



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0003992
(43) 공개일자 2017년01월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/575 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 31/575 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7034777

(22) 출원일자(국제) 2015년06월26일
심사청구일자 2016년12월12일

(85) 번역문제출일자 2016년12월12일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2015/001646

(87) 국제공개번호 WO 2015/198150
국제공개일자 2015년12월30일

(30) 우선권주장
62/017,891 2014년06월27일 미국(US)

(71) 출원인
(주)메디톡스
충청북도 청주시 청원구 오창읍 각리1길 78

(72) 발명자
정현호
서울특별시 성동구 서울숲2길 32-14, 한화 갤러리아 포레아파트 101동 2402호

양기혁
충청남도 서북구 불당11로 82, 대원 칸타빌 아파트 603동904호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
리엔목특허법인

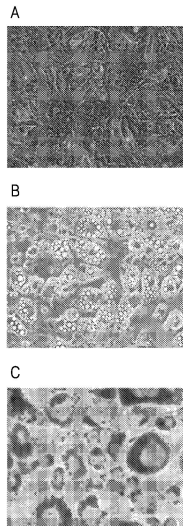
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **지방 감소를 위한 담즙산 및 염의 방법 및 조성물**

(57) 요약

본 발명은 대상에서 지방 침적을 치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 지방 침적의 감소를 필요로 하는 대상에게 유효량의 약제학적으로 허용가능한 제제 중 지방-용해 농도의 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상을 투여하는 단계를 포함하는, 지방 침적을 감소시키기 위한 비수술적 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/0019 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

이준호

경기도 수원시 장안구 화산로 263, 102동 101호

조수진

충청북도 청주시 청원구 오창읍 오창중앙로 65,
612동 1701호

명세서

청구범위

청구항 1

대상에서 국소화된 지방 침적 (localized fat deposit)을 비수술적으로 제거하기 위한 제제로서, 상기 제제는 9 미만의 pH를 갖는 약제학적으로 허용가능한 제제 중 지방-용해 농도의 콜레이트 (cholate) 및 케노데옥시콜레이트 (chenodeoxycholate) 중 하나 이상을 포함하는 제제.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 제제는 8 미만의 pH를 갖는 것인, 대상에서 국소화된 지방 침적을 비수술적으로 제거하기 위한 제제.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 제제는 7.5 미만의 pH를 갖는 것인, 대상에서 국소화된 지방 침적을 비수술적으로 제거하기 위한 제제.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 제제는 약 0.5% 내지 약 4.0%의 농도를 갖는 것인, 대상에서 국소화된 지방 침적을 비수술적으로 제거하기 위한 제제.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 제제는 약 0.5% 내지 약 2.0%의 농도를 갖는 것인, 대상에서 국소화된 지방 침적을 비수술적으로 제거하기 위한 제제.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 항염증제, 진통제, 분산제, 투과 증강제 및 그 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가적인 활성 성분을 더 포함하는 것인 제제.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 항미생물제, 항혈전제, 항응집제, 거품-억제제, 항염증제, 마취제, 진통제, 스테로이드, 진정제, 항분산제, 근육 이완제 및 그 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 치료제를 더 포함하는 것인 제제.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 제제는 주사가 가능한 제제인 것인 제제.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 제제는 지방용해 주사 제제인 것인 제제.

청구항 10

청구항 1에 따른 제제를 투여하는 단계를 포함하는 국소화된 지방 축적 (localized fat accumulation)을 갖는 대상에서 국소화된 지방 침적을 비수술적으로 제거하기 위한 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 제제는 항염증제, 진통제, 분산제, 투과 증강제 및 그 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 추가적인 활성 성분을 더 포함하는 것인 방법.

청구항 12

청구항 10에 있어서, 상기 제제는 항미생물제, 항혈전제, 항응집제, 거품-억제제, 항염증제, 마취제, 진통제, 스테로이드, 진정제, 항분산제, 근육 이완제 및 그 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 치료제를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 13

청구항 10에 있어서, 상기 투여하는 단계는 피하 주사를 포함하는 것인 방법.

청구항 14

청구항 10에 있어서, 상기 국소화된 지방 축적은 하안검 지방 헤르니아 (lower eyelid fat herniation), 지방종 (lipomas), 지방이상증 (lipodystrophy), 셀룰라이트 관련성 지방 축적 (fat deposits associated with cellulite), 및 그 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 15

청구항 10에 있어서, 상기 지방 침적은 눈 밑, 턱 밑, 팔 밑, 엉덩이, 종아리, 등, 넓적다리, 발목, 위 및 그 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 대상의 부위에 국소화되는 방법.

청구항 16

청구항 10에 있어서, 상기 제제는 주사가 가능한 제제인 것인 방법.

청구항 17

청구항 10에 있어서, 상기 제제는 지방용해 주사 제제인 것인 방법.

청구항 18

(a) 9 미만의 pH를 갖는 약제학적으로 허용가능한 제제 중 지방-용해 농도의 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상을 포함하는 대상에서 국소화된 지방 침적을 비수술적으로 제거하기 위한 제제를 포함하는 제1 용기; 및 (b) 수술을 사용하지 않고 대상에서 지방 침적을 감소시키기 위한 상기 제제를 사용하기 위한 설명서 (written description)를 포함하는 키트.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 제제는 주사가 가능한 제제인 것인 키트.

청구항 20

청구항 18에 있어서, 상기 제제는 지방용해 주사 제제인 것인 키트.

청구항 21

청구항 18에 있어서, 상기 제1 용기는: 항미생물제, 항혈전제, 항응집제, 거품-억제제, 항염증제, 마취제, 진통제, 스테로이드, 진정제, 항분산제, 근육 이완제 및 그 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 치료제를 포함하는 것인 키트.

