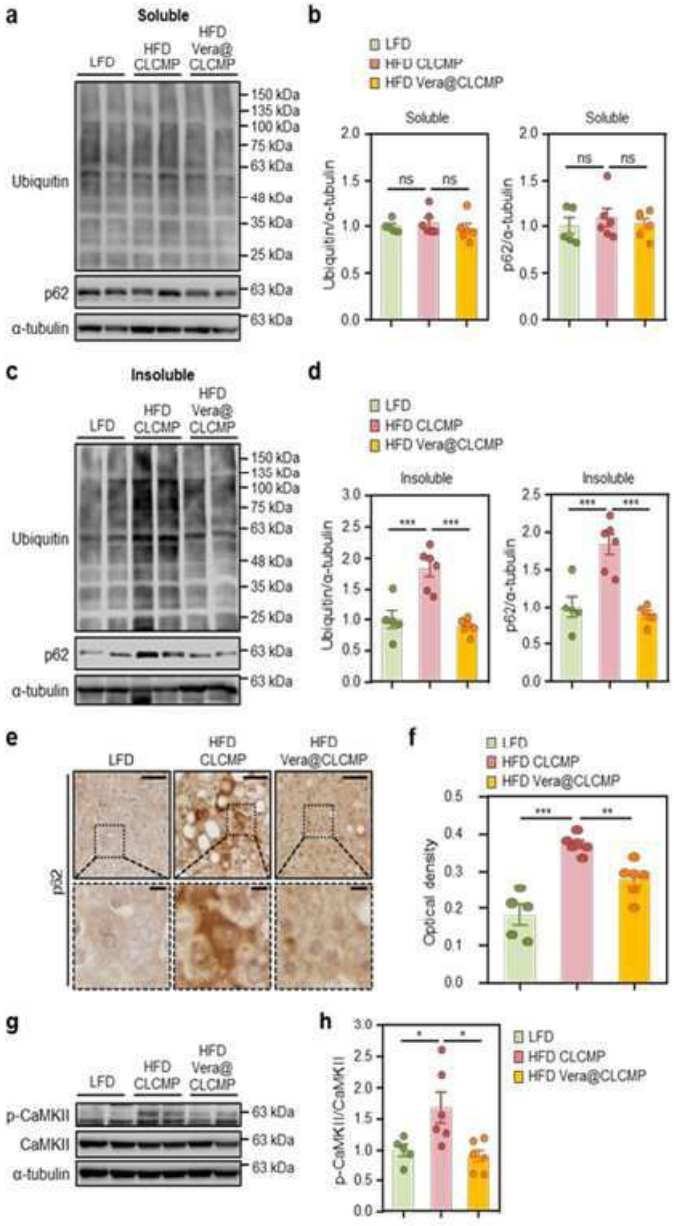
도면4


a
Soluble
Vera@CLCMP – – 3h 1d 3d 6d
Palmitate – + + + + +
Ubiquitin
p62
β-actin
150 kDa
135 kDa
100 kDa
75 kDa
63 kDa
48 kDa
35 kDa
63 kDa
48 kDa
b
Soluble
Ubiquitin/β-actin
p62/β-actin
c
Insoluble
d
Insoluble
e
Ubiquitin
Ubiquitin /DAPI
f
Relative CTCF
g
p62
p62/ DAPI
h
Relative CTCF

