(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0065330
(43) 공개일자 2024년05월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4418 (2006.01) *A61K 9/20* (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/4418 (2013.01)
A61K 9/20 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7015017(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년11월09일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2019-7014274
원출원일자(국제) 2017년11월09일
심사청구일자 2020년11월06일
(85) 번역문제출일자 2024년05월03일
(86) 국제출원번호 PCT/MX2017/000129
(87) 국제공개번호 WO 2018/088886
국제공개일자 2018년05월17일
(30) 우선권주장
MX/a/2016/014775 2016년11월11일 멕시코(MX)

(71) 출원인
셀 테라피 앤드 테크놀로지, 에스.에이. 디이 씨.브이.
멕시코, 디. 에프., 씨.피. 04980, 델레가시온 코요아칸, 콜. 엑스 하시엔다 코아파, 보데가 1, 칼자다 데 라 봄바스 넘버 128
(72) 발명자
아르멘다리즈 보룬다, 후안 소코로
멕시코, 04899, 시우다드 데 멕시코, 콜. 엑스-하시엔다 코아파, 보데가 1, 칼자다 데 라 봄바스 넘버 128
마가나 캐스트로, 호세 아구스틴 로헬리오
멕시코, 04899, 시우다드 데 멕시코, 콜. 엑스-하시엔다 코아파, 보데가 1, 칼자다 데 라 봄바스 넘버 128
헤르난데즈 알다나, 나디엘
멕시코, 04899, 시우다드 데 멕시코, 콜. 엑스-하시엔다 코아파, 보데가 1, 칼자다 데 라 봄바스 넘버 128
(74) 대리인
김영철, 김 순 영

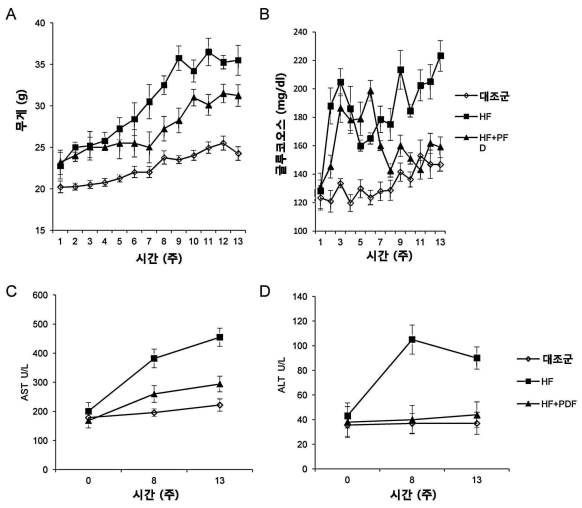
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **인간 지방간염(NAFLD/NASH)의 치료 및 역행을 위한 서방성 피르페니돈 함유 조성물의 약학적 용도**

(57) 요 약

본 발명은 감소된 혈청 콜레스테롤 및 트리글리세라이드뿐만 아니라 거대지방증(macrosteatosis) 및 미세지방증(microsteatosis) 둘 다의 형태의 간 지방 축적의 함량을 감소시킴으로써, AFLD/NASH 및 진행된 간 섬유증을 치료하기 위한 피르페니돈을 포함하는 서방정 제형의 약학 조성물의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 지방 분해 및 간의 염증의 대사에 있어서 핵심 분자인, PPAR감마(퍼옥시좀 증식 수용체 활성화 감마), PPAR알파(퍼옥시좀 증식 수용체 활성화 알파), LXR 및 CPT1에 대한 작용제로서의 상기 조성물의 용도에 관한 것이다. 또한, 또 다른 용도는 간 염증 과정 인자의 전사 유도물질인, MFkB 마스터 유전자의 발현 감소를 유도하는 것이다. 이러한 모든 사건은 NAFLD/NASH 및 진행된 간 섬유증의 역행을 초래한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 1/16 (2018.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

알코올성 및 비-알코올성 지방간염(NAFLD/NASH)의 역행 및 치료를 위한, 100mg, 200mg, 300mg, 400mg 또는 600mg의 피르페니돈(pirfenidone)을 함유하는, 서방정(extended-release tablets) 제형의 약학 조성물의 용도.

청구항 2

진행된 간 섬유증(advanced hepatic fibrosis)의 퇴행(regression)을 위한, 100mg, 200mg, 300mg, 400mg 또는 600mg의 피르페니돈을 함유하는, 서방정 제형의 약학 조성물의 용도.

청구항 3

혈청 콜레스테롤 및 트리글리세라이드 감소에 의한 NAFLD/NASH의 치료를 위한, 100mg, 200mg, 300mg, 400mg 또는 600mg의 피르페니돈을 함유하는, 서방정 제형의 약학 조성물의 용도.

청구항 4

거대지방증(macrosteatosis) 및 미세지방증(microsteatosis) 둘 다의 형태의 간 지방 축적의 함량 감소에 의한, NAFLD/NASH의 치료를 위한, 100mg, 200mg, 300mg, 400mg 또는 600mg의 피르페니돈을 함유하는, 서방정 제형의 약학 조성물의 용도.

청구항 5

퍼옥시좀 증식체 활성화 수용체 감마(proliferator activated receptor gamma, PPAR gamma); 퍼옥시좀 증식 수용체 활성화 알파(peroxisome proliferation receptor activated alpha, PPAR alpha); LXR; 및 CPT-1에 대한 작용제로서 작용하여 과도한 간 지방의 제거 및 염증 감소를 유도하는, 진행된 간 섬유증 및 NAFLD/NASH의 치료를 위한, 피르페니돈을 100mg, 200mg, 300mg, 400mg 또는 600mg 함유하는, 서방정 제형의 약학 조성물의 용도.

청구항 6

간 염증 과정의 유도물질(inducer)인 NFkB 마스터 유전자의 발현 감소를 위한, 100mg, 200mg, 300mg, 400mg 또는 600mg의 피르페니돈을 함유하는, 서방정 제형의 약학 조성물의 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 간 지질 축적 또는 지방증(steatosis)의 감소/제거를 유도하기 위한, 피르페니돈(pirfenidone, PFD-LP)을 함유하는 서방정(extended-release tablets)의 약학 조성물의 용도, 및 진행된(advanced) 비알코올성 지방간 질환/비알코올성 지방간염(nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis; NAFLD/NASH)의 역행에의 이의 치료적 적용에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] *간경변(Cirrhosis)*

[0003] 간경변은 만성 간 손상의 결과인 세포 외 기질(extracellular matrix, ECM) 또는 간질성(interstitial) 흉터의 과도한 축적으로 정의되는 진행된 간 섬유증(advanced liver fibrosis, ALF)의 최종 단계이다.

