(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0060465
(43) 공개일자 2023년05월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/194 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61P 1/00 (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *A61P 29/00* (2023.01)
A61P 3/04 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/194 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2022-0137421
(22) 출원일자 2022년10월24일
심사청구일자 2022년10월24일
(30) 우선권주장
1020210142092 2021년10월22일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이성준
서울특별시 강남구 도산대로96길 39, 104동 402호(청담동, 청담공원아파트)
정미영
서울특별시 성북구 종암로24가길 80, 107동 103호(종암동, 래미안라센트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 19 항

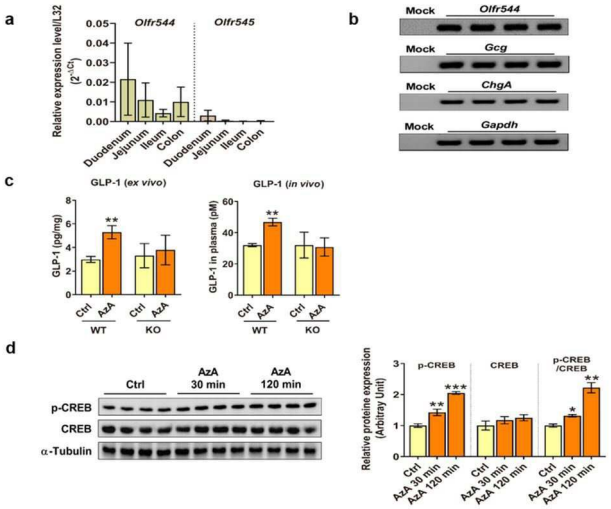
(54) 발명의 명칭 **장내 GLP-1 분비 촉진 및 염증 완화 효능을 가지는 아젤라산 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 장 효능을 갖는 조성물에 관한 것으로, 더 상세하게는 장조직 세포막에 발현되는 GPCR인 Olfr544가 아젤라산의 결합으로 활성화되어 cAMP-PKA-CREB 신호전달 과정을 통해 장내 GLP-1 분비를 촉진하고, 장내 염증을 완화하는 아젤라산을 유효성분으로 포함하는 의약 조성물 및 건강기능성 식품에 관한 것이다.

본 발명에 따른 아젤라산(azelaic acid)을 포함하는 조성물은 장내 GLP-1 분비 촉진 및 장내 염증 개선에 효과가 우수한 바, 항비만, 항당뇨 및 장내 건강 증진을 위한 식품소재, 의약조성물 및 건강기능성 식품에 유용하게 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 1/00 (2018.01)
A61P 1/16 (2018.01)
A61P 25/28 (2018.01)
A61P 29/00 (2023.02)
A61P 3/04 (2018.01)
A61P 3/10 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 9/00 (2018.01)
A61P 9/12 (2018.01)
(72) 발명자
고광표
서울특별시 서초구 서초2동 무지개아파트 6동 508호
우춘연
서울특별시 동대문구 약령시로3길 18-6(제기동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2019230052
과제번호 2019R1A2C3005227
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 식품향기성분을 이용한 이소후각수용체의 에너지대사 및 세포노화 조절기능 연구
기 여 율 90/100
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345312004
과제번호 2019R1I1A1A01064105
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 천연향기 물질의 갈색/베이지색 지방세포 기능조절 연구
기 여 율 10/100
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 장내 호르몬 분비 촉진 및/또는 장내 염증 완화용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 아젤라산의 분자표적은 후각수용체인 Olfr544인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 장내 호르몬은 위장관(gut) 세포, 장내분비(enteroendocrine) 세포 및 GLP-1 분비 세포로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상에서 분비되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 장내 호르몬은 인크레틴 호르몬인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 인크레틴 호르몬은 GLP-1(glucagon-like peptide-1) 및/또는 이의 유사체인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 6

아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 장내 대사질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 장내 대사질환은 비만, 당뇨병, 심혈관질환, 고혈압, 지방간 및 염증성 장염으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 8

아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 염증성 장질환은 궤양성 대장염, 크론병 및 베체트병으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 10

아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머, 뇌졸중, 중풍, 파킨슨씨병, 헌팅턴병, 피크병 및 크로이츠펠트-야콥병으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 13

아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 장내 대사질환 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 장내 대사질환은 비만, 당뇨병, 심혈관질환, 고혈압, 지방간 및 염증성 장염으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 15

아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 염증성 장질환은 궤양성 대장염, 크론병 및 베체트병으로 궤양성 대장염, 크론병 및 베체트병으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 17

아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

청구항 18

아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머, 뇌졸중, 중풍, 파킨슨씨병, 헌팅턴병, 피크병 및 크로이츠펠트-야콥병으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 장 효능을 갖는 조성물에 관한 것으로, 더 상세하게는 장조직 세포막에 발현되는 GPCR인 Olfr544가 아젤라산의 결합으로 활성화되어 cAMP-PKA-CREB 신호전달 과정을 통해 장내 GLP-1 분비를 촉진하고, 장내 염증을 완화하는 아젤라산을 유효성분으로 포함하는 의약 조성물 및 건강기능성 식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 생체 내 에너지 과다 축적은 여러 가지 대사성 질환을 유발한다. 비만은 생체 에너지 대사 밸런스가 파괴되어 발병하는 대표적인 대사성 질환으로 인슐린 저항성을 유발한다. 대사성 질환에 의한 사회경제적 비용 증가는 전 세계적으로 관심의 대상이 되고 있지만, 현재까지 개발된 치료제는 부작용으로 인해 제한적인 투약만이 가능한 실정이다. 따라서, 대사질환을 치료 혹은 예방하는 안전한 식품 성분이나 체내에서 생성되는 물질에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있다.

[0004] 체내 대사에서 위장관(gut) 세포는 경구 섭취한 식품과 처음 접촉하는 부위이며, 장관을 구성하는 세포 중 하나인 장내분비(enteroendocrine) 세포에는 여러 가지 아형이 존재한다. 여기서 분비되는 호르몬들은 음식섭취 조절뿐 아니라 에너지 소모, 혈당 항상성, 음식섭취에 대한 다양한 대사 반응에 관여하는 것으로 알려지면서 최근 몇 년간 이 세포들의 중요성이 부각되고 있다.

[0005] 인크레틴은 식사 후 혈당치에 의존적으로 인슐린 분비를 강력하게 자극하는 장 호르몬이다. 장 호르몬들은 음식섭취 후 나타나는 식욕, 열량소모, 포도당 항상성, 지질대사, 및 광범위한 대사 기능에 있어서 중요한 역할을 한다. 이 호르몬들은 비만과 제2형 당뇨병 같은 대사질환에서 이상을 보이며 향후 이 질환들의 예방 또는 관리를 위한 새로운 치료목표로 제시되고 있다.

[0006] GLP-1(glucagon-like peptide-1)은 회장과 대장의 L 세포에서 분비되는 인크레틴 호르몬으로, 이 호르몬은 GIP와 더불어 인크레틴 반응의 90%를 담당한다. GLP-1의 주요한 작용은 인슐린 분비를 증가시키는 것으로 포도당 농도에 따른 인슐린 분비를 증가시키는 특징이 있어 저혈당이 발생하지 않는다. 또한 GLP-1은 시상하부와 뇌간의 식욕억제 경로를 직접 자극하고 미주신경에 직접 작용함으로써 식욕과 음식섭취를 조절하는 중요한 인자이다.

[0007] GLP-1 유사체는 인크레틴과 더불어 포만감에 대한 효과가 있으므로 현재 비만 및 제 2형 당뇨병의 치료제로 쓰이고 있다. 신진대사 항상성을 유지하는 데 있어서 장 호르몬의 역할과 비만과 제 2형 당뇨병 등의 대사질환에서 나타나는 장 호르몬의 이상을 감안할 때 이는 대사질환의 관리와 예방을 위한 치료적 목표라고 할 수 있다.

[0008] 한편, 후각수용체는 후각 상피에서 발현되어 냄새정보를 대뇌에 전달하는 기능을 하는 것으로 알려지고 있으나 최근 후각 조직 이외의 다양한 조직에서 후각 수용체가 이소발현 (Ectopic expression)됨이 알려지고 있다.

[0009] 최근 연구결과에 의하면 일반 조직에서 후각 수용체의 다양한 기능이 보고되고 있는데 성상 교세포에서 짧은 사슬 지방산이 후각 수용체 Olfr920의 리간드로 작용하고, 모낭 상피에서는 OR2AT4가 모발 성장에 관여하고,

OR10J5가 간세포에서 지방산 산화를 조절하는 연구등이 보고되고 있다. 최근 본 발명자들도 Olfr544가 지방조직에서 발현되어 에너지 대사 및 비만을 조절한다는 보고(J Clin Invest., 127:4118-23, 2017)한 바 있다.

[0010] 아젤라산의 화학명은 노난디산(Nonanedioic Acid)으로 탄소수가 9개인 디카르복시산으로서 체내에서 오메가-산화과정이나 리놀레산의 과산화물로 생성되기도 하고, 천연물질로 밀, 보리, 오트밀, 수수 등 여러 가지 곡류에서 생성되어 식품의 형태로 섭취되기도 한다. 지금까지 연구된 바에 의하면 아젤라산은 홍조, 여드름 등 염증성 피부질환에 효능이 알려져 있고, 동맥경화, 혈당조절, 항암작용, 체지방 감소 등의 연구 내용이 보고되어 있으나 아젤라산의 장내분비 호르몬 관련 연구는 보고된 바가 없으며 표적단백질 작용 기전도 연구된 바가 없다.

[0012] 이에, 본 발명자들은 아젤라산의 신규한 효능을 개발하기 위하여 예의노력한 결과, GLUTag 장내분비 세포에 이소발현(ectopic expression)되는 후각 수용체인 Olfr544의 리간드로 아젤라산이 작용하여 cAMP-PKA-CREB 신호전달을 활성화시킴으로써 아젤라산이 장내분비 세포에서 GLP-1 분비를 촉진하고, 비만에 의해 유도된 염증성 사이토카인을 효과적으로 저하시킨다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0014] (특허문헌 0001) 대한민국등록특허 제10-1593539호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 목적은 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 장 효능을 갖는 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 장내 호르몬 분비 촉진 및/또는 장내 염증 완화용 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 아젤라산의 분자표적은 후각수용체인 Olfr544인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 장내 호르몬은 위장관(gut) 세포, 장내분비(enteroendocrine) 세포 및 GLP-1 분비 세포로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상에서 분비되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0020] 본 발명에 있어서, 상기 장내 호르몬은 인크레틴 호르몬인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0021] 본 발명에 있어서, 상기 인크레틴 호르몬은 GLP-1(glucagon-like peptide-1) 및/또는 이의 유사체인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0023] 본 발명은 또한, 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 장내 대사질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 장내 대사질환은 비만, 당뇨병, 심혈관질환, 고혈압, 지방간 및 염증성 장염으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0026] 본 발명은 또한, 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 염증성 장질환은 궤양성 대장염, 크론병 및 베체트병으로 구성된 군에서 선택되는 하나

이상인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0029] 본 발명은 또한, 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0031] 본 발명은 또한, 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머, 뇌졸중, 중풍, 파킨슨씨병, 헌팅턴병, 피크병 및 크로이츠펠트-야콥병으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0034] 본 발명은 또한, 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 장내 대사질환 예방 또는 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 장내 대사질환은 비만, 당뇨병, 심혈관질환, 고혈압, 지방간 및 염증성 장염으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0037] 본 발명은 또한, 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다.

[0038] 본 발명에 있어서, 상기 염증성 장질환은 궤양성 대장염, 크론병 및 베체트병으로 궤양성 대장염, 크론병 및 베체트병으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0040] 본 발명은 또한, 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물을 제공한다.

[0042] 본 발명은 또한, 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다.

[0043] 본 발명에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머, 뇌졸중, 중풍, 파킨슨씨병, 헌팅턴병, 피크병 및 크로이츠펠트-야콥병으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.

발명의 효과

[0045] 본 발명에 따른 아젤라산(Azelaic Acid)을 함유하는 조성물은 장조직 세포막에 발현되는 GPCR인 Olfr544가 아젤라산의 결합으로 활성화되어 cAMP-PKA-CREB 신호전달 과정을 통해 장내 GLP-1 분비를 촉진하고, 장내 염증을 완화시킬 수 있다. 또한, 상기 아젤라산은 밀, 귀리, 보리, 수수, 호밀 등 곡류와 크랜베리 등 천연물에 주로 함유되어 있는 화합물로서 부작용이 없거나 적다는 이점이 있다. 따라서, 본 발명에 따른 아젤라산(azelaic acid)을 포함하는 조성물은 장내 GLP-1 분비 촉진 및 장내 염증 개선에 효과가 우수한 바, 항비만, 항당뇨 및 염증성 장질환 등 장내 건강 증진을 위한 식품소재, 의약조성물 및 건강기능성 식품에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 (a) 소장과 대장 조직에서 Olfr544, Olfr545의 발현, (b) GLUTag 세포에서 Olfr544, Gcg, ChgA의 발현에 관한 것이다. 또한, (c) ex vivo, in vivo 에서 소장의 GLP-1 분비량, (d) 소장의 CREB의 인산화를 나타낸 것이다.