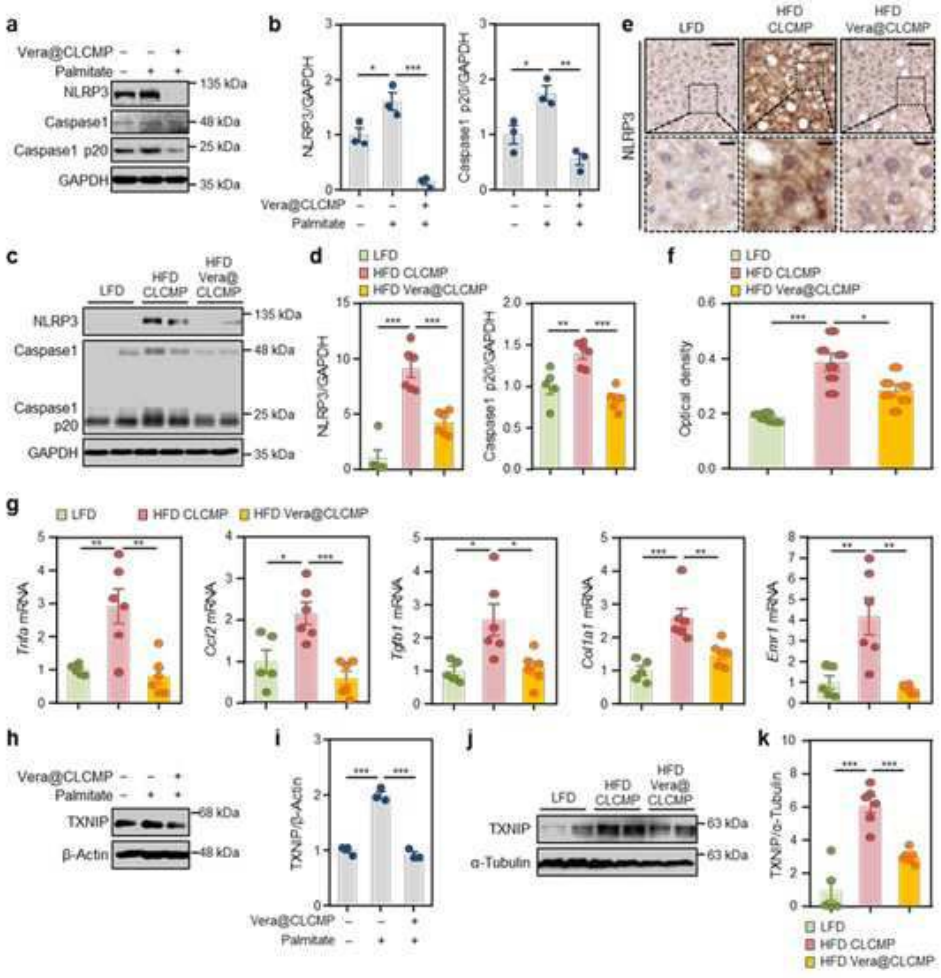
도면5


a
Body weight (g)
Duration of daily injection (days)
HFD CLCMP
HFD Vera@CLCMP
b
Food intake (g g-1 BW per day)
ns
c
LFD
HFD CLCMP
HFD Vera@CLCMP
d
Liver mass (g)
e
ALT (U/L)
f
AST (U/L)
g
ALP (U/L)
i
Steatosis (NAS score)
Ballooning (NAS score)
h
H&E
Oil Red O
j
Oil Red O positive area (%)
k
H&E
l
Adipocyte area (μm²)

도면6


a
Soluble
LFD
HFD CLCMP
HFD Vera@CLCMP
Ubiquitin
p62
α-tubulin
150 kDa
135 kDa
100 kDa
75 kDa
63 kDa
48 kDa
35 kDa
25 kDa
b
LFD
HFD CLCMP
HFD Vera@CLCMP
Soluble
Ubiquitin/α-tubulin
p62/α-tubulin
ns
c
Insoluble
d
Insoluble
***
e
p62
f
Optical density
**
g
p-CaMKII
CaMKII
h
p-CaMKII/CaMKII
*

도면7


a
Vera@CLCMP
Palmitate
NLRP3
Caspase1
Caspase1 p20
GAPDH
135 kDa
48 kDa
25 kDa
35 kDa
b
NLRP3/GAPDH
Caspase1 p20/GAPDH
Vera@CLCMP
Palmitate
e
LFD
HFD CLCMP
HFD Vera@CLCMP
NLRP3
c
LFD
HFD CLCMP
HFD Vera@CLCMP
NLRP3
Caspase1
Caspase1 p20
GAPDH
135 kDa
48 kDa
25 kDa
35 kDa
d
LFD
HFD CLCMP
HFD Vera@CLCMP
NLRP3/GAPDH
Caspase1 p20/GAPDH
f
LFD
HFD CLCMP
HFD Vera@CLCMP
Optical density
g
LFD
HFD CLCMP
HFD Vera@CLCMP
Tnfa mRNA
Ccl2 mRNA
Tgfb1 mRNA
Col1a1 mRNA
Enr1 mRNA
h
Vera@CLCMP
Palmitate
TXNIP
β-Actin
68 kDa
48 kDa
i
TXNIP/β-Actin
Vera@CLCMP
Palmitate
j
LFD
HFD CLCMP
HFD Vera@CLCMP
TXNIP
α-Tubulin
63 kDa
63 kDa
k
TXNIP/α-Tubulin
LFD
HFD CLCMP
HFD Vera@CLCMP