[0004] 간의 재생 능력 때문에, 간경변은 천천히 진행될 수 있는 병리학적 과정이다. 또한, 유전적 요인 또한 관련되어 있는 과정으로도 알려져 있다.

[0005] 현재 전세계 수백만 명의 환자에게 희망을 제공하는 것으로 보이는 항섬유화(antifibrogenic) 및 예방 요법의 시행을 선두로, 진행된 간 섬유증에 대한 의학적 치료의 변화는 계속 진행 중이다.

[0006] ALF는 간 조직의 비정상적인 리모델링 및 이로 인한 장기 구조의 왜곡을 초래하는 ECM의 합성 증가와 그 구성의 변화를 특징으로 한다. 이는 간 기능의 감소로 이어진다.

[0007] *생리병리학(Physiopathology)*

[0008] 이 질환의 생리병리학은 인터루킨-6(IL-6), 인터루킨-1β(IL-1β) 및 종양 괴사 인자-알파(TNF-α)와 같은 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)의 발현이 증가하는 염증 과정에 의해 주어진다. 상기 염증은 그 중에서도, 슈퍼옥시드 디뮤타아제(superoxide dismutase, SOD) 및 카탈라아제(catalase, CAT)와 같은 항산화 효소의 발현 감소, 및 슈퍼옥시드 음이온, 하이드록시 음이온, 및 과산화수소와 같은 자유 라디칼의 생산 증가로 인한 산화 스트레스가 동반된다. 마찬가지로, 무엇보다도, ECM(세포 외 기질)의 주요 구성 요소인, 1형 콜라겐(COL-1)의 발현 증가를 유도하는 형질전환 성장 인자 베타 1(TGF-β1)에 의해 매개되는 섬유화 과정이 있으며, 또한 간 성상 세포(Hepatic Stellate Cells)의 증식에 유리한 성장 인자가 증가하고, 기질금속단백질 분해효소의 조직 억제제(Tissue Inhibitor of Metalloprotease 1, TIMP-1)에서도 증가한다. 상기 언급한 정보 외에도, ECM 기질금속단백질 분해효소의 발현이 감소한다. 이 모든 것이 ECM의 축적에 유리한 ECM의 합성 및 분해 사이의 불균형을 초래한다.

[0009] *세포 외 기질의 생산*

[0010] ECM의 세포 구성 요소의 정의는 질병에 대한 의학적 치료 분야의 발전을 가능하게 하였다. 간 성상 세포(HSC)는 간경변에서 ECM의 주 원인이다. 이 세포들은 간 동양혈관(sinusoids) 및 간세포 사이의 공간인 디세강(space of Disse)에서 발견된다. 상기 HSC는 비타민 A가 레티노이드의 형태로 저장되는 주요 공간이며, 이 비타민은 정지 표현형(quiescent phenotype)의 HSC를 특징 짓는 비타민이다.

[0011] 그러나, HSC는 화학주성인자 사이토카인(chemoattractant cytokines, chemokines)을 통해 이동할 수 있다. 케모카인(chemokines)으로 작용할 수 있는 다양한 분자들 중에는 PDGF, MCP-1 및 CXCR3가 있다. 최근, PDGF가 이 과정에 참여하는 메커니즘이 기술되었다. 이는 다른 공간으로 끌고 감으로써 그들을 움직이게 하는 다른 세포의 막에서의 확산에 의해 그렇게 하는 것으로 기술되었다.

[0012] *섬유생성(Fibrogenesis)*

[0013] HSC는 ECM 생산의 증가뿐만 아니라, ECM 생산 세포의 증식에 의해서도 섬유증을 발생시킨다. 간 흉터의 주로 연구된 구성 요소는 콜라겐 1형 (COL-1)이다. 무엇의 발현이 전사(transcriptionally) 및 전사-후(post-transcriptionally) 둘 다를 조절하는 자극의 수 및 경로를 증가시키는가. 가장 강력한 자극은 TGF-β1에 의해 관찰되며, 이는 주변분비(paracrine) 및 자가분비(autocrine) 제제 모두에 의해 주어진다. TGF-β1 캐스케이드(cascade) 내의 후속 시그널링(Signaling downstream)은 Smads로 알려진 이기작용성(bifunctional) 분자 군을 포함한다. TGF-β1은 또한 피브로넥틴(fibronectin) 및 프로테오글리칸(proteoglycans)과 같은 ECM의 다른 구성 요소의 생산을 자극한다. TGF-β1의 HSC에 대한 자극은 수소의 과산화 및 C / EBPβ의 의존 메커니즘에 의해 매개된다.

[0014] 지질 과산화(Lipid peroxidation)는 ECM의 생산에 자극을 발생시키는 중요한 산물이다. 이 효과는 HSC의 항산화 능력의 손실에 의해 강화된다.

[0015] 결합 조직 성장 인자(CTGF/CCN2)는 또한 ECM 생산을 위한 HSC 내에서의 중요한 자극으로 간주된다. 이는 또한 고혈당증(hyperglycemia) 및 고인슐린혈증(hyperinsulinemia) 시기에 의해 활성화될 수 있다. CTGF의 자극은 TGF-β1에 의존적인 것으로 간주되어 왔다.

[0016] *수축성(Contractility)*

[0017] HSC의 수축성은 간경변에서의 포털 내성(portal resistance)의 초기 또는 후기 증가의 주된 결정인자가 될 수 있다. 콜라겐 밴드(collagen bands)는 동양혈관의 수축 및 간경변 간 전체의 수축으로 인해 포털 경로에서의 혈액의 정상적인 흐름을 막는다.

[0018] 엔도텔린-1(Endothelin-1) 및 산화질소는 HSC에서의 수축성의 주요 조절 인자이다. 또한 이 목록에는 다른 무엇보다도, 안지오텐시노젠 II(angiotensinogen II), 아이코사노이드(eicosanoids), 심방나트륨이뇨펩티드(atrial natriuretic peptide), 소마토스타틴(somatostatin), 일산화탄소가 포함된다. 세포골격의 α-SMA 단백질의 발현이 증가하며; 이는 HSC에 잠재적인 수축성을 부여한다.

[0019] **직접적인 배경 기술**

[0020] 선진국의 주요 공중 보건 문제는 과체중과 비만이다 [1]. 따라서, 대사증후군과 관련된 비알코올성 지방간 질환/비알코올성 지방간염(nonalcoholic fatty liver disease / nonalcoholic steatohepatitis)(이하 NAFLD/NASH라고 함)과 같은 병리학이 전세계에 걸쳐 유병률(prevalence)이 계속해서 증가하고 있다. 비알코올성 지방간은 앞으로 수십 년 동안의 간 관련 질병률 및 사망률의 주요 원인으로 예측된다.