도 2는 아젤라산(Azelaic Acid, AzA)을 GLUTag 소장세포에 처리한 다음, (a) GLP-1 분비, 세포 내 신호전달에 관여하는 주요 이차 전달자인 (b) cAMP, 세포 내 칼슘(intracellular calcium), IP-one; IP3의 대사물(metabolite)을 측정한 결과이다. 또한, (c) PKA inhibitor 처리후 GLP-1 분비량, (d) PKA activity, (e) PKA의 표적단백질인 CREB의 인산화를 나타낸 것이다.

도 3은 Olfr544 특이적인 shRNA를 주입한 GLUTag 소장세포에서의 (a) Olfr544 단백질 발현의 감소를 RT-PCR을 통해 나타낸 것이고, shRNA 주입에 따른 아젤라산의 (b) cAMP, PKA, (c) CREB의 인산화 (d) GLP-1 분비 효과를 나타낸 것이다.

도 4는 마우스에서 아젤라산의 PYY, GLP2, GIP, 그리고 Ghrelin 분비를 측정한 결과이다.

도 5는 고지방식이에 의해 유도된 비만 마우스에 아젤라산(Azelaic Acid, AzA)을 장기 투여한 후 (a) 몸무게, (b) 혈액에서의 TG, Cholesterol, HDL, LDL, GLP-1 측정, (c) 간 중성지방, AST, ALT, (d) Triiodothyronine(T3), Thyroxine(T4) 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 아젤라산(Azelaic Acid, AzA)을 GLUTag 소장세포에 처리한 다음, MTT 세포독성에 대한 효과를 나타낸 결과이다.

도 7은 고지방 식이에 의해 유도된 WT 비만 마우스 및 KO 마우스에 아젤라산(Azelaic Acid, AzA)을 장기 투여한 후 분변과 결장에서의 장내미생물 균총을 측정한 결과를 나타낸 것이다. (a) 무게, (b) 조직 무게, (c) alpha diversity, (d) beta diversity, (e) 상위 10위의 genus 수준에서의 장내미생물의 균총 변화, (f) 결장에서의 변화를 확인한 결과이다.

도 8은 Species 수준에서의 장내미생물의 균총 변화를 random forest 방법에 의한 (a) 상위 10개 항목, (b) 유의하게 다른 미생물 균총의 상대적 풍부성을 비교한 결과이다.

도 9는 마우스 대장에서 아젤라산에 의한 항염증 효과를 나타낸 결과이다. (a) WT 과 Olfr544-KO 마우스에서 분리한 대장조직에 LPS로 자극한 후 아젤라산을 처리하여 RNA sequencing 분석에 의한 KEGG 신호전달 경로를 분석, (b) 아젤라산 처리에 의해 증가 혹은 감소한 면역, 염증관련 유전자 히트맵, 고지방 식이 WT과 Olfr544-KO 마우스에서 (c) 염증성 사이토카인의 수준, (d) 혈청에서의 TMAO, LPS, (e) 분변에서의 LPS, (f) 혈청에서의 장내투과성을 실험한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

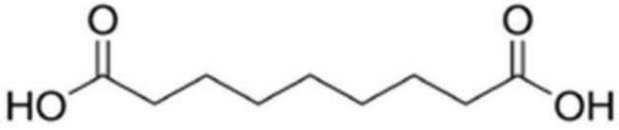
[0048] 이하, 발명을 상세히 설명한다.

[0050] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0052] 본 발명은 일관점에서 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 장내 호르몬 분비 촉진 및/또는 장내 염증 완화용 조성물에 관한 것이다.

[0053] 본 발명에 있어서, 상기 아젤라산(azelaic acid)은 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물이다.

[0054] [화학식 1]

[0055] 

[0056] 본 발명에 있어서, 상기 아젤라산의 분자표적은 후각수용체인 Olfr544인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0057] 본 발명에 있어서, 상기 장내 호르몬은 위장관(gut) 세포, 장내분비(enteroendocrine) 세포 및 GLP-1 분비 세포

로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상에서 분비되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0058] 본 발명에 있어서, 상기 장내 호르몬은 인크레틴 호르몬인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0059] 본 발명에 있어서, 상기 인크레틴 호르몬은 GLP-1(glucagon-like peptide-1) 및/또는 이의 유사체인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0061] 본 발명은 다른 관점에서 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 장내 대사질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0062] 본 발명에 있어서, 상기 장내 대사질환은 인슐린 저항성과 관련된 대사질환인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 인슐린은 췌장 베타세포에서 식후 분비되어 근육으로 포도당 섭취를 촉진하거나 간에서 포도당 생성을 억제하여 혈당을 조절하고, 지방조직에서 지방산분해(lipolysis)를 억제하여 섭취된 에너지를 저장하는데, 인슐린 저항성은 인슐린이 부족하지 않은 상태에서 이러한 인슐린 작용이 감소된 상태를 의미한다. 인슐린 저항성은 대사질환의 발병과 연관이 있고, 상기 인슐린 저항성과 관련된 대사질환은 제2형 당뇨병, 대사증후군(metabolic syndrome), 심혈관질환, 고혈압, 다낭난소증후군, 비만, 지방간 질환일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0063] 본 발명에 있어서, 일실시예에서 상기 장내 대사질환은 비만, 당뇨병, 심혈관질환, 고혈압, 지방간 및 염증성 장염으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0065] 본 발명은 또다른 관점에서 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0066] 본 발명에 있어서, 상기 염증성 장질환은 궤양성 대장염, 크론병 및 베체트병으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0068] 본 발명은 또다른 관점에서 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0069] 본 발명에 있어서, 상기 간암 예방 또는 치료는 아젤라산(azelaic acid)에 의하여 분비가 촉진된 GLP-1에 의한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0071] 본 발명은 또다른 관점에서 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0072] 본 발명에서 용어, "퇴행성 뇌질환"이란, 뇌와 관련된 여러 가지 질병을 총칭하는 용어를 의미한다. 구체적으로 본 발명에서 상기 퇴행성 뇌질환은 아밀로이드 베타 펩타이드-유도 산화적 스트레스에 의한 뇌 세포 손상이 유발되는 질환일 수 있고, 더욱 구체적으로는 치매, 알츠하이머, 뇌졸중, 중풍, 파킨슨씨병, 헌팅턴병, 피크병 또는 크로이츠펠트-야콥병일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0073] 본 발명에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료는 아젤라산(azelaic acid)에 의하여 분비가 촉진된 GLP-1에 의한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0075] 본 발명은 또다른 관점에서 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 장내 대사질환 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물에 관한 것이다.

[0076] 본 발명에 있어서, 상기 장내 대사질환은 비만, 당뇨병, 심혈관질환, 고혈압, 지방간 및 염증성 장염으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0078] 본 발명은 또다른 관점에서 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 개선용

건강기능성식품 조성물에 관한 것이다.

[0079] 본 발명에 있어서, 상기 염증성 장질환은 궤양성 대장염, 크론병 및 베체트병으로 궤양성 대장염, 크론병 및 베체트병으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0081] 본 발명은 또다른 관점에서 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물에 관한 것이다.

[0083] 본 발명은 또다른 관점에서 아젤라산(azelaic acid)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물에 관한 것이다.

[0084] 본 발명에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머, 뇌졸중, 중풍, 파킨슨씨병, 헌팅턴병, 피크병 및 크로이츠펠트-야콥병으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0086] 본 발명에 있어서, 용어 “약학적 조성물(pharmaceutical composition)”은 본 발명의 아젤라산(azelaic acid)과 희석제 또는 담체와 같은 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 혼합물을 의미한다. 약학적 조성물은 치료 용도를 위한 조성물뿐만 아니라 화장품 조성물을 포함한다. 일부 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물을 포함하는 약학적 조성물을 그 필요에 따라 대상체에게 투여하는 방법이 제공되어 있다. 일부 실시예에서, 본 발명의 조성물은 인간에게 투여할 수 있다.

[0087] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물의 설명은 원칙적으로 인간에게 투여하기 위한 약학적 조성물에 관한 것이지만, 통상의 기술자는 이러한 조성물이 일반적으로 모든 종류의 동물에게 투여하기 적합함을 이해하게 될 것이다. 다양한 동물에게 투여하기 위한 약학적 조성물의 변형을 잘 이해하고, 숙련된 수의학 약리학자는 필요하다면 단순히 통상적인 실험으로 이러한 변형을 설계 및/또는 수행할 수 있다.

[0088] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 약리학 분야에 알려져 있거나 이후 내용에서 전개되는 임의의 방법에 의해 제조될 수도 있다. 일반적으로, 이러한 정제용 방법은 활성 성분을 부형제 및/또는 하나 이상의 다른 보조 성분과 연관시키는 단계를 포함하고, 이어서 필요하거나 원하는 경우 생성물을 원하는 단일- 또는 다중-용량 단위로 성형 및/또는 포장하는 단계를 포함한다.

[0089] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 단일 단위 용량 및/또는 복수의 단일 단위 용량으로서 제조, 포장, 및/또는 포장하지 않은 채로 판매될 수도 있다. "단위 용량"은 사전 설정된 양의 활성 성분을 포함하는 약학적 조성물의 개별적인 양이다. 활성 성분의 양은 대상체에게 투여되는 활성 성분의 투여량 및/또는 그러한 투여량의 편리한 분획 예컨대 예를 들어 투여량의 1/2 또는 1/3과 일반적으로 동일하다.

[0090] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물 내 활성 성분, 제약상 허용되는 부형제, 및/또는 임의의 추가 성분의 상대량은 치료 대상체의 동일성, 크기, 및/또는 장애에 따라 그리고 조성물이 투여되는 경로에 따라 변할 것이다. 예로서, 조성물은 0.1% 내지 100% (w/w) 활성 성분을 포함할 수도 있다.

[0091] 본 발명에 있어서, 제약상 허용되는 부형제는 특정한 투여 형태 목적에 적합한 임의의 모든 용매, 분산 매질, 희석제, 또는 다른 액체 비히클, 분산액 또는 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장화제, 증점제 또는 유화제, 보존제, 고체 결합제, 윤활제 등을 포함한다. 레밍턴(Remington)의 문헌[The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006]은 약학적 조성물 조제에 사용된 다양한 부형제 및 이의 제조를 위한 공지된 기술을 개시한다. 임의의 통상적인 담체 배지가 예컨대 임의의 원하지 않는 생물학적 효과를 제공하거나 다르게는 약학적 조성물의 임의의 다른 성분과 유해한 방식으로 상호작용함으로써 물질 또는 그 유도체와 공존할 수 없는 것을 제외하고, 그 용도는 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 고려한다. 제약상 허용되는 부형제는 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 순수하다.

[0092] 상기 부형제는 인간 및 수의학적 용도에서 승인되어 있다. 일부 실시예에서, 부형제는 미국식품의 약품국에 의해 승인되어 있다. 일부 실시예에서, 부형제는 제약 등급이다. 일부 실시예에서, 부형제는 미국 약전(USP), 유럽 약전(EP), 영국 약전, 및/또는 국제 약전(EP)의 표준을 충족한다.

[0093] 일부 실시예에서, 부형제는 인간 및 수의학적 용도에서 승인되어 있다. 일부 실시예에서, 부형제는 미국식품의약품국에 의해 승인되어 있다. 일부 실시예에서, 부형제는 제약 등급이다. 일부 실시예에서, 부형제는 미국 약전(USP), 유럽 약전(EP), 영국 약전, 및/또는 국제 약전(EP)의 표준을 충족한다.

[0094] 약학적 조성물의 제조에 사용된 제약상 허용되는 부형제는 불활성 희석제, 분산제 및/또는 과립화제, 표면 활성제 및/또는 유화제, 붕해제, 결합제, 보존제, 완충제, 윤활제, 및/또는 오일을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0095] 이러한 부형제는 임의로 본 발명의 제제에 포함될 수도 있다. 부형제 예컨대 코코아 버터 및 좌제 왁스, 착색제, 코팅제, 감미제, 향미제, 및 퍼퓸제는 조제사의 판단에 따라 조성물에 존재할 수 있다.

[0096] 예시적인 희석제는 탄산칼슘, 탄산나트륨, 인산칼슘, 인산이칼슘, 황산칼슘, 칼슘 히드로겐 포스페이트, 인산나트륨 락토스, 수크로스, 셀룰로스, 미세결정질 셀룰로스, 카올린, 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, 염화나트륨, 건조 전분, 옥수수 전분, 분말형 당, 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0097] 예시적인 과립화제 및/또는 분산제는 감자 전분, 옥수수 전분, 타피오카 전분, 소듐 스타치 글리콜레이트, 점토, 알긴산, 구아 검, 시트러스 펄프, 한천, 벤토나이트, 셀룰로스 및 목재 생성물, 천연 스폰지, 양이온-교환 수지, 탄산칼슘, 규산염, 탄산나트륨, 가교-결합형 폴리(비닐-피롤리돈) (크로스포비돈), 소듐 카르복시메틸 전분 (소듐 스타치 글리콜레이트), 카르복시메틸 셀룰로스, 가교-결합형 소듐 카르복시메틸 셀룰로스 (크로스카르멜로스), 메틸셀룰로스, 예비젤라틴화 전분 (전분 1500), 미세결정질 전분, 수불용성 전분, 칼슘 카르복시메틸 셀룰로스, 규산알루미늄마그네슘 (비검), 소듐 라우릴 술페이트, 4급 암모늄 화합물, 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0098] 예시적인 표면 활성제 및/또는 유화제는 천연 유화제 (예를 들어 아카시아, 한천, 알긴산, 알긴산나트륨, 트라가칸트, 촌드럭스(chondrux), 콜레스테롤, 크산탄, 펙틴, 젤라틴, 난황, 카세인, 양모 지방, 콜레스테롤, 왁스, 및 레시틴), 콜로이드성 점토 (예를 들어 벤토나이트 [규산알루미늄] 및 비검 [규산알루미늄마그네슘]), 장쇄 아미노산 유도체, 고분자량 알콜 (예를 들어 스테아릴 알콜, 세틸 알콜, 올레일 알콜, 트리아세틴 모노스테아레이트, 에틸렌 글리콜 디스테아레이트, 글리세릴 모노스테아레이트, 및 프로필렌 글리콜 모노스테아레이트, 폴리비닐 알콜), 카르보머 (예를 들어 카르복시 폴리메틸렌, 폴리아크릴산, 아크릴산 중합체, 및 카르복시비닐 중합체), 카라기난, 셀룰로스 유도체 (예를 들어 카르복시메틸셀룰로스 소듐, 분말화 셀룰로스, 히드록시메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스), 소르비탄 지방산 에스테르 (예를 들어 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트 [트윈 20], 폴리옥시에틸렌 소르비탄 [트윈 60], 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레에이트 [트윈 80], 소르비탄 모노팔미테이트 [스팬 40], 소르비탄 모노스테아레이트 [스팬 60], 소르비탄 트리스테아레이트 [스팬 65], 글리세릴 모노올레에이트, 소르비탄 모노올레에이트 [스팬80]), 폴리옥시에틸렌 에스테르 (예를 들어 폴리옥시에틸렌 모노스테아레이트 [미르즈 45], 폴리옥시에틸렌 수소화 피마자 오일, 폴리에톡실화 피마자 오일, 폴리옥시메틸렌 스테아레이트, 및 솔루톨), 수크로스 지방산 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 지방산 에스테르 (예를 들어 크레모포르), 폴리옥시에틸렌 에테르, (예를 들어 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르 [브리즈 30]), 폴리(비닐-피롤리돈), 디에틸렌 글리콜 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레에이트, 올레산나트륨, 칼륨 올레에이트, 에틸 올레에이트, 올레산, 에틸 라우레이, 소듐 라우릴 술페이트, 플루로닉 F 68, 폴록사머 188, 세트리모늄 브로마이드, 세틸피리디늄 클로라이드, 벤즈알코늄클로라이드, 도큐세이트 소듐, 및/또는 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0099] 예시적인 결합제는 전분 (예를 들어 옥수수 전분 및 전분 페이스트); 젤라틴; 당 (예를 들어 수크로스, 글루코스, 덱스트로스, 덱스트린, 당밀, 락토스, 락티톨, 만니톨); 천연 및 합성 검 (예를 들어 아카시아, 알긴산나트륨, 아이리쉬 모스의 추출물, 판워 검, 샤티 검, 이사폴 후스크스의 점액, 카르복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 에틸셀룰로스, 히드록시에틸셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 미세결정질 셀룰로스, 셀룰로스 아세테이트, 폴리(비닐-피롤리돈), 규산알루미늄마그네슘 (비검), 및 라치 아라보갈락탄); 알기네이트; 폴리에틸렌 옥시드; 폴리에틸렌 글리콜; 무기 칼슘 염; 규산; 폴리메타크릴레이트; 왁스; 물; 알콜; 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0100] 예시적인 보존제는 항산화제, 킬레이트화제, 항미생물 보존제, 항진균 보존제, 알콜 보존제, 산성 보존제, 및 다른 보존제를 포함할 수도 있다. 예시적인 항산화제는 알파 토코페롤, 아스코르브산, 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔, 부틸화 히드록시톨루엔, 모노티오글리세롤, 메타중아황산칼륨, 프로피온산, 프로필 갈레이트, 아스코르브산나트륨, 중아황산나트륨, 메타중아황산나트륨, 및 아황산나트륨을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 킬레이트화제는 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA), 시트르산 1수화물, 이나트륨 에데테

이트, 이칼륨 에데테이트, 에데트산, 푸마르산, 말산, 인산, 소듐 에데테이트, 타르타르산, 및 트리소듐 에데테이트를 포함한다. 예시적인 항미생물 보존제는 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드, 벤질 알콜, 브로노폴, 세트리미드, 세틸피리디늄 클로라이드, 클로르헥시딘, 클로로부탄올, 클로로크레졸, 클로로크실레놀, 크레졸, 에틸 알콜, 글리세린, 헥세티딘, 이미드우레아, 페놀, 페녹시에탄올, 페닐에틸 알콜, 페닐질산수은(phenylmercuric nitrate), 프로필렌 글리콜, 및 티메로살을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 항진균 보존제는 부틸 파라벤, 메틸 파라벤, 에틸 파라벤, 프로필 파라벤, 벤조산, 히드록시벤조산, 칼륨 벤조에이트, 소르브산칼륨, 벤조산나트륨, 프로피온산나트륨, 및 소르브산을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 알콜 보존제는 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜, 페놀, 페놀계 화합물, 비스페놀, 클로로부탄올, 히드록시벤조에이트, 및 페닐에틸 알콜을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 산성 보존제는 비타민 A, 비타민 C, 비타민 E, 베타-카로틴, 시트르산, 아세트산, 데히드로아세트산, 아스코르브산, 소르브산, 및 피트산을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 다른 보존제는 토코페롤, 토코페롤 아세테이트, 데테록시메 메실레이트, 세트리미드, 부틸화 히드록시아니솔 (BHA), 부틸화 히드록시톨루엔드 (BHT), 에틸렌디아민, 소듐 라우릴 술페이트 (SLS), 소듐 라우릴 에테르 술페이트 (SLES), 중아황산나트륨, 메타중아황산나트륨, 칼륨 술파이트, 메타중아황산칼륨, 글리단트 플러스, 페노닙, 메틸파라벤, 저몰 115, 게르마벤 II, 네올론, 카톤, 및 에욱실을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 특정 실시예에서, 보존제는 항-산화제이다. 다른 실시예에서, 보존제는 킬레이트화제이다.

[0101] 예시적인 완충제는 시트레이트 완충 용액, 아세테이트 완충 용액, 포스페이트 완충제 용액, 염화암모늄, 탄산칼슘, 염화칼슘, 칼슘 시트레이트, 칼슘 글루비오네이트, 칼슘 글루셉테이트, 칼슘 글루코네이트, D-글루콘산, 글리세로인산칼슘, 락트산칼슘, 프로판산, 칼슘 레불리네이트, 펜탄산, 이염기성 인산칼슘, 인산, 삼염기성 인산칼슘, 수산화칼슘 포스페이트, 아세트산칼륨, 염화칼륨, 글루콘산칼륨, 칼륨 혼합물, 이염기성 인산칼륨, 일염기성 인산칼륨, 인산칼륨 혼합물, 아세트산나트륨, 중탄산나트륨, 염화나트륨, 시트르산나트륨, 락트산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 일염기성 인산나트륨, 인산나트륨 혼합물, 트로메타민, 수산화마그네슘, 수산화알루미늄, 알긴산, 피로겐-자유수, 등장성 염수, 링거(Ringer's) 용액, 에틸 알콜, 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0102] 예시적인 윤활제는 스테아르산마그네슘, 스테아르산칼슘, 스테아르산, 실리카, 활석, 맥아, 글리세릴 베하네이트, 수소화 식물성 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 벤조산나트륨, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 류신, 마그네슘 라우릴 술페이트, 소듐 라우릴 술페이트, 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0103] 예시적인 오일은 아몬드, 살구 커넬, 아보카도, 바바수야자, 베르가모트, 흑색 커런트 종자, 보리지, 케이드, 카모마일, 카놀라, 카라웨이, 카르나우바, 카스토르, 시나몬, 코코아 버터, 코코넛, 대구 간, 커피, 옥수수, 목화 종자, 에뮤, 유칼립투스, 달맞이꽃, 생선, 아마 씨, 게라니올, 호박, 포도 종자, 개암, 히솝, 이소프로필 미리스테이트, 호호바, 쿠쿠이 넛, 라반딘, 라벤더, 레몬, 리트세아 쿠베바, 마카데미아 넛, 아욱, 망고 종자, 메도우폼 종자, 밍크, 넛멕, 올리브, 오렌지색의 오렌지색 라피, 팜, 팜핵, 복숭아 커넬, 땅콩, 양귀비 종자, 호박 종자, 평지씨, 쌀겨, 로즈마리, 홍화, 샌달우드, 사스쿠아나, 세이보리, 산자나무, 참깨, 시어 버터, 실리콘, 대두, 해바라기, 티트리, 엉겅퀴, 쓰바키, 베티버, 호두, 및 밀 배아 오일을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 오일은 부틸 스테아레이트, 카프릴산 트리글리세리드, 카프르산 트리글리세리드, 시클로메티콘, 디에틸 세바케이트, 디메티콘 360, 이소프로필 미리스테이트, 미네랄 오일, 옥틸도데칸올, 올레일 알콜, 실리콘 오일, 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0104] 경구 및 비경구 투여를 위한 액체 투여 형태는 제약상 허용되는 에멀젼, 마이크로에멀젼, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 활성 성분 외에, 액체 투여 형태는 본 기술분야에 공동으로 사용된 불활성 희석제 예컨대, 예를 들어, 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유화제 예컨대 에틸 알콜, 이소프로필 알콜, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸포름아미드, 오일 (특히, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 싹, 올리브, 아주까리, 및 참깨 오일), 글리세롤, 테트라히드로푸르푸릴 알콜, 소르비탄의 폴리에틸렌 글리콜 및 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물을 포함할 수도 있다. 불활성 희석제 외에, 경구 조성물은 아주반트 예컨대 습윤제, 유화제 및 현탁화제, 감미제, 향미제, 및 퍼퓸제를 포함할 수 있다. 비경구 투여를 위한 특정 실시예에서, 본 발명의 아젤라산(azelaic acid)은 가용화제 예컨대 크레모포르, 알콜, 오일, 변성 오일, 글리콜, 폴리소르베이트, 시클로덱스트린, 중합체, 및 이들의 조합과 혼합된다.

[0105] 경구 투여를 위한 고체 투여 형태는 캡슐, 정제, 환제, 분말, 및 과립을 포함한다. 이러한 고체 투여 형태에서, 활성 성분은 하나 이상의 불활성 제약상 허용되는 부형제 또는 담체 예컨대 시트르산나트륨 또는 인산이칼슘 및/또는 a) 충전제 또는 증량제 예컨대 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨, 및 규산, b) 결합제 예컨대,

예를 들어, 카르복시메틸셀룰로스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐피롤리디논, 수크로스, 및 아카시아, c) 함습제 예컨대 글리세롤, d) 붕해제 예컨대 한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 규산염, 및 탄산나트륨, e) 용해 지연제 예컨대 파라핀, f) 흡수 촉진제 예컨대 4급 암모늄 화합물, g) 습윤제 예컨대, 예를 들어, 세틸 알콜 및 글리세롤 모노스테아레이트, h) 흡수제 예컨대 카올린 및 벤토나이트 점토, 및 i) 윤활제 예컨대 활석, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 라우릴 술페이트, 및 이들의 혼합물과 혼합되어 있다.

[0106] 캡슐의 경우, 정제 및 환제, 투여 형태는 완충제를 포함할 수 있다. 유사한 유형의 고체 조성물은 락토스 또는 유당뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 그러한 부형제로서 사용하는 연질 및 경질-충전된 젤라틴 캡슐에서 충전제로서 채택될 수도 있다. 정제, 당의정, 캡슐, 환제, 및 과립의 고체 투여 형태는 코팅 및 쉘 예컨대 장용 코팅 및 제약 조제 분야에 잘 알려진 다른 코팅과 함께 제조될 수 있다. 이들은 임의로 불투명화제를 포함할 수도 있고, 활성 성분만을, 또는 우선적으로, 장관의 특정 부분, 임의로는 지연된 방식으로 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 포매 조성물의 예는 중합체 물질 및 왁스를 포함한다. 유사한 유형의 고체 조성물은 락토스 또는 유당뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 그러한 부형제로서 사용하는 연질 및 경질-충전된 젤라틴 캡슐에서 충전제로서 채택될 수도 있다.