[0021] 알코올에 의한 지방간의 발병 및 비알코올성 지방간염과 같은 알코올 섭취 이외의 원인에 의해 유발된 것은 간 지방증을 유발하는 트리글리세라이드의 축적에 기초한다. 비정상적인 만성 지질의 저장 후, 두 번째 손상은 염증 반응 및 세포 및 사이토카인의 생성 및 침투에 의해 조직된 염증에 의해 발생한다 [2]. 비알코올성 지방간의 가장 심각한 조직학적 형태는 간경변의 유무에 따라, 염증 세포의 침투 및 간 손상을 특징으로 하는, 비알코올성 지방간염(NASH)이다.

[0022] 서양 국가의 20-30%의 사람들이 비알코올성 지방간으로 고통받고 있는 것으로 추산되며; 이 상태를 발전시키는 경향은 히스패닉 45%, 백인 33% 및 아프리카계 미국인 24%로 나타낼 수 있는 인종-민족 출신과 연관이 있는 것으로 보인다. 정상혈당 및 정상 또는 보통의 체중에서, NAFLD는 당뇨병 및 비만에서 관찰된 것과 유사한 실험실 수준 및 임상 데이터로 특징지어지는 것으로 관찰되었다 [1, 3].

[0023] 최근 연구에 따르면 식이 콜레스테롤 양의 증가는 더 심각한 염증, 간세포 손상 및 섬유증을 유발한다 [4]. 한편, 고-탄수화물 식습관은 증가된 트리글리세라이드 수준에 기여하는 인슐린 수준의 증가와 관련 있다 [5]. 프룩토오스(fructose) 및 수크로오스(sucrose)는 대사 장애의 발달에 특히 중요한 역할을 한다. 또한, 연구는 고-프룩토오스 식습관이 간 염증, NASH 및 확실히 자리잡은 섬유증(established fibrosis)의 발달과 관련이 있음을 보여준다 [6]. 만성적인 과량의 칼로리에 대한 반응으로, 전-염증 축(pro-inflammatory axis)의 주요 참여인자 IL-17의 상향 조절이 관찰되었다. 이러한 사건은 간세포, 내피세포 또는 호중구가 아닌 쿠퍼 세포(Kupffer cells) 및 간 성상 세포(HSC)의 매개체의 방출로 인한 간 손상과 관련이 있다 [7].

[0024] 비만과 관련하여, 지방생성은 호르몬, 지질, 당 대사물질 및 아디포카인(adipokines)뿐만 아니라, 다른 염증성 사이토카인에 의해 복잡한 방식으로 조절된다. 종합하면, 이들 요인들은 간염증을 유발하는 TGF-β1, IL-1β, IL-16와 같은 몇 가지 전염증성 사이토카인의 분비를 촉진하는 NASH의 발병을 악화시킨다 [8]. 또한, IL-17A가 간세포에 의한 C-반응성 단백질(CRP)의 생산을 촉진시키는 것이 관찰되었다 [9]. 최근 연구는 TGF-β1 및 IL-6와 같은 면역조절 사이토카인의 조합은 Th17 세포의 증가된 생산 및 결과적으로 일종의 전염증 피드백 반응을 생성하는 높은 수준의 IL-17A를 유발하는 면역 내성의 상실을 초래하는 조절 T 세포(Treg)의 생성을 억제한다 [10, 11, 12].

[0025] 지방산 산화 및 합성을 조절하는 전사 인자는 항-염증 과정뿐 아니라, 비알코올성 지방 간의 발달에도 관련되어 있다 [13, 14]. 이러한 의미에서, 핵 수용체 PPAR알파, PPAR감마 및 LXR은 간 지방증 및 염증의 개선을 목표로 하는 치료 전략의 주된 타겟을 대표한다. PPAR알파는 CPT1A와 같은 유전자의 발현을 증가시킴으로써 지방산의 산화를 조절하고, 결국 미토콘드리아 내로 지질을 내부화시켜 이들로부터 에너지를 얻는다 [15]. 한편, LXR은 SREBP1과 같은 또 다른 마스터 전사 인자의 발현을 촉진시킴으로써 지방생성의 속도를 증가시키는 능력으로 오랫동안 알려져 왔다 [16].

[0026] 마지막으로, LXR 알파의 활성화가 염증 매개체를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하는 것으로 밝혀졌다 [14, 16].

[0027] ***피르페니돈(Pirfenidone)***

[0028] 피르페니돈은 작은 분자로 구성된 약물로서, 화학명은 5-메틸-1-페닐-2-(1H)피리돈(5-methyl-1-phenyl-2- (1H) pyridine)이다. 이는 분자량 185.23 달톤의 비-펩티드 합성 분자이다. 이의 화학식은 $C_{12}H_{11}NO$이며, 구조는 공지되어 있다. 현재, 피르페니돈은 광범위-스펙트럼 항-섬유화 약물로서 임상 평가 중에 있다. 피르페니돈은 TGF-β1, TNF-α, PDGF의 발현 및 가장 중요하게, 다양한 유형의 콜라겐의 발현을 감소시키는 그의 활성에 반영되는 항-섬유화 및 항-염증 특성을 가진다. 현재, 폐 섬유증(pulmonary fibrosis), 신사구체경화증(renal glomerulosclerosis)에 이은 만성 신부전(chronic renal failure), 간경변 및 유방 구형구축(capsular breast contracture)과 관련하여 인간에 대한 임상 연구가 진행되고 있다. 피르페니돈이 섬유증을 동반한 병변의 점진적인 진행을 감소시키는 것을 보여주는 기초 및 임상 연구 결과물이 이미 출판되거나 출판 중에 있다. 가장 중요한 것은, 피르페니돈이 세포 및 분자 기능을 안전하고 무독성 방식으로 수행한다는 것이다. 한편, 피르페니돈은 예를 들어, 간, 피부, 신장 등과 같은, 특정 장기에 손상을 입은 후 섬유증 병변(fibrotic lesions)의 형성을 예방하는 것으로 알려져 있다.

[0029] 피르페니돈이 치료 효과를 수행하는 메커니즘 중 하나는 여러 가지 사이토카인의 작용 조절인 것으로 알려져 있다. 피르페니돈은 섬유형성 사이토카인(fibrogenic cytokines) 및 TNF-α의 강력한 억제제이다.

[0030] 서방성 피르페니돈(PFD-LP)의 새로운 분자적 작용 메커니즘이 발견되었으며, 이는 상기 화합물이 본 발명의 목적인, 알코올성 및 비-알코올성 둘 다의, 지방간염의 유해한 효과를 감소시키는 데 활성이 있음을 보여준다.

발명의 내용

[0031] 본 발명의 목적은 알코올성 및 비-알코올성 지방간염(NAFLD/NASH)의 역행 및 치료를 위한, 100mg, 200mg, 300mg, 400mg 또는 600mg의 피르페니돈(pirfenidone)을 함유하는, 서방정(extended-release tablets) 제형의 약학 조성물의 용도이다.

[0032] 본 발명의 다른 목적은 진행된 간 섬유증(advanced hepatic fibrosis)의 퇴행(regression)을 위한, 서방정 제형의 약학 조성물의 용도이다.

[0033] 본 발명의 또 다른 추가적인 목적은 혈청 콜레스테롤 및 트리글리세라이드 감소를 통해 발생하는, NAFLD/NASH의 퇴행을 위한, 서방정 제형의 약학 조성물의 용도이다.

[0034] 본 발명의 또 다른 추가적인 목적은 거대지방증(macrosteatosis) 및 미세지방증(microsteatosis) 둘 다의 형태의 간 지방 축적의 함량 감소에 의해 발생하는, NAFLD/NASH의 퇴행 및 치료를 위한, 서방정 제형의 약학 조성물의 용도이다.

[0035] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 진행된 간 섬유증 및 NAFLD/NASH의 역행 및 치료를 위한 서방성 약학 조성물에서의 피르페니돈의 용도로, 이의 치료 효과는 퍼옥시좀 증식체 활성화 수용체 감마(proliferator activated receptor gamma, PPAR gamma); 퍼옥시좀 증식 수용체 활성화 알파(peroxisome proliferation receptor activated alpha, PPAR alpha); LXR; 및 CPT-1에 대한 작용제로서 작용하는 피르페니돈에 기인한다. 이러한 작용과 함께, 피르페니돈-LP는 간 염증 과정의 유도물질인, NFkB 마스터 유전자의 발현 감소를 유도한다.

[0036] 본 발명은 전술한 목적들로 예시되나, 이에 한정되는 것은 아니며; 진행된 간 섬유증, 및 알코올성 및 비-알코올성 지방간염(NAFLD/NASH)의 치료 또는 퇴행을 위하여, 피르페니돈을 포함하는 서방정 제형의 약학 조성물이 현재 기술 수준에 이미 개시되어 있는 피르페니돈의 간독성 효과의 감소에 유리함을 입증한다.

도면의 간단한 설명

[0037] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 첨부된 청구범위 및 첨부 도면의 목적 및 바람직한 구현 예에 대한 하기의 상세한 설명으로부터 명백할 것이며, 여기서:

도 1(A-D)은 마우스의 체중, 글루코오스 수준 및 ALT 및 AST 간 효소 수준을 도시한다.

도 2는 대조군 HF 및 PFD-LP로 처리된 마우스의 간 조직의 조직학적 검사를 도시한다.

도 3(A-F)은 각각의 제시된 군에 포함된 마우스의 혈청 내의 전염증성 사이토카인의 분석을 도시한다.

도 4는 전섬유화(profibrogenic) 및 전염증성 마커 유전자의 발현을 도시한다.

도 5는 NAFLD/NASH에서 지방 대사의 매개체의 단백질 발현을 나타내는 웨스턴 블랏을 도시하며, 핵심 대사 전사 인자(metabolic transcription factors)인 LXR 및 PPAR알파가 간 조직 내에서 평가되었다.

도 6은 PPAR감마 및 NFkB와 같은, 간 내 염증 과정 조절에서의 핵심 전사 인자의 단백질 발현을 나타내는 웨스턴 블랏을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] **실험에 사용된 동물**

[0039] 6-8주된 마우스인 수컷 C57BL / 6NHsd (Harlan, Mexico City)을 12시간의 명/암 사이클에서 22 ± 2℃의 대기중에 보관하였다. 5-7 마리의 마우스를 16주 동안 표준 음식(Chow) 식단(대조군) 또는 고-지방/고탄수화물(HF) 식단에 무작위로 배정하였다. 대조군은 Harlan TM-2018 (18%의 지방질 칼로리) 식단을 받고 순수한 물을 자유롭게 섭취한 반면, HF 군은 Harlan 식단 TD-06414 (60%의 지질 칼로리)을 받고 42g/L의 농도 (프룩토오스 55% 및 수크로오스 45%)로 농축된 고-프룩토오스 포함 물을 자유롭게 섭취하였다. PFD 마우스 군 (HF+PFD)은 8주 동안 HF 식단을 받은 후 8주 동안 HF 식단을 받고 PFD 서방성 제형을 100mg/kg/day로 받았다. 모든 식이 요법은 0.1

ml의 비히클을 받았다. 하룻밤의 금식 후, 혈액 샘플을 분석하였다. 마우스의 무게 및 글루코오스는 시작부터 희생(sacrifice)까지 매주 기록되었다.

[0040] **체중, 혈당, 콜레스테롤, 트리글리세라이드, VLDL 콜레스테롤 및 아미노기전이효소(AMINOTRANSFERASES)**

[0041] 고-지방 식단(HF)에 의해 유도된 지방간염(NASH/NAFLD)에 걸린 마우스의 특징을 도 1A-1D에 나타내었다. 가장 크게 무게가 증가한 (대조군 대비 37%까지) HF 군 및 HF 군에 비하여 11% 낮은 무게를 가진 HF+PFD-LP 군 사이의 마우스들에게 유의한 차이가 관찰되었다 (도 1A). 혈당과 관련하여, 대조군에 비하여 더 높은 혈청 글루코오스 수준이 HF 군에서 관찰되었으며, 9주 내지 13주에 유의한 차이가 있었다. 그러나, 치료 마지막 5주 동안, HF+PFD-LP 대 대조군 사이에 유의한 차이는 없었다 (도 1B). 또한 HF-PFD 또는 대조군에 비하여 더 높은 AST (도 1C), ALT (도 1D), 및 콜레스테롤, 트리글리세라이드 및 VLDL-콜레스테롤 (표 1)의 혈청 수준이 HF 군에서 발견되었다.

표 1

[0042]

콜레스테롤, 트리글리세라이드 및 VLDL-콜레스테롤의 혈청 내 측정

	대조군	HF	HF+PFD
콜레스테롤 (mg/dl)	78 ± 22 (10)	153 ± 27 (10)[a]	120 ± 24 (8)
트리글리세라이드 (mg/dl)	128 ± 28 (10)	212 ± 44 (10)[a]	127 ± 38 (8)[b]
VLDL (mg/dl)	30 ± 6 (10)	34 ± 7 (10)	25 ± 8 (8)

상기 값들은 평균 ± 표준 편차이다. 마우스의 수는 괄호 안에 표시된다.