[0107] 활성 성분은 상술한 하나 이상의 부형제와 함께 마이크로-캡슐화된 형태일 수 있다. 정제, 당의정, 캡슐, 환제, 및 과립의 고체 투여 형태는 코팅 및 쉘 예컨대 장용 코팅, 방출 제어 코팅 및 제약 조제 분야에 잘 알려진 다른 코팅과 함께 제조될 수 있다. 이러한 고체 투여 형태에서 활성 성분은 하나 이상의 불활성 희석제 예컨대 수크로스, 락토스 또는 전분과 혼합될 수도 있다. 이러한 투여 형태는 보통 실시에서처럼 불화성 희석제가 아닌 추가 물질, 예를 들어, 정제 윤활제 및 다른 정제 보조제 예컨대 스테아르산마그네슘 및 미세결정질 셀룰로스를 포함할 수 있다. 캡슐의 경우, 정제 및 환제, 투여 형태는 완충제를 포함할 수도 있다. 이들은 임의로 불투명화제를 포함할 수도 있고, 활성 성분만을, 또는 우선적으로, 장관의 특정 부분, 임의로는 지연된 방식으로 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 포매 조성물의 예는 중합체 물질 및 왁스를 포함한다.

[0108] 본 발명에 있어서, 상기 아젤라산(azelaic acid)의 국소 및/또는 경피 투여를 위한 투여 형태는 연고, 페이스트, 크림, 로션, 겔, 분말, 용액, 스프레이, 흡입제 및/또는 패치를 포함할 수도 있다. 일반적으로, 활성 성분은 멸균 장애하에서 제약상 허용되는 담체 및/또는 임의의 필요한 보존제 및/또는 요구될 수도 있는 완충제와 혼합되어 있다. 추가로, 본 발명은 흔히 활성 성분의 몸체로의 제어된 전달을 제공하는 추가 장점을 갖는 경피 패치의 사용을 고려한다. 이러한 투여 형태는 예를 들어 활성 성분을 적당한 배지에 융해 및/또는 분산시킴으로써 제조될 수 있다. 대안으로 또는 추가로, 비율 제어 막을 제공하고/거나 활성 성분을 중합체 매트릭스 및/또는 겔에 분산시킴으로써 비율이 제어될 수도 있다.

[0109] 국소 투여를 위한 제제는 액체 및/또는 세미 액체 제제 예컨대 도찰제, 로션, 수중유 및/또는 유중수 에멀젼 예컨대 크림, 연고/또는 페이스트, 및/또는 용액 및/또는 현탁액을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 활성 성분의 농축이 용매 내 활성 성분의 용해도 한계만큼 높을 수도 있지만, 국소-투여가능한 제제는 예를 들어 약 1% 내지 약 10% (w/w) 활성 성분을 포함할 수도 있다. 국소 투여를 위한 제제는 본원에서 기술한 하나 이상의 추가 성분을 추가로 포함할 수도 있다.

[0110] 본 발명에 있어서, 아젤라산(azelaic acid)은 전형적으로 쉬운 투여 및 균일한 투여를 위하여 투여 단위 형태로 제조된다. 그러나 본 발명의 조성물의 총 일일 용법은 타당한 의학적 판단의 범위 내에서 담당의에 의해 결정될 것임을 이해하게 될 것이다. 임의의 특정 대상체에 대한 특정한 치료 유효 용량 수준은 질환, 장애, 또는 치료 중인 장애 및 장애의 심각도를 포함하는 다양한 인자; 채택된 특정 활성 성분의 활성; 채택된 특정 조성물; 대상체의 나이, 체중, 전반적인 건강, 성별 및 다이어트; 채택된 특정 활성 성분의 투여 시간, 투여 경로, 및 배설율; 치료 기간; 채택된 특정 활성 성분과 조합하거나 동시에 사용한 약물; 및 의료 분야에 잘 알려진 인자 등에 좌우될 것이다.

[0111] 본 발명의 아젤라산(azelaic acid)을 포함하는 약학적 조성물은 임의의 경로로 투여될 수도 있다. 일부 실시예에서, 아젤라산(azelaic acid)을 포함하는 약학적 조성물은 경구, 정맥내, 근육내, 동맥내, 수질내, 척수강내, 피하, 뇌실내, 경피, 피내, 직장, 질내, 복강내, 국소(분말, 연고, 크림, 및/또는 액적에 의함), 점막, 코, 입, 경장, 설하; 기관내 점적주입, 기관지 점적주입, 및/또는 흡입; 및/또는 경구 스프레이, 비강 스프레이, 및/또는 에어로졸을 포함하는 다양한 경로에 의해 투여된다. 구체적으로 고려되는 경로는 침투성 정맥내 주사, 혈액 및/또는 림프 공급을 통한 국부 투여, 및/또는 환부 부위에 대한 직접 투여이다. 일반적으로 투여의 가장 적합한 경로는 작용제의 특성(예를 들어, 위장관의 환경에서의 안정성), 및 대상체의 장애(예를 들어 대상체가 경구

투여를 참을 수 있는지 여부)를 포함하는 다양한 인자에 좌우될 것이다. 현재 경구 및/또는 비강 스프레이 및/또는 에어로졸 경로가 치료제를 폐 및/또는 호흡기계에 직접 전달하기 위하여 가장 공통으로 이용되고 있다. 그러나 본 발명은 약물 전달 분야에서의 진전을 고려하는 임의의 적절한 경로에 의한 본 발명에 따른 약학적 조성물의 전달을 포함한다.

[0112] 특정 실시예에서, 본 발명의 아젤라산(azelaic acid)을 포함하는 약학적 조성물은 매일 대상체 체중의 약 0.001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 40 mg/kg, 약 0.5 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 1 mg/kg 내지 약 25 mg/kg을 하루에 1회 이상 전달하기 충분한 투여량 수준으로 투여하여 원하는 치료 효과를 얻을 수도 있다. 목적 투여량은 하루에 세 번, 하루에 두 번, 하루마다, 이틀마다, 삼일마다, 매주마다, 2주마다, 3주마다, 또는 4주마다 전달될 수도 있다. 특정 실시양태에서, 목적 투여량은 다중 투여(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 회 이상의 투여)를 통해 전달될 수도 있다.

[0113] 본 발명에 있어서, 용량 범위는 성인에게 제공된 약학적 조성물의 투여에 대한 가이던스를 제공함을 이해하게 될 것이다. 예를 들어 어린이 또는 청소년에게 투여되는 양은 전문의 또는 본 기술분야의 숙련자에 의해 결정될 수 있고, 성인에게 투여되는 것보다 적거나 동일할 수 있다. 유효량을 달성하는 데 요구되는 본 발명에 따른 펩타이드의 정확한 양은 예를 들어 대상체의 종, 나이, 및 전반적인 장애, 부작용 또는 장애의 심각도, 특성 화합물의 동일성, 투여 방식 등에 따라 대상체마다 다를 것이다.

[0114] 본 발명에 있어서 아젤라산(azelaic acid)을 포함하는 약학적 조성물은 조합 요법으로 사용될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 조합 요법에 사용되기 위한 치료의 특정한 조합(치료제 또는 절차)은 달성될 목적 치료 효과 및 목적 치료제 및/또는 절차의 적합성을 고려할 것이다.

[0115] 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로 또는 하나 이상의 치료 활성제와 조합하여 투여될 수 있다. "조합"의 경우, 다음 전달 방법이 본 발명의 범위에 속하긴 하지만, 작용제가 꼭 동일한 시간에 투여되어야 하고/하거나 같이 전달되기 위해 제형화되어야 한다는 것을 시사하도록 의도되진 않는다. 조성물은 하나 이상의 다른 목적 치료제 또는 의료 절차와 동시에, 그보다 먼저, 또는 그 이후에 투여될 수 있다. 일반적으로, 각 작용제는 그 작용제에 대해 정해진 투여량 및/또는 시간 스케쥴로 투여될 것이다. 추가로, 본 발명은 신체 내에서 그의 생체이용률을 개선시키고, 그의 대사를 감소 및/또는 수정하고, 그의 분비를 억제하고, 및/또는 그의 분포를 수정할 수 있는 작용제와 조합하여 본 발명의 약학적 조성물을 전달하는 것을 아우른다. 이 조합에서 사용되는 본 발명의 아젤라산(azelaic acid) 및 치료 활성제는 단일 조성물로 같이 투여되거나 상이한 조성물로 별도로 투여될 수 있다는 것이 더 이해될 것이다.

[0116] 조합 요법에 사용되는 특정한 조합은 달성될 목적 치료 효과 및/또는 본 발명의 아젤라산(azelaic acid)을 포함하는 절차 및/또는 치료 활성제의 적합성을 고려할 것이다. 사용되는 조합은 동일한 장애에 대해 목적 효과를 달성할 수 있고(예를 들어, 본 발명의 아젤라산(azelaic acid)은 동일한 장애를 치료하는 데 사용되는 또 다른 치료 활성제와 병용하여 투여될 수 있다), 및/또는 이것들은 상이한 효과를 달성할 수 있다(예를 들어, 임의의 부작용 제어)는 것이 이해될 것이다.

[0117] 본 발명에 있어서, "치료 활성제"는 장애를 치료, 예방, 지연, 환원 또는 개선시키기 위한 의약으로서 사용되는 임의의 물질을 가리키고, 예방적 및 치유적 치료를 포함하는, 치료에 사용되는 물질을 가리킨다.

[0118] 일부 실시예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 하나 이상의 증상 또는 염증성 장질환/장내 대사질환/간암/퇴행성 뇌질환 특징을 치료, 경감, 개선, 완화시키고, 그 개시를 지연시키고, 그 진행을 억제시키고, 그 중증도를 감소시키고, 및/또는 그 발생률을 감소시키는 데 유용한 임의의 치료 활성제 또는 절차 (예를 들어, 수술, 방사선 요법)와 조합하여 투여될 수 있다.

[0120] 본 발명에 있어서, 건강기능식품은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다. 건강기능식품으로는 이에 한정되지 않지만 예를 들면, 본 발명의 아젤라산(azelaic acid)을 차, 쥬스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용(건강음료)할 수 있도록 액상화, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 영양보조제로는 이에 한정되지 않지만 캡슐, 타블렛, 환 등에 본 발명의 아젤라산(azelaic acid)을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 본 발명의 아젤라산(azelaic acid)을 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 아젤라산(azelaic acid)과 염증성 장질환/장내 대사질환/간암/퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선 효과가 있다고 알려진 공지의 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태

로 제조할 수 있다.

[0121] 본 발명에 있어서, 아젤라산(azelaic acid)을 건강음료로 이용하는 경우, 상기 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드; 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

[0122] 본 발명에 있어서, 아젤라산(azelaic acid)은 염증성 장질환/장내 대사질환/간암/퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 식품 조성물의 유효성분으로 함유될 수 있는데, 그 양은 염증성 장질환/장내 대사질환/간암/퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선 작용을 달성하기에 유효한 양으로 특별히 한정되는 것은 아니나, 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%인 것이 바람직하다.

[0123] 본 발명에 있어서, 건강기능식품용 조성물은 아젤라산(azelaic acid)과 함께 염증성 장질환/장내 대사질환/간암/퇴행성 뇌질환에 효과가 있는 것으로 알려진 다른 활성 성분과 함께 혼합하여 제조될 수 있다.

[0124] 본 발명에 있어서, 상기 외에 본 발명의 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다.

[0126] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않은 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명한 것이다.

[0128] [실시예]

실 시 예 1

[0129] **아젤라산의 분자 표적인 Olfr544의 유전자 발현 분석**

[0130] 아젤라산의 분자 표적인 Olfr544 후각수용체(이하, Olfr544이라 함) 유전자의 GLUTag 세포에서의 발현을 확인하기 위해 유전자의 발현을 측정하는 실험을 수행하였다(도 1). 마우스의 소장과 대장 조직에서 qPCR(quantitiative real time PCR)로 Olfr544의 발현과 Olfr544와 높은 상동성(homology)를 갖고 있는 Olfr545의 발현을 확인하였고, GLUTag 세포에서 RT-PCR로 Olfr544, Gcg, ChgA의 발현을 확인하였다.

[0131] **(실시예 1-1) 세포배양**

[0132] 장내분비 세포는 마우스 유래의 장내분비 세포(enteroendocrine cell)인, L-세포인 GLUTag 세포(고려대학교에서 분양)를 사용하였다. 세포배양 배지는 저포도당(low glucose) DMEM(Dulbecco's modified Eagles's medium)에 10%의 fetal bovine serum(FBS)과 1%의 페니실린/스트렙토마이신을 첨가한 배지에 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

[0133] **(실시예 1-2) Olfr544 유전자 발현**

[0134] GLUTag 세포에서 Olfr544 유전자의 RNA 발현을 확인하기 위해 RT-PCR 및 qPCR을 수행하였다.