[a] 대조군 대비 $P < 0.05$

[b] HF 대비 $P < 0.05$

[0043] **조직학(HISTOLOGY)**

[0044] HF 군의 간 조직의 조직학적 검사에서 염증성 변화가 있는 실질적인 미세수포성 지방증(microvesicular steatosis) 및 거대수포성 지방증(macrovesicular steatosis)이 나타났다 (도 2). HF 군에서의 지방증은 주로 거대수포성이었으며 심각한 미세수포성 지방증을 동반한 선포 부분(acinar zone) 1 및 선포 부분 2에서의 거대수포성 지방증이 심각하였다. 심각한 미세수포성 지방증의 증가는 선포 부분 3 및 그 영역 내 간세포에서의 적당한 벌룬(balloon) 변성(degeneration)에서 발견되었으며; 염증은 주로 호중구 및 단핵구 세포 문맥주위(periportal)에서 나타났으며, 이는 또한 1점(0 내지 4)의 문맥주위 섬유증으로 나타났고, 이러한 조직학적 변화는 간 섬유증의 1C 단계 및 3 등급의 NAFLD와 양립할 수 있다. PFD-LP는 간 지방 함량을 현저히 감소시켰다. 이러한 결과는 총 간장 관찰(gross hepatic observation)과 관련이 있다. 중심 및 말초 지방과 관련하여, HF+PFD-LP는 HF 군에 비하여 낮은 지방 수준을 보였다.

[0045] **혈청 내 사이토카인 분석**

[0046] 상기 조직학적 결과를 침투성(systemic) 마커와 연관시키기 위하여, 혈청 IL-17A, IL-6, IL-1β, IFN-γ 및 TNF-α의 전-염증성 사이토카인을 분석하였다. HF 군(211 ± 30 ng/ml)에 비하여 HF+PFD 군(145.8 ± 15.0 ng/ml)에서 혈청 IL-6 수준 (도 3A)이 유의하게 감소하였다. IL-1β의 혈청 수준 (도 3B)은 HF 군(177.4 ± 20.6 ng/ml)에 비하여 HF+PFD 군(69.3 ± 13 ng/ml)에서 유의하게 감소를 나타냈다. IFN-γ은 도 3C에 나타내었으며, HF 군(221.3 ± 50 ng/ml)에 비하여 PFD-LP 군(18.2 ± 8 ng/ml)에서 유의하게 낮았다. 유사하게, TNF-α (도 3D)는 HF 군(254.6 ± 70 ng/ml)에 비하여 HF+PFD 군(32.9 ± 21.1 ng/ml)에서 혈청 수준에서의 유의한 감소를 보였다. 언급할만한 부분으로, IL-17A (도 3F)의 수준은, IL-17A의 혈청 수준의 유의한 증가(1983.5 ± 400 ng/ml)를 나타낸 HF 군에 비하여, PFD-LP로 처리한 마우스(271.1 ± 149.6)에서 유의한 감소를 보였다. HF 군에서 분석된 모든 사이토카인은 대조군에 비하여 매우 상당한 증가를 나타냈다. 마지막으로, 항-염증성 사이토카인 IL-10의 혈청 수준 (도 3E)은 HF 군(15.4 ± 9.1 ng/ml)에 비하여 HF+PFD 군(37.8 ± 10.4 ng/ml)에서 유의하게 높은 것으로 관찰되었다.

[0047] **전섬유생성(PROFIBROGENIC) 및 전염증성(PROINFLAMMATORY) 마커 유전자의 발현**

[0048] 간 메신저 RNA의 수준은 PFD-LP+HF 군에서 TGF-β1의 발현 감소, 및 COL1A1 및 TNF-α의 유의한 하향-조절을 나타내었다. 또한, HF 군과 비교하여 유전자 CD11b 및 MCP1의 발현의 유의한 감소가 관찰되었다 (도 4).

[0049] **PFD-LP는 간 지방 대사의 매개체를 조절한다.**

[0050] NAFLD/NASH에서 지방 대사 매개체의 조절에 대한 PFD의 영향을 분석하기 위하여, 핵심 대사 전사 인자 LXR 및 PPAR알파를 간 조직 내에서 평가하였다. 도 5에 도시된 바와 같이, 대조군 (각각 2,634 ± 1,042 및 3,890 ± 1,130) 및 HF 군 (각각 3375 ± 898 및 7308 ± 1117)에 비하여 PFD+HF 군에서 LXR (8082 ± 847) 및 PPAR알파 (11506 ± 1167)의 단백질 수준이 유의하게 증가하였다. LXR 및 PPAR이 각각 타겟으로 하는 SREBP1 및 CPT1A와 같은 핵심 단백질에 대한 PFD-LP의 영향을 더 잘 이해하기 위하여, 이들 또한 평가하였다. 도 5에 도시된 바와 같이, 대조군 (785 ± 396) 및 HF 군 (2,622 ± 1,161)에 비하여 PFD-LP는 전구 단백질 SREBP1의 증가(6057 ± 847)를 유도하였다. 그러나, 절단된 형태(활성 형태)의 SREBP1은 감소하는 경향을 보였으나, 세 군 (4567 ± 1620), HF (1776 ± 893) 및 PFD + HF (1638 ± 303) 사이에서 유의한 차이는 발견되지 않았다. 또한, 대조군 (4303 ± 820) 및 HF 군 (6.172 ± 1.356)과 비교하여, PFD+HF 군(9303 ± 809)에서 CPT1A 발현(미토콘드리아 내 간 지방을 내부화하여 “불타게(burned)” 하는 원인이 되는 효소)의 유의한 증가가 관찰되었다.

[0051] 마지막으로, 도 6은 PPAR감마 및 NFkB와 같은 간 내 염증 과정 조절에서의 핵심 전사 인자가 간 염증의 감소를 초래하는 방식으로 특이적으로 조절됨을 보여준다.

[0052] **참고문헌**

[0053] 1. Marra F, Lotersztajn S. Pathophysiology of NASH: perspectives for a targeted treatment. Curr Pharm Des 2013;19(29):5250-5269.

[0054] 2. Ferramosca A, Vincenzo Zara. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. World J Gastroenterol 2014;20(7):1746-1755

[0055] 3. Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. Hippokratia 2009;13(1):9-19.

[0056] 4. Van Rooyen DM, Larter CZ, Haigh WG, Yeh MM, Ioannou G, Kuver R, et. al. Hepatic free cholesterol accumulates in obese, diabetic mice and causes nonalcoholic steatohepatitis. Gastroenterology 2011;141:1393-403.