[0135] (1) cDNA 합성

[0136] 배양된 GLUTag 세포에서 RNA를 추출하여 ReverTra Ace qPCR RT kit(TOYOBO, Osaka, Japan)을 이용하여 cDNA 합성을 진행하였다. 더욱 상세하게는, RT-PCR 반응의 효율을 높이기 위해 상기 추출된 RNA를 65℃에서 5분간 처리한 다음, 바로 얼음에 보관하였다. 이후 gDNA 제거제가 포함된 2ul의 4×DNA Master Mix 와 0.5ug의 RNA, 증류수 (nuclease-free water)로 총 8μl의 반응물을 제조하여 37℃에서 5분 동안 반응시켰다. 그 다음, 상기 반응 생성물에 5×RT Master mix를 첨가하고 37℃-5분, 50℃-5분, 98℃-5분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

[0137] (2) PCR

[0138] 상기(1)의 방법으로 합성된 cDNA는 표1에 개시된 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 그 다음, 얻어진 PCR 산물은 전기영동으로 아가로스젤에 로딩하여 Olfr544 유전자의 RNA 발현 여부를 확인하였다. 이때, PCR 실험시 군간 유전자 발현은 L32 발현양에 대한 상대적 발현도를 계산하여 비교하였다. 대조군으로 Olfr545 및 L32를 사용하였다.

표 1

[0139] **프라이머 서열**

Gene	Forward primer	Reverse primer
Olfr544	CCTTATTGTCTTTGACTGCAACAT	TCGGTTGAAGATGCGAACAG
Olfr545	TCTGGTTTCTATGGACTGCAAC	TCTATTAAAGGTTCGAATAATGAGTC
Gcg	ACACAGAGGAGAACCCCAGA	CAATGTTGTTCCGGTTCCTC
ChgA	GCAGCATCCAGTTCCCACTT	TCCACTGCCTGAGAGTCCGA
L32	GCCCAAGATCGTCAAAAAGA	ATTGTGGACCAGGAACTTGC
Gapdh	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	ACACATTGGGGGTAGGAACA

[0140] (3) qPCR(quantitative real-time PCR)

[0141] 상기(1)의 방법으로 합성된 cDNA를 사용하여 qPCR은 당업자에게 공지된 방법으로 표1에 개시된 프라이머를 사용하여 THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix(TOYOBO, 오사카, 일본)와 iQ5 iCycler 시스템(Bio-rad, 캘리포니아, 미국)를 이용하여 수행하였으며, 더욱 상세하게는 95℃에서 4분 30초동안 변성한 후 같은 온도에서 10초동안 40 cycle에 걸쳐 변성 과정을 추가로 거친 다음, 55℃~60℃에서 30초간 가열냉각과정을 수행하였고 68℃에서 20초간 신장해 주었다. 각 유전자 발현 정도는 L32 발현을 이용하여 표준화시켰다. 프라이머 디자인은 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 nucleotide blast software를 이용하여 디자인 하였으며 Bionics(서울, 한국)에서 구매하였다.

[0142] 그 결과, 도 1a의 qPCR 실험에서 나타난 바와 같이, 마우스의 소장인 십이지장 (Duodenum), 공장 (Jejunum), 회장 (Ileum) 및 대장 (Colon) 조직에서 Olfr544 발현을 확인하였으며 Olfr545의 경우는 매우 낮은 발현을 나타냈다. 또한, 도 1b의 GLUTag 세포의 RT-PCR 실험에서 Olfr544, Gcg, ChgA의 유전자 발현이 유의적으로 나타나는 것을 확인하였다.

[0143] **(실시예 1-3) ex vivo GLP-1 assay**

[0144] 8주령의 male WT 마우스와 Olfr544 넉아웃 마우스에서 소장을 분리하여 1cm로 절개하여 5조각으로 잘게 자른 후 PBS로 씻어서 10% FBS와 100μM/L의 diprotin A가 포함된 DMEM 배지에 넣어 5% CO_2 인큐베이터에서 4시간 동안 배양하였다. 그리고 나서 조직 배양 배지에 아젤라산 또는 양성대조군인 forskoin과 IBMX를 처리하였다. 배양배지는 1시간 후에 수득하여 total GLP-1농도를 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

[0145] 그 결과, 도 1c에 나타난 바와 같이, WT 마우스에서 증가된 GLP-1 분비량이 Olfr544 넉아웃 마우스에서는 아젤라산을 처리하여도 GLP-1 분비량에 변화가 없는 것으로 나타났다. 이로써, 마우스 소장 조직 및 마우스 혈액에서 아젤라산에 의한 GLP-1 분비량의 증가가 Olfr544 의존적임을 확인할 수 있었다.

[0146] **(실시예 1-4) in vivo GLP-1 assay**

[0147] 마우스는 12시간 동안 절식시킨 후 dipotinA (3mg/kg)와 아젤라산 (50mg/kg)을 경구투여 한후 15분과 1시간 후에 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 혈장 GLP-1 수준을 ELISA kit (MilliporeSigma)를 이용하여 형광/발광 분석기 (Victor X2 micoplate reader; PerkinElmer, USA) 장비를 통해 양을 측정하였다.

[0148] 그 결과, 도 1c에 나타난 바와 같이, WT 마우스에서 증가된 GLP-1 분비량이 Olfr544 넉아넉아웃 마우스에서는 아젤라산을 처리하여도 GLP-1 분비량에 변화가 없는 것으로 나타났다. 이로써, 마우스 소장 조직 및 마우스 혈액에서 아젤라산에 의한 GLP-1 분비량의 증가가 Olfr544 의존적임을 확인할 수 있었다.

[0149] **(실시예 1-5) CREB 단백질 인산화 변화 분석**

[0150] 소장조직에서 아젤라산의 Olfr544활성화를 통한 에너지 대사 효능 평가 연구를 수행하기 위하여 GPCR 신호전달

경로를 확인하였다. 마우스 복강 내에 100mg/kg 농도로 아젤라산을 주입한 뒤 30분 후와 120분 후에 소장 조직을 떼어내 단백질을 추출한 뒤 immunoblotting 실험을 수행하여 아젤라산 처리에 따른 pCREB 단백질 발현을 확인하였다.

[0151] 그 결과, 아젤라산 120분 처리군에서 pCREB/CREB 단백질 발현이 대조군에 대비하여 유의적으로 증가함을 확인하였다(도 1d).

실 시 예 2

[0153] **아젤라산의 장내분비 세포의 GLP-1 분비 촉진능 분석**

[0154] 장내분비 세포는 다양한 자극에 반응하여 위장 호르몬 또는 펩티드를 생산하고, 전신효과를 위하여 혈관으로 위장 호르몬 또는 펩티드를 방출한다고 알려져 있으며 위와 근위소장에는 그렐린(ghrelin), 글루코스 의존적 인슐린 분비 펩티드(glucose-dependent insulinotropic peptide, GIP) 및 콜레시스토키닌(cholecystokinin, CCK)을 분비하고 회장과 대장에서는 글루카곤 유사 펩티드-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1), 글루카곤 유사 펩티드-2(glucagon-like peptide-2, GLP-2), 펩티드 YY(peptide YY)를 분비하는 세포가 존재하는 것으로 알려져 있다. 따라서 GLUTag 세포에서 DMEM 배지에서 배양하여 ELISA에 의해 장내분비 호르몬들을 측정하였다.

[0155] **(실시예 2-1) GLP-1 secretion assay**

[0156] DMEM 배지에서 2일동안 배양된 GLUTag 세포는 glucose-free Krebs-Ringer bicarbonate buffer로 씻어준 후 100 μM/L diprotin A와 0.5%(W/V) 소 혈청 알부민이 들어있는 같은 버퍼에 30분 동안 배양시킨다. 이후에 30μM forskolin, 10μM 3-Iisobutyl-1-methylxanthine(IBMX)의 양성 대조군, DMSO 처리의 음성대조군, 50uM 아젤라산 처리군으로 2시간 동안 배양시켰다. 세포의 분비된 GLP-1 양을 측정하기 위해서 세포의 배지액을 취하여 ELISA (millipore, USA) kit를 이용하여 GLP-1 분비량을 측정하고 단백질량으로 나누어 정량하였다.

[0157] 그 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이, 아젤라산을 처리했을 때 GLP-1 분비량이 유의적으로 증가됨을 확인하였다.

[0158] **(실시예 2-2) cAMP assay**

[0159] 또한, 마우스 장내분비 GLUTag 세포에서 후각수용체 Olfr544가 아젤라산에 의해 활성화되었을 때 대표적인 이차 전달자인 cAMP, IP_3 및 칼슘이온 중 어떤 신호전달 경로를 따르는지 확인하고자 하였다. cAMP 어세이는 cAMP 표준 검량 곡선을 이용하여 리간드에 의해 활성화된 GPCR 수용체의 이차 전령물질인 cAMP의 생성량을 추정하는 원리를 이용한다. cAMP Assay ELISA kit(Enzo Life science, 뉴욕, 미국)에 포함된 96 웰-플레이트는 GxR IgG 항체로 코팅되어 있으며, 표준 검량 곡선 작성을 위한 파란색 용액의 cAMP는 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase)와 결합한 다음, 토끼 항체에 의해 노란색으로 변화한다. 이는 cAMP와 결합된 웰이 pNpp 기질의 첨가에 의해 알칼라인 포스파타제가 활성화되면 색의 변화를 일으키고, 파장 405nm에서 비색 정량에 따라 cAMP 농도를 측정할 수 있다. 본 실험에서는 GLUTag 세포를 96-웰 플레이트에서 웰 당 1×10^4 세포들로 분주한 다음, 24시간 후에 50μM 아젤라산 및 양성대조군인 1μM Foskolin을 처리하여 상기 명시된 방법대로 cAMP 농도를 측정하였다. GLUTag 세포 내 cAMP 농도를 측정을 위해 cAMP activity assay kit (Enzo Life Science, NY, USA)를 사용하였다. 모든 실험은 세 번 반복하여 수행하였으며, Tukey's HSD test에 의한 one-way ANOVA 분석을 통해 여러 그룹건 통계적 유의성 분석을 수행하였다. 각기 다른 알파벳은 통계적으로 유의함($P<0.05$)을 나타낸 것이다.

[0160] 그 결과, 도 2b에 나타난 바와 같이, 아젤라산의 처리로 cAMP 농도는 유의적으로 증가하였다. 이는 아제라산이 Olfr544 수용체와 결합했을 때, G단백질 및 아데닐레이트 사이클라아제(adenylate cyclase)와 작용하여 cAMP 농도를 증가시킨 결과이다.

[0161] **(실시예 2-3) Calcium assay**

[0162] 세포 내 칼슘의 측정은 칼슘 이온을 표지하는 형광 염료인 Fluo-4 Direct™ Calcium Assay Kit(Invitrogen, 캘리포니아, 미국)를 사용하여 측정하였다. A-23187은 칼슘 이오노포어로 양성대조군으로 사용되었다. 배양된 GLUTag 세포를 수득하여 원심분리 후 침천물을 키트 내 함유된 Fluo-4 Direct™ calcium assay 완충용액에 2.5 × 106 세포/mL 농도로 희석시켰다. 이를 96-웰 플레이트 (96-well plate)에 분주시켜 37℃ 상태의 5% CO2 조건 하에서 60분간 배양시킨 다음, 96-웰 플레이트에 50μL 의 2X Fluo-4 Direct™ calcium reagent loading

solution을 분주하였고, 37℃ 상태의 5% CO2 조건 하에서 30분간 플레이트에 배양한 다음, excitation 494nm 및 emission 516nm 조건에서 형광을 측정하였다.

[0163] **(실시예 2-4) IP-one assay**

[0164] IP-one 어세이는 GPCR의 신호전달 과정 중 포스포리파아제(phospholipase)에 의해 인지질 분해로 생성된 이차 전달자인 IP3의 농도를 측정하여 PKC(protein kinase C) 신호전달 과정 조절능을 측정하는 방법이다. 본 실험에서는 GLUTag 세포를 96-웰 플레이트에 웰 당 1 x 10^4 세포들로 분주하여 분화시킨 다음, 50μM 아젤라산을 18시간 동안 처리하여 IP_3를 측정하기 위해 오차가 적은 세포 내 IP-one(IP3 대사물)을 대리 표지자로 IP-one ELISA Assay kit(Cisbio, 프랑스)를 사용하여 측정하였다.

[0165] 그 결과, 도 2b에 나타난 바와 같이, 아젤라산의 경우 세포 내 cAMP 농도를 유의적으로 증가시켰으나 칼슘 및 IP_3 농도에는 영향을 주지 않았다.

[0166] **(실시예 2-5) PKA activity**

[0167] 조직세포 내 cAMP의 농도 변화에 따라 신호전달 관련 단백질 활성을 조절하는 대표적인 단백질이 PKA(protein kinase A)이다. 통상적인 조건에서 PKA는 단백질의 조절 도메인 부위가 효소활성 부위를 가로막고 있어 활성이 억제되어 있는데 cAMP 농도가 증가하면 cAMP가 PKA의 조절부위에 결합하여 활성부위가 노출되며 이에 따라 PKA 활성이 증가된다. 본 실험에서는 아젤라산에 의한 PKA 활성 변화를 측정하였다. PKA 활성측정은 Enzo PKA kinase activity kit(Cat. #ADI-EKS-390A, Enzo Life Sciences, 한국)를 사용하여 측정하였다.

[0168] 그 결과, 도 2d에 나타난 바와 같이, 아젤라산이 GLUTag 세포에서 PKA 활성을 유의적으로 증가시켰다. 또한 2c에 나타난 바와 같이, PKA 억제제인 H89를 전처리했을 때 아젤라산 처리에 따른 GLP-1의 분비가 억제되어 GLUTag 세포에서 cAMP-PKA 신호전달을 활성화 시킴을 확인할 수 있었다.

[0169] **(실시예 2-6) CREB 단백질 인산화 변화 분석**

[0170] 아젤라산에 의해 PKA 단백질 활성이 증가되면 PKA 표적 단백질의 인산화가 증가한다. 따라서, GLUTag 세포에서 PKA의 표적단백질로 알려진 CREB(cAMP-response element biding protein)의 인산화를 IB(immunoblotting) 기법으로 확인하였다. 아젤라산을 GLUTag 세포에 2시간 반응시킨 다음, 단백질을 추출하여 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 1차 항체는 항-phospho-CREB이다.

[0171] 그 결과, 도 2e에 나타난 바와 같이, 아젤라산을 50μM 농도로 2시간 처리한 경우 대조군에 비해 CREB의 인산화가 급격히 증가하였다. 결국, GLUTag 세포에서 아젤라산에 의해 활성화된 Olfr554가 이차 전달자로 cAMP의 농도를 증가시켰고, cAMP/PKA 신호전달 경로에 관여함을 표적 단백질인 CREB의 인산화를 통해 확인하였다.

실 시 예 3

[0173] **Olfr shRNA를 이용한 아젤라산 장내분비 조절 효과에서의 Olfr544 의존성 확인**

[0174] **(실시예 3-1) Olfr544 shRNA를 이용한 GLUT 세포의 Olfr544 유전자 넉다운**

[0175] 마우스 GLUTag 세포에서 Olfr544 유전자의 넉다운 효과를 확인하기 위하여 Olfr544를 표적으로 하는 shRNA 염기서열(top strand: 5′-CACCGCTCACTGTTCGCATCTTCATTCGAAAATGAAGATGGGA-ACAGTGAG-3′) 또는 비표적 scrambled shRNA 염기서열(top strand: 5′-CACCGTAAGGCT-ATGAAGAGATACCGAAGTATCTCTTCATAGCCTTA-3′)을 Block-iT U6 RNAi entry vector kit(Invitrogen)을 이용하여 pENTR/U6 벡터에 삽입하여 Olfr544 shRNA를 제작한 후, 2.5 μg Olfr544 shRNA 또는 scrambled shRNA를 10 μL Lipofectamin2000 (Invitrogen)을 사용하여 트랜스펙션 한 후, 48시간 후에 Olfr544의 RNA 발현을 측정하였다. Scr shRNA는 음성대조군으로 사용하였다.

[0176] 그 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이, Olfr544 shRNA에 의해 Olfr544 RNA의 발현이 유의하게 감소함을 확인할 수 있었다.

[0177] **(실시예 3-2) Olfr544 유전자가 넉다운된 GLUTag 세포에서의 아젤라산의 신호전달 불활성화 효과**

[0178] 마우스 GLUTag 세포에서 Olfr544유전자를 넉다운시킨 후, 실시예2에 기재된 방법에 따라 cAMP 어세이와 PKA활성을 확인하였다.

[0179] 그 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이, Olfr544 shRNA가 형질주입되어 Olfr544 유전자의 발현이 저해된 GLUTag 세포에서는 아젤라산을 처리하여도 cAMP-PKA 신호전달 경로가 모두 불활성화됨을 확인할 수 있었다. 또한, 도 3c에 나타난 바와 같이, Olfr544 유전자의 발현이 저해된 GLUTag 세포에서는 아젤라산을 처리하여도 CREB의 인산화가 억제됨을 확인할 수 있었다.

[0180] **(실시예 3-3) Olfr544 유전자가 넉다운 된 GLUTag 세포에서의 아젤라산의 GLP-1 분비 효과 측정**

[0181] 마우스 지방세포에서 Olfr544유전자를 넉다운 시킨 후, 아젤라산을 처리하여 아젤라산이 GLP-1 분비하는 효능이 유지되는지 확인하였다.

[0182] 그 결과, 도 3d에 나타난 바와 같이, Olfr544 shRNA가 형질 주입되어 Olfr544 유전자의 발현이 저해된 GLUTag 세포에서는 아젤라산을 처리하여도 GLP-1 분비량에 변화가 없는 것으로 나타났다. 이로써, GLUTag 세포에서 아젤라산에 의한 GLP-1 분비량의 증가가 Olfr544 의존적임을 확인할 수 있었다.

실 시 예 4

[0184] **아젤라산의 장내호르몬 분비 측정**

[0185] PYY (Elascience, USA), GLP-2 (Cusabio, China), GIP (Elascience, USA), 및 Ghrelin (Elascience, USA) ELISA kit를 이용하여 GLUTag 세포에서 장내분비 호르몬들을 측정하였다.

[0186] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 아젤라산을 처리했을 때 PYY, GLP-2, GIP, 및 Ghrelin 분비량에 유의한 증가가 보이지 않았다. 따라서 아젤라산은 마우스 장내분비 세포에서 GLP-1의 분비를 촉진시킴을 확인할 수 있었다.

실 시 예 5

[0188] **고지방 식이로 비만이 유도된 마우스의 아젤라산의 대사적 효능 평가**

[0189] 마우스에 6주동안 고지방 식이와 동시에 아젤라산을 50 mg/kg body weight으로 투여한 뒤 아젤라산의 대사적 효능을 비교한 결과 유의적으로 아젤라산 투여에 따른 체중 감소가 나타났다 (도 5a). 이로써 고지방 식이로 비만이 유도되었을 때 아젤라산의 투여는 Olfr544 의존적으로 긍정적인 대사적 효능을 나타낼 것으로 사료된다.

[0190] 마우스 혈액 내 중성지방, 콜레스테롤, HDL, LDL, 및 GLP-1 농도 분석 (도 5b)에서 대조군에 대비하여 아젤라산 처리군의 변화를 나타내지 않았으나 간 조직의 중성지방 농도를 분석한 결과, 대조군 대비 아젤라산 처리군에서 유의적으로 중성지방이 줄어든 것을 확인하였다 (도 5c).

[0191] 간독성을 나타내는 지표인 AST, ALT의 혈액 내 농도를 측정하여 간손상 여부를 평가한 결과 ALT의 농도가 줄어든 것을 확인하였고 에너지 대사 및 비만도에 영향을 주는 갑상선 호르몬 Triiodothyronine(T3)와 Thyroxine(T4)의 농도를 측정한 결과 아젤라산 처리군에서 유의적으로 감소한 것을 확인하였다 (도 5d). 따라서, 아젤라산 투여에 의한 체중감소는 갑상선 호르몬 증가에 의한 요인은 아님을 확인하였다.

실 시 예 6

[0193] **아젤라산의 세포독성 평가**

[0194] 아젤라산의 세포독성을 평가하기 위해 MTT assay를 수행하였다. MTT 어세이는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT 테트라졸륨(tetrazolium)을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT 포르마잔(formazan)(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법이다. MTT 시약은 $C_{18}H_{16}BrN_5S$(Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide)를 PBS(Phosphate buffered saline)에 5mg/ml의 농도로 희석하여 준비하였다.

[0195] 먼저 96-웰 플레이트(well plate)에 GLUTag 세포를(4×10^5 세포/ml) 분주하고, 37℃, 5% CO_2 하에서 24시간 배양한 다음, 아젤라산을 0~500 μM 농도 구간에서 처리하여 24시간 배양하였다. 각 시료에 MTT 시약을 4mg/ml 농

도로 100㎕ 첨가한 다음 37℃, 5% CO_2 하에서 4시간 배양한 후, DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 100㎕ 첨가하고, 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 수치는 생존 세포 수와 비례하는 원리를 이용하여 독성에 의한 세포 사멸 효과를 정량한 것이다.

[0196] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, GLUTag 세포에 아젤라산을 500㎛M의 고농도에 처리해도 세포독성을 나타내지 않는 것으로 확인하였다. 따라서, 보리, 귀리 등 곡류를 포함한 각종 섭취 가능한 식물에 포함되어 있는 아젤라산은 인체 내에서 안전하게 섭취될 수 있는 물질임을 확인하였다.

실 시 예 7

[0198] **고지방 식이로 비만이 유도된 WT 마우스 및 KO 마우스의 아젤라산에 의한 장내미생물의 변화 분석**

[0199] 아젤라산을 8주간 투여한 고지방식이 WT 마우스에서 아젤라산에 의한 유의한 무게, 조직량 감소에 비해 KO 마우스에서는 무게, 조직량의 감소가 유의하지 않음을 확인하였다 (도 7a, b).

[0200] WT과 KO마우스의 결장(Cecum) 그리고 분변(Stool)을 각각 Miseq을 이용한 V4 region의 16s rRNA 분석을 QIIME 1.9.1 프로그램을 통해 마우스의 장내미생물의 미생물총 풍부도(Richness)인 alpha diversity (도 7c)를 분석하였고, 다양성(diversity)을 beta diversity (도 7d)를 분석하였다.

[0201] 분석한 결과 8주 투여 후에는 장내미생물의 미생물총 풍부도와 다양성에서 유의적인 변화가 보이지 않았다. T-test 단별량 분석에서는 과(Family)와 종(species)에서 8주간 아젤라산을 투여한 이후 결장에서 과 수준에서 클로스트리디움과 (Clostridiaceae)가 유의적으로 줄어드는 것을 확인하였다 (도 7e, f).

[0202] 8주간 아젤라산을 투여한 후 분변을 분석하였을 때는 루미노코카세과 (Ruminococcaceae)가 유의적으로 줄어드는 것을 확인하였고, 파라박테로이데스 (Parabacteroides) 종 그리고 비만에 유익하다고 알려진 테리오데스 애시디파시엔스 (Bacteroides acidifaciens)가 유의적으로 늘어나는 것을 확인함으로써, 아젤라산의 투여가 비만에 유익한 장내미생물 변화를 준 것을 확인하였다 (도 8a, b).

실 시 예 8

[0204] **마우스 대장에서 아젤라산에 의한 항염증 효과**

[0205] **(실시예 8-1) RNA sequencing**

[0206] WT과 KO 마우스 대장에서 아젤라산의 항염증 효과를 연구하기 위해 장조직을 분리하여 LPS를 전처리 후 아젤라산을 처리하여 RNA를 추출하여 RNA sequencing을 실시하였다. 라이브러리 구축, 증폭, 정제 및 고처리량 시퀀싱은 Illumina사에 의해 NextSeq RNA 라이브러리 제조 키트를 사용하여 싱글-엔드 75 시퀀싱으로 수행되었다. KEGG 신호전달 경로 분석은 DAVID 버전 6.8을 이용하여 분석하였다.

[0207] KEGG 신호전달 경로 분석에서 아젤라산에 의해 염증관련 신호전달 경로가 유의하게 조절되었으며 (도 9a). 아젤라산에 의해 조절되는 유전자들을 히트맵으로 나타냈고 WT의 대장조직에서는 염증성 사이토카인의 발현이 억제되었지만 KO의 대장조직에서는 염증성 사이토카인의 발현 억제가 보이지 않았다 (도 9b). 이러한 결과는 대장조직에서 아젤라산이 항염증 효과를 나타내는 것을 의미한다.

[0208] **(실시예 8-2) Proinflammatory cytokine assay**

[0209] 마우스의 대장조직에서 염증성 사이토카인 TNFa, IL6 및 IL-1β의 분비량 측정을 위해 Thermo scientific (IL, USA)사의 ELISA kit를 사용하였다. 고지방식이 대조군에 비해 아젤라산 식이군 마우스의 대장조직에서 TNFα와 IL-1β의 분비량이 유의적으로 감소함을 확인하였다(도9c). 그러나 KO 마우스 그룹에서는 아젤라산의 염증성 사이토카인 분비량의 감소는 보이지 않았다. 따라서 아젤라산은 체내의 대장조직에 작용하여 비만에 의해 유발된 염증을 감소시켜 염증성 장질환에 대한 항염 효능을 얻을 수 있다.