[0057] 5. Kang H, Greenson JK, Omo JT, Guillot C, Peterman D, Anderson L, et. al. Metabolic syndrome is associated with greater histologic severity, higher carbohydrate, and lower fat diet in patients with NAFLD. Am J Gastroenterol 2006;101:2247-53.

[0058] 6. Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2010;7:251-64.

[0059] 7. Harley IT, Stankiewicz TE, Giles DA, Softic S, Flick LM, Cappelletti M, et al. IL-17 signaling accelerates the progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice. Hepatology. 2014;59(5):1830-9.

[0060] 8. Zuniga LA, Shen W-J, Joyce-Shaikh B, Pyatnova EA, Richards AG, Thom C, et al. IL-17 Regulates Adipogenesis, Glucose Homeostasis, and Obesity. J Immunol. 2010 Dec 1;185(11):6947-59. Lafdil F, Miller AM, Ki SH, Gao B. Th17 cells and their associated cytokines in liver diseases. Cell Mol Immunol 2010;7(4):250-254.

[0061] 9. Weaver CT, Hatton RD. Interplay between the TH17 and Treg cell lineages: a co-evolutionary perspective. Nat Rev Immunol 2009;9:883-9.

[0062] 10. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. Annu Rev Immunol 2009;27:485-517.

[0063] 11. Tang Y, Bian Z, Zhao L, Liu Y, Liang S, Wang Q, et. al. Interleukin-17 exacerbates hepatic steatosis and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. Clin Exp Immunol 2011;166(2):281-90.

[0064] 12. Wang Y-X. PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. Cell Res. 2010;20(2):124-37.

[0065] 13. Yan Xing, Tingting Zhao, Xiaoyan Gao, Yuzhang Wu. Liver X receptor α is assential for the capillarization of liver sinusoidal endothelial cells in liver injury.

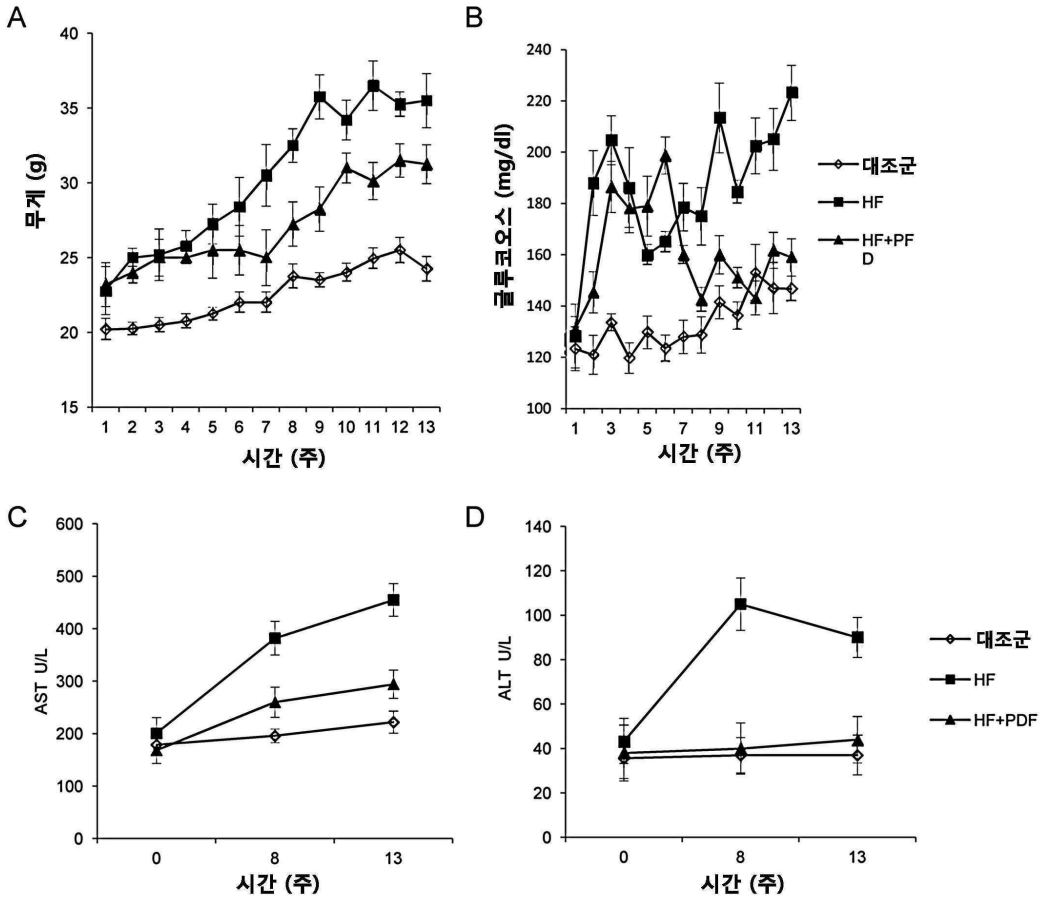
[0066] 14. Yoshikawa T, Ide T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, et al. Cross-Talk between Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) α and Liver X Receptor (LXR) in Nutritional Regulation of Fatty Acid Metabolism. I. PPARs Suppress Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c Promoter through Inhibition of LXR Signaling. Mol Endocrinol. 2003;17(7):1240-54.

[0067] 15. Cui G, Qin X, Wu L, Zhang Y, Sheng X, Yu Q, Sheng H, Xi B, Zhang JZ, Zang YQ. Liver X receptor (LXR) mediates negative regulation of mouse and human Th17 differentiation. J Clin Invest. 2011;121(2):658-670.

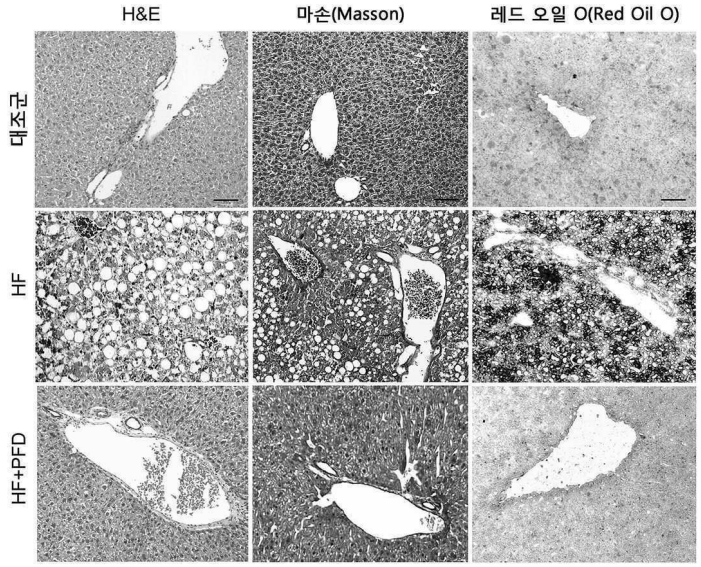
[0068] 16. Ducheix S, Montagner A, Polizzi A, Lasserre F, Marmugi A, Bertrand-Michel J, et al. Essential fatty acids deficiency promotes lipogenic gene expression and hepatic steatosis through the liver X receptor. J Hepatol. 2013;58(5):984-92.

도면

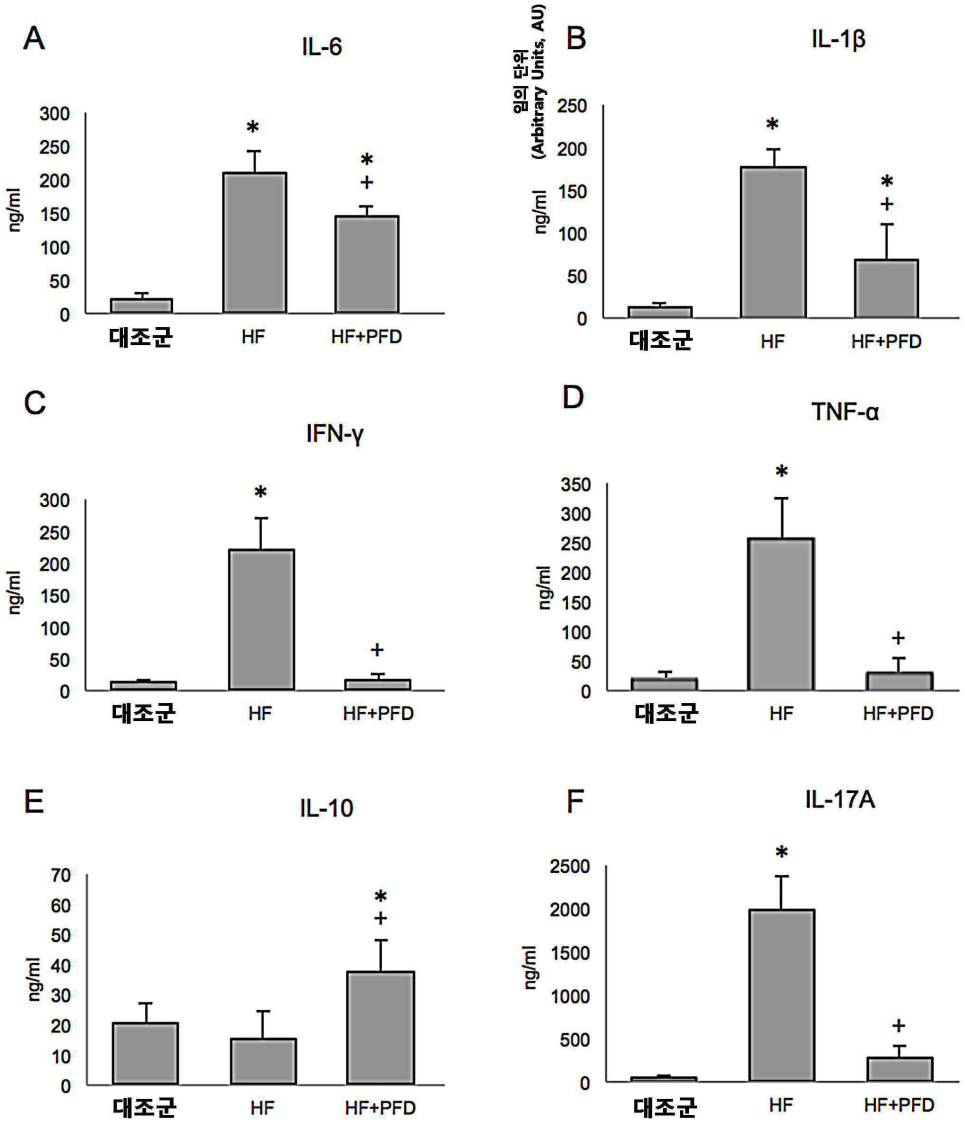
도면1



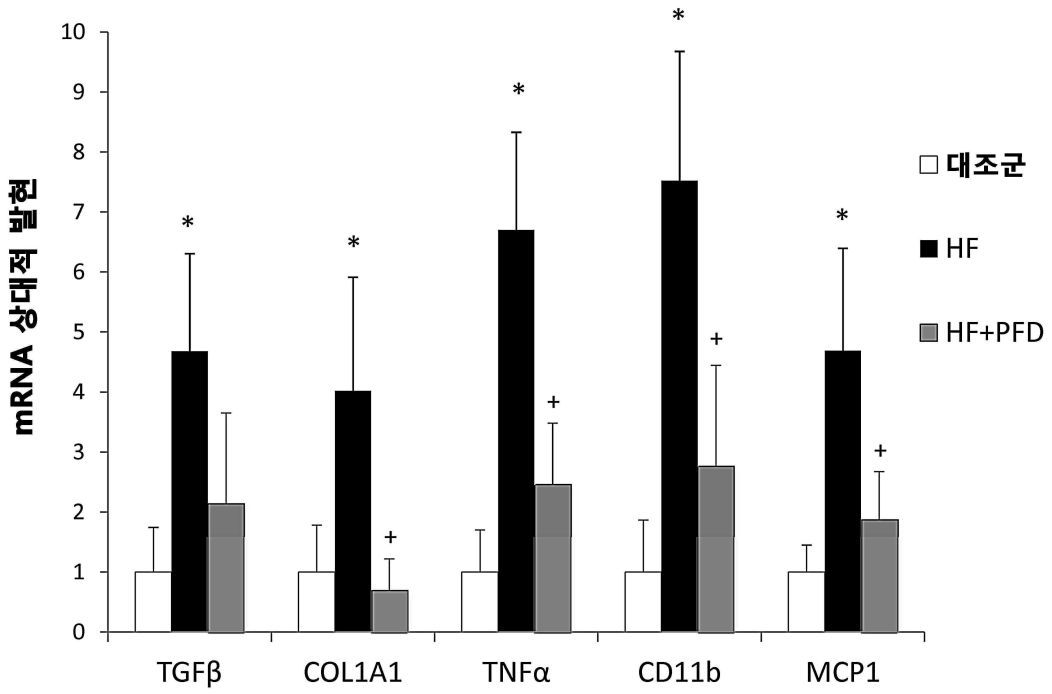
도면2



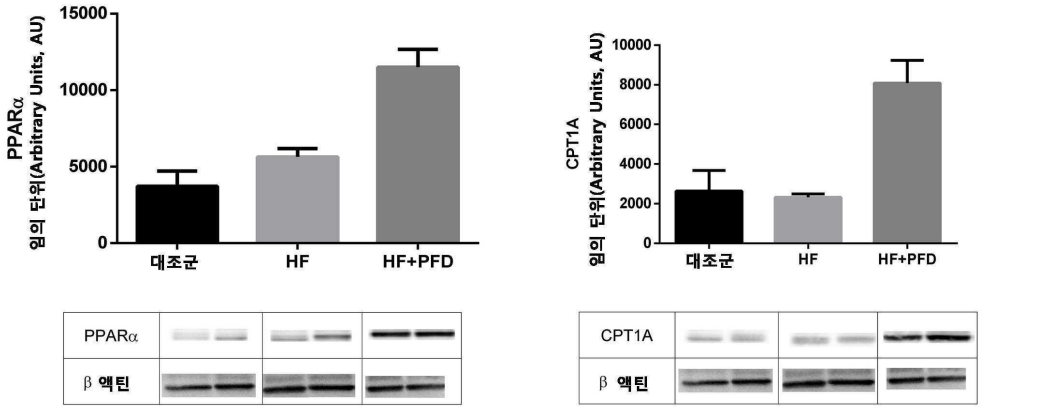
도면3

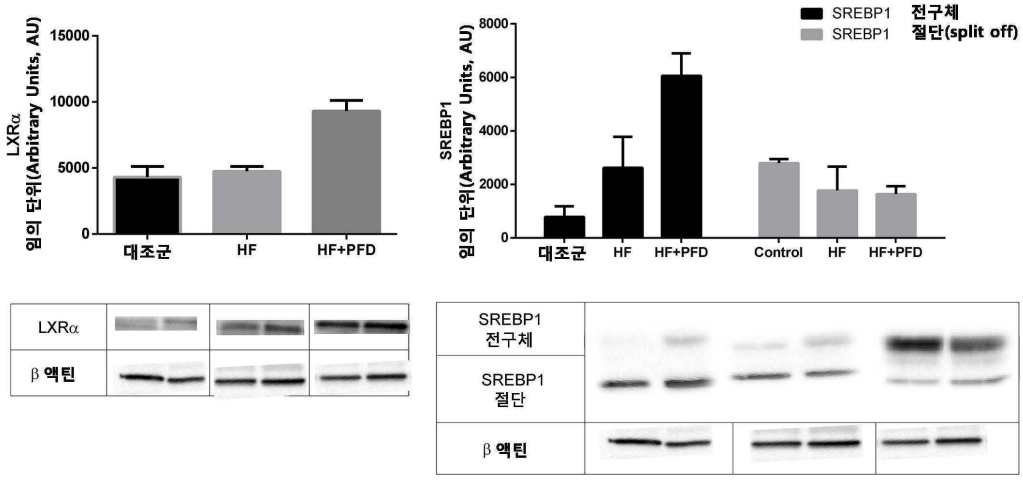

A
IL-6
ng/ml
300
250
200
150
100
50
0
대조군
HF
HF+PFD
B
IL-1β
임의 단위 (Arbitrary Units, AU)
ng/ml
250
200
150
100
50
0
대조군
HF
HF+PFD
C
IFN-γ
ng/ml
300
250
200
150
100
50
0
대조군
HF
HF+PFD
D
TNF-α
ng/ml
350
300
250
200
150
100
50
0
대조군
HF
HF+PFD
E
IL-10
ng/ml
70
60
50
40
30
20
10
0
대조군
HF
HF+PFD
F
IL-17A
ng/ml
2500
2000
1500
1000
500
0
대조군
HF
HF+PFD

도면4

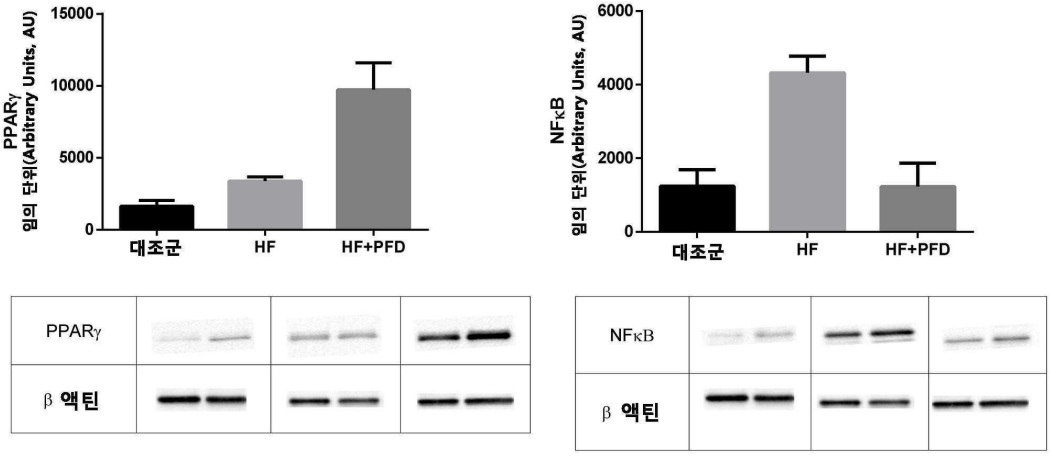

mRNA 상대적 발현
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
*
+
TGFβ
COL1A1
TNFα
CD11b
MCP1
대조군
HF
HF+PFD

도면5


PPARα
임의 단위(Arbitrary Units, AU)
15000
10000
5000
0
대조군
HF
HF+PFD
CPT1A
임의 단위(Arbitrary Units, AU)
10000
8000
6000
4000
2000
0
대조군
HF
HF+PFD
PPARα
β 액틴
CPT1A
β 액틴


LXRα
임의 단위(Arbitrary Units, AU)
15000
10000
5000
0
대조군
HF
HF+PFD
SREBP1
임의 단위(Arbitrary Units, AU)
8000
6000
4000
2000
0
SREBP1 전구체
SREBP1 절단(split off)
대조군
HF
HF+PFD
Control
HF
HF+PFD
LXRα
β 액틴
SREBP1 전구체
SREBP1 절단
β 액틴

도면6


PPARγ
임의 단위(Arbitrary Units, AU)
15000
10000
5000
0
대조군
HF
HF+PFD
NFκB
임의 단위(Arbitrary Units, AU)
6000
4000
2000
0
대조군
HF
HF+PFD
PPARγ
β 액틴
NFκB
β 액틴