[0210] **(실시예 8-3) Proinflammatory cytokine assay**

[0211] 마우스의 혈청과 분변에서 세포내독소인 LPS의 분비량 측정을 위해 CUSABIO사의 ELISA kit를 사용하였다. 고지방식이 대조군에 비해 아젤라산 식이군 마우스의 분변에서 LPS의 분비량이 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었

다 (도 9e). 마우스의 혈청에서는 LPS 및 장내세균 유래 대사물질인 TMAO의 분비량의 차이는 보이지 않았다 (도 9d).

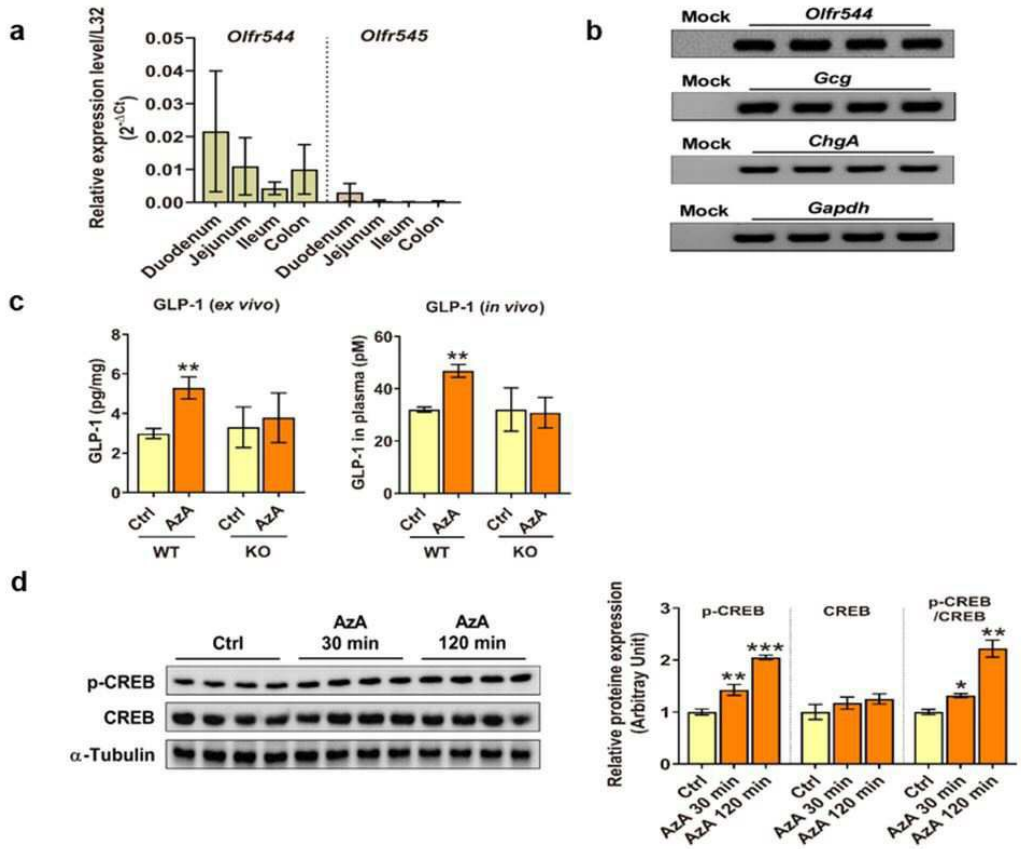
[0212] **(실시예 8-4) Intestinal permeability test**

[0213] 장내 투과성 실험은 PBS에 녹인 FITC-dextran (4kDa, Sigma)을 마우스에 600mg/kg 농도로 경구투여하여 2시간 후에 꼬리정맥에서 혈액을 채취하여 원심분리하여 혈장을 수득하여 혈장 FITC-dextran 농도를 형광/발광 multi-mode plate reader (Spectramax, USA)를 이용하여 490nm excitation, 520nm emission 파장으로 측정하였다.

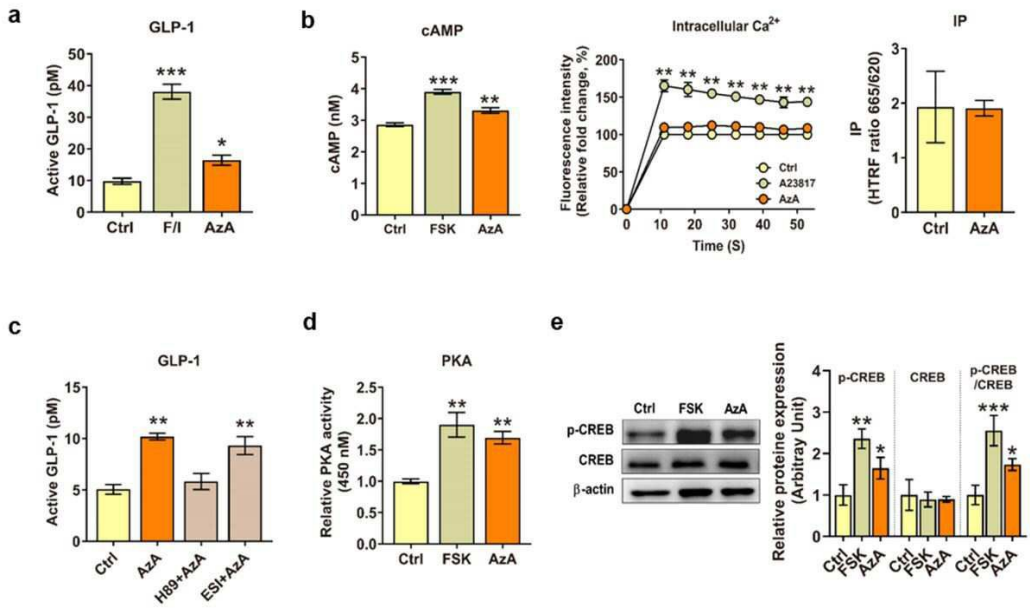
[0214] 그 결과, 고지방식이 대조군에 비해 아젤라산 처리 마우스군에서 장내 투과성이 감소되는 경향을 확인하였다(도 9f).

도면

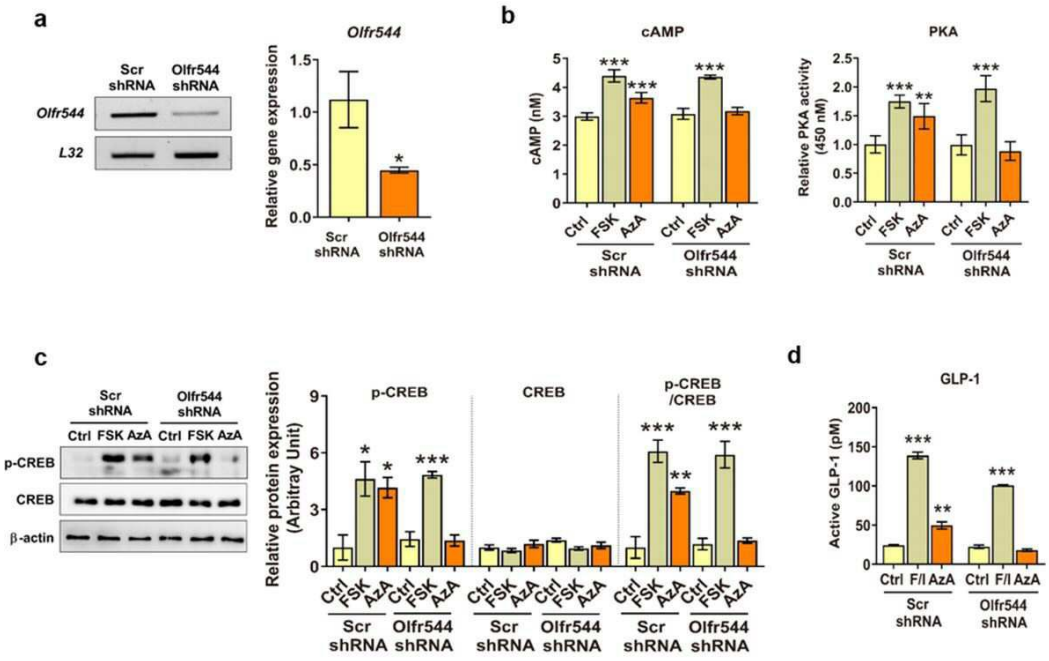
도면1



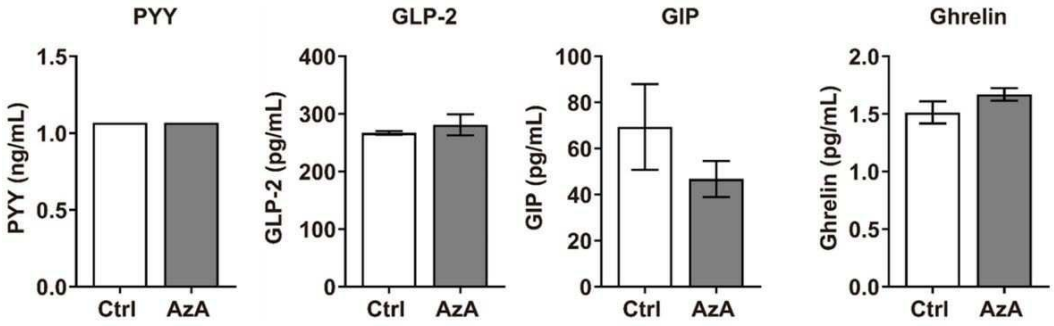
도면2


a
GLP-1
Active GLP-1 (pM)
Ctrl
F/I
AzA
b
cAMP
cAMP (nM)
Ctrl
FSK
AzA
Intracellular Ca2+
Fluorescence intensity (Relative fold change, %)
Ctrl
A23817
AzA
Time (S)
IP
IP (HTRF ratio 665/620)
Ctrl
AzA
c
GLP-1
Active GLP-1 (pM)
Ctrl
AzA
H89+AzA
ESI+AzA
d
PKA
Relative PKA activity (450 nM)
Ctrl
FSK
AzA
e
Ctrl
FSK
AzA
p-CREB
CREB
β-actin
Relative proteine expression (Arbitray Unit)
p-CREB
CREB
p-CREB /CREB
Ctrl
FSK
AzA

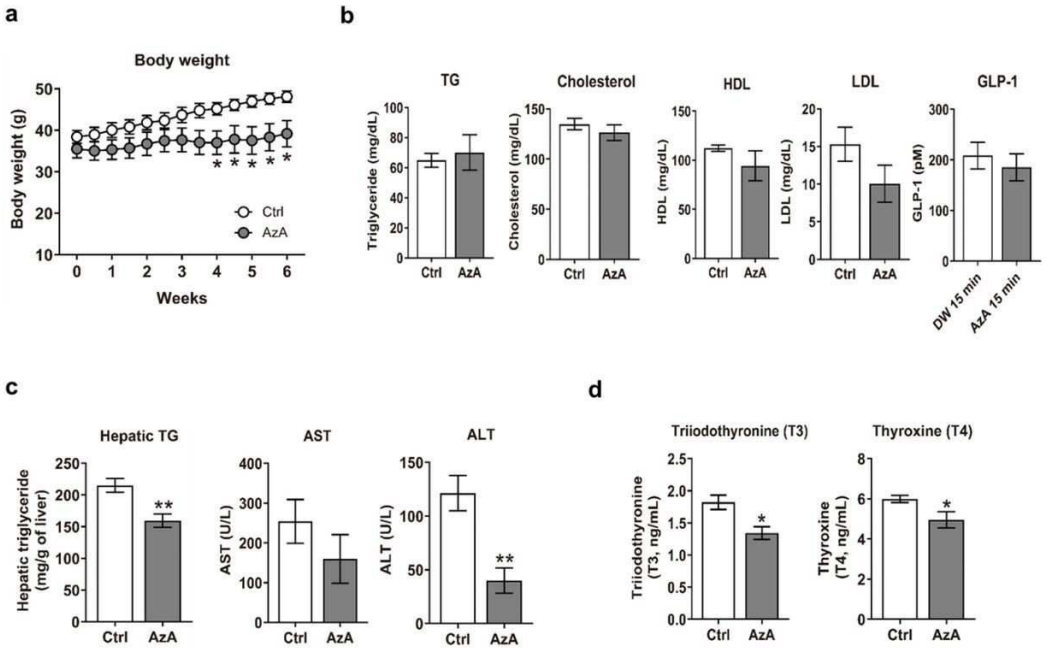
도면3


a
Scr shRNA
Olfr544 shRNA
Olfr544
L32
Olfr544
Relative gene expression
Scr shRNA
Olfr544 shRNA
b
cAMP
cAMP (nM)
PKA
Relative PKA activity (450 nM)
Ctrl
FSK
AzA
Scr shRNA
Olfr544 shRNA
c
Scr shRNA
Olfr544 shRNA
Ctrl FSK AzA Ctrl FSK AzA
p-CREB
CREB
β-actin
Relative protein expression (Arbitray Unit)
p-CREB
CREB
p-CREB /CREB
d
GLP-1
Active GLP-1 (pM)
Ctrl
F/I
AzA
Scr shRNA
Olfr544 shRNA

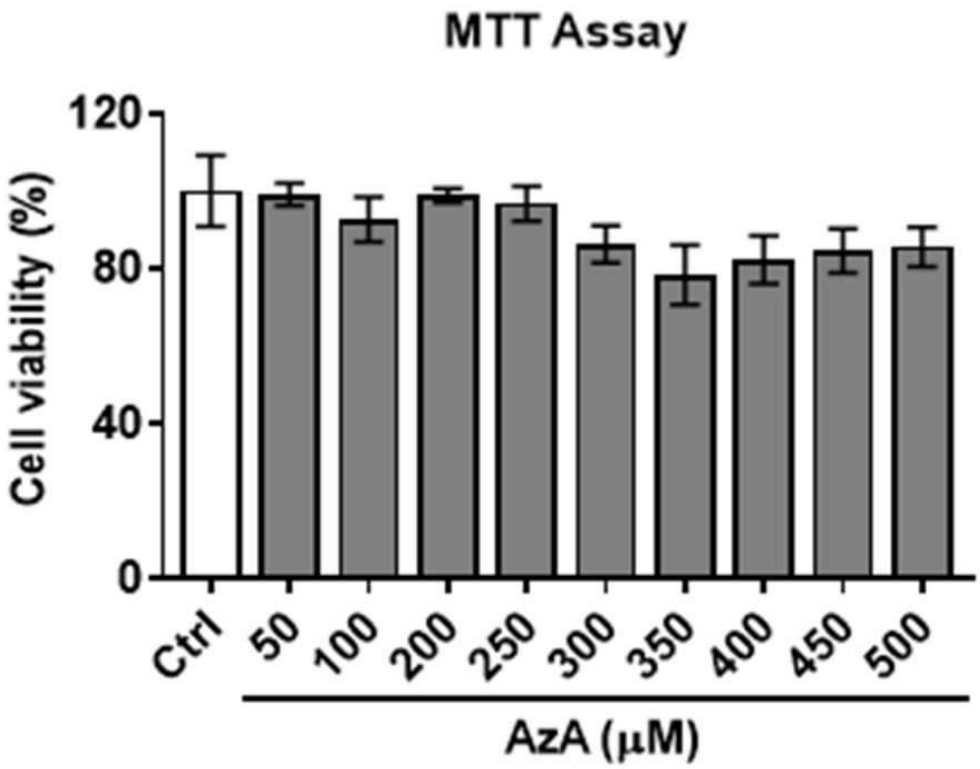
도면4


PYY
PYY (ng/mL)
1.5
1.0
0.5
0.0
Ctrl
AzA
GLP-2
GLP-2 (pg/mL)
400
300
200
100
0
Ctrl
AzA
GIP
GIP (pg/mL)
100
80
60
40
20
0
Ctrl
AzA
Ghrelin
Ghrelin (pg/mL)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Ctrl
AzA

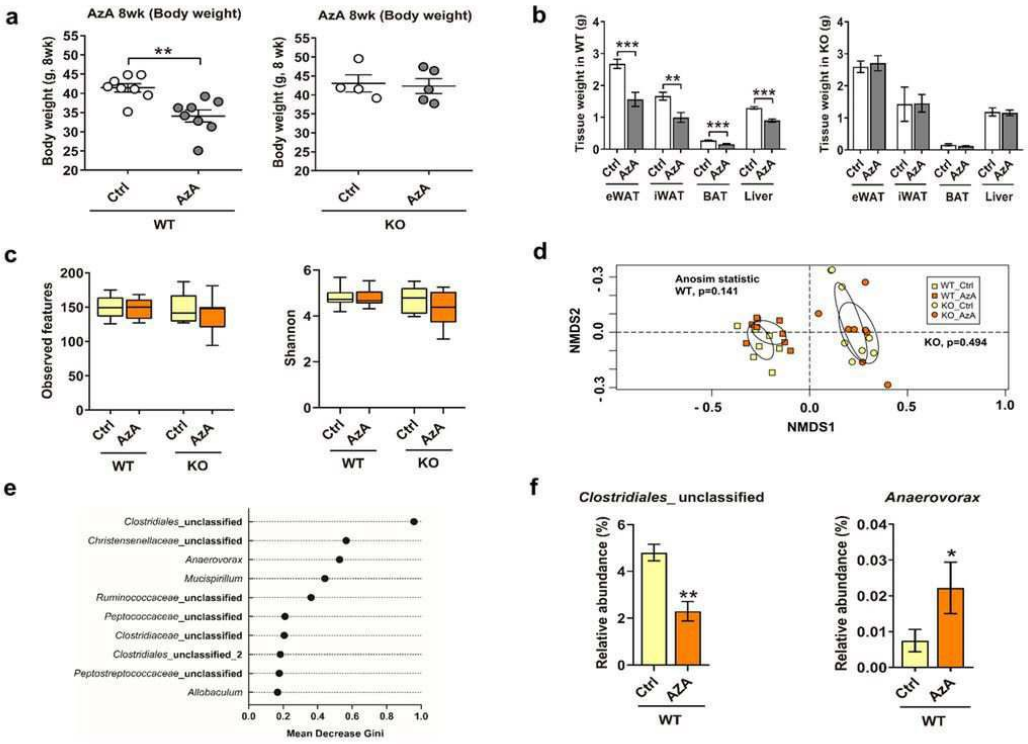
도면5


a
Body weight
Body weight (g)
Weeks
Ctrl
AzA
b
TG
Triglyceride (mg/dL)
Cholesterol
Cholesterol (mg/dL)
HDL
HDL (mg/dL)
LDL
LDL (mg/dL)
GLP-1
GLP-1 (pM)
DW 15 min
AzA 15 min
c
Hepatic TG
Hepatic triglyceride (mg/g of liver)
AST
AST (U/L)
ALT
ALT (U/L)
d
Triiodothyronine (T3)
Triiodothyronine (T3, ng/mL)
Thyroxine (T4)
Thyroxine (T4, ng/mL)

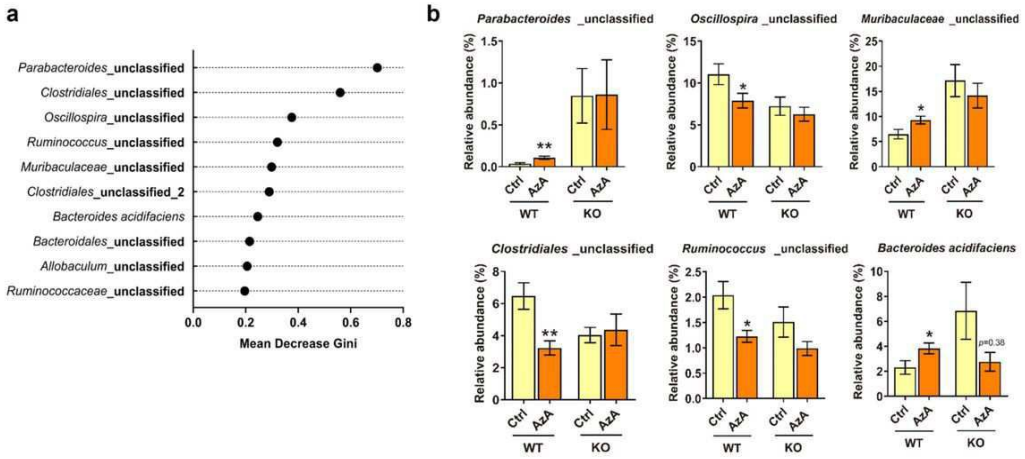
도면6


MTT Assay
Cell viability (%)
120
80
40
0
Ctrl
50
100
200
250
300
350
400
450
500
AzA (μM)

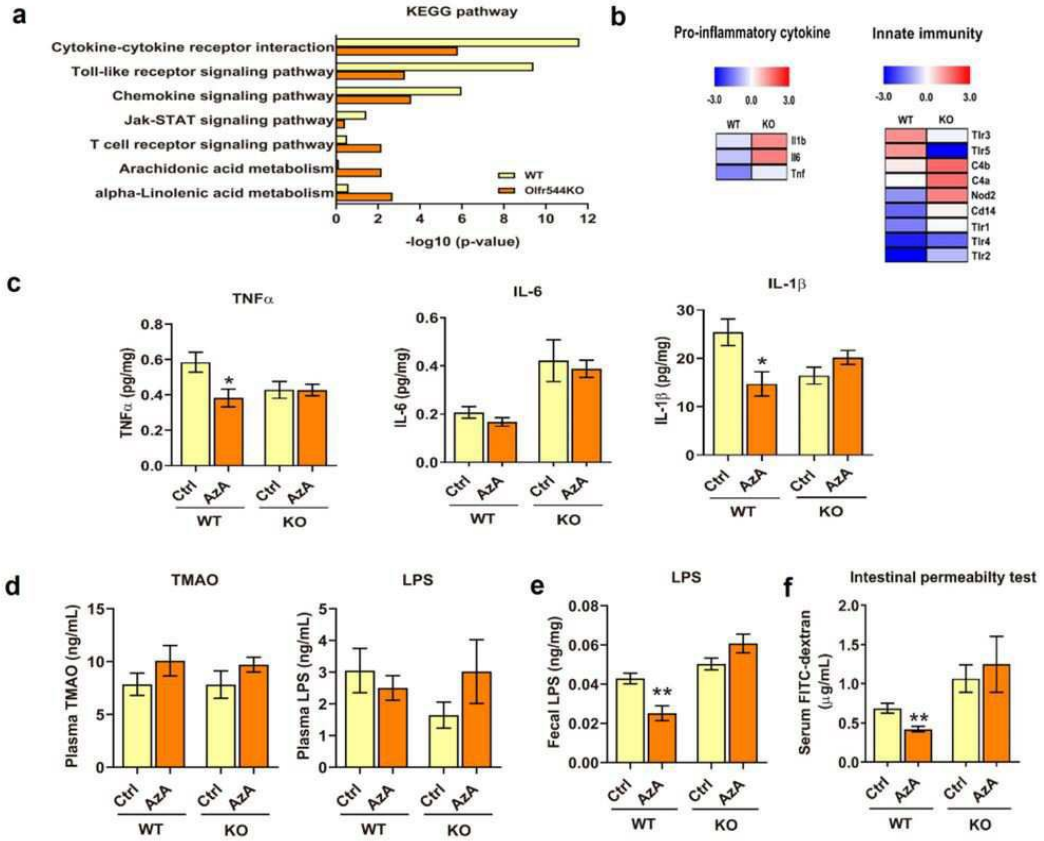
도면7


a
AzA 8wk (Body weight)
Body weight (g, 8wk)
Ctrl
AzA
WT
KO
b
Tissue weight in WT (g)
Tissue weight in KO (g)
eWAT
iWAT
BAT
Liver
c
Observed features
Shannon
d
Anosim statistic
WT, p=0.141
KO, p=0.494
NMDS1
NMDS2
e
Clostridiales_unclassified
Christensenellaceae_unclassified
Anaerovorax
Mucispirillum
Ruminococcaceae_unclassified
Peptococcaceae_unclassified
Clostridiaceae_unclassified
Clostridiales_unclassified_2
Peptostreptococcaceae_unclassified
Allobaculum
Mean Decrease Gini
f
Clostridiales_unclassified
Anaerovorax
Relative abundance (%)

도면8


a
Parabacteroides_unclassified
Clostridiales_unclassified
Oscillospira_unclassified
Ruminococcus_unclassified
Muribaculaceae_unclassified
Clostridiales_unclassified_2
Bacteroides acidifaciens
Bacteroidales_unclassified
Allobaculum_unclassified
Ruminococcaceae_unclassified
0.0 0.2 0.4 0.6 0.8
Mean Decrease Gini
b
Parabacteroides _unclassified
Oscillospira _unclassified
Muribaculaceae _unclassified
Clostridiales _unclassified
Ruminococcus _unclassified
Bacteroides acidifaciens
Relative abundance (%)
Ctrl AzA Ctrl AzA
WT KO
p=0.38

도면9


a
KEGG pathway
Cytokine-cytokine receptor interaction
Toll-like receptor signaling pathway
Chemokine signaling pathway
Jak-STAT signaling pathway
T cell receptor signaling pathway
Arachidonic acid metabolism
alpha-Linolenic acid metabolism
WT
Olfr544KO
-log10 (p-value)
b
Pro-inflammatory cytokine
Innate immunity
WT KO
Il1b
Il6
Tnf
Tlr3
Tlr5
C4b
C4a
Nod2
Cd14
Tlr1
Tlr4
Tlr2
c
TNFα
IL-6
IL-1β
TNFα (pg/mg)
IL-6 (pg/mg)
IL-1β (pg/mg)
Ctrl AzA Ctrl AzA
WT KO
d
TMAO
LPS
Plasma TMAO (ng/mL)
Plasma LPS (ng/mL)
e
LPS
Fecal LPS (ng/mg)
f
Intestinal permeabilty test
Serum FITC-dextran (μg/mL)