청구항 22

청구항 18에 있어서, 제2 용기를 더 포함하며, 상기 제2 용기는: 항미생물제, 항혈전제, 항응집제, 거품-억제제, 항염증제, 마취제, 진통제, 스테로이드, 진정제, 항분산제, 근육 이완제 및 그 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 제2 치료제를 포함하는 것인 키트.

발명의 설명

배경 기술

지방흡입술 (liposuction)은, 지방성형술 (lipoplasty), 지방조각 흡입 절제술 (liposculpture suction lipectomy 또는 단순히 lipo)로도 알려져 있는 바, 인체의 많은 다양한 부위로부터 지방을 제거하는 미용 외과

[0001]

수술이다. 수술 부위는 복부, 허벅지 및 엉덩이로부터, 목, 팔 뒤쪽 부위 등에 이르기까지 다양하다.

- [0002] 1회 수술에 의해서 안전하게 제거될 수 있는 지방의 양은 몇몇 인자들에 의해서 제한된다. 너무 과도한 양의 지방을 제거하는 데에는 부정적 측면이 있다. "과다-흡입된 (over-suctioned)" 환자에게서는 피부에서 비정상적인 응어리(lumpiness) 및/또는 홈 (dents)이 관찰될 수 있다. 더 많은 양의 지방이 제거될수록, 더 높은 수술 위험성이 초래된다.
- [0003] 주사 지방용해술 (injection lipolysis)은 지방 세포를 파괴하기 위한 목적으로 약물 혼합물을 환자에 주사하는 미용 기술이다. 일반적으로 포스파티딜콜린 (phosphatidylcholine, PPC) 및 데옥시콜레이트 (deoxycholate, DCA) 기반의 약물을 사용하는 이 기술은, 혈액 질환을 치료하기 위해서 상기 약물 제제를 초기 정맥주사로 사용하는 것으로부터 비롯되었다.
- [0004] PPC는 헤드 기로서 콜린이 도입된 인지질류이다. 이는 생물학적 막의 주요 성분이며, 난황 또는 대두와 같은 용이하게 이용가능한 다양한 기원으로부터 손쉽게 획득할 수 있고, PPC는 상기 기원으로부터 핵산을 사용하여 기계적 또는 화학적으로 추출된다. PPC는 지방 축적을 방지하고, 지방간에 의해서 유도되는 간 기능상실 (liver failure), 심근허혈 (myocardial ischemia), 뇌혈관 질환, 및 치매를 치료하는데 사용된다. 또한, PPC는 최근에는 미국, 유럽, 및 세계 다른 나라들에서 비만 치료를 위한 지방용해를 위하여 도입되었다.
- [0005] DCA는 장 박테리아의 대사 부산물인 2차 담즙염 (bile salts) 중 하나이다. DCA는 그 발견 이래로 인간 의학의 다양한 분야에서 사용되어 왔으며, 지방용해 주사에 있어서는 PPC와 함께 혼합되어 공동연하게 사용된다. DCA는 PPC 및, 더욱 최근에는 암포테리신 B, 탁솔, 및 디아제팜과 같은 약제들의 수용성을 향상시키기 위해서 사용되어 왔다. 고도로 정제된 PPC는 DCA, 향미생물제, 벤질 알코올, 및 물과 조합되어 급속 멸균되어 정맥 투여를 위하여 사용할 수 있는 안정하고 혼합된 미셀 제제를 형성할 수 있다.
- [0006] 1966년에는, 연구자들이 PPC-함유 용액을 정맥 투입함으로써 지방 색전 (fat emboli)을 제거할 수 있다는 사실을 밝혔다. 이후, 5% PPC 및 4.75% DCA를 함유하는 Lipostabil®로 불리는 약물 제제가 독일에서 승인되어 지방 색전증, 이상지질혈증 (dyslipidemia), 및 알코올-유도된 간경변 (alcohol-induced liver cirrhosis)의 치료에 사용되었다.
- [0007] 계면활성제 중에서, 담즙염은 지방 이중막의 특히 강력한 용해제 (solubilizer)이다. 모든 생물학적 세포 막은 동일한 이중 지질층 구조 (bi-lipid layer structure)로 이루어져 있으며, 따라서 계면활성제에 의해서 가용화 (solubilization) 된다. 계면활성제에 의한 세포 막의 가용화는, 지질 이중층 사이에 상기 계면활성제의 분배, 이중층의 탈안정화, 붕해 및, 이어서, 혼합된 미셀 (계면활성제 및 세포막 지질로 구성됨)의 형성을 포함한다. 담즙염, 및 다른 계면활성제는 비혼화성 물질 (immiscible materials)의 경계에서 표면 장력을 감소시키고, 큰 응집물들을 더 작은 입자들로 파괴되도록 한다. 조직에서는, 이러한 작용제는 세포막을 용해시키고, 세포 용해 (cell lysis)를 야기한다. 염증 반응은 세포 용해에 의해서 발생되며, 신체로 하여금 계면활성제 용해된 물질을 제거하도록 한다.
- [0008] 최근에는, 미국에 위치한 사유 기업인 Kythera Biopharmaceuticals가 PPC를 포함하지 않는 DCA를 사용한 지방용해 주사를 개발하고 있다. PPC가 DCA 중에서 유화제 (emulsifier)로서 기능하고 고지혈증의 치료에 사용된다는 것에 근거하여, PPC는 지방용해 주사 중 활성 성분으로서 간주되어 왔다. 이러한 선행기술 조성물 중에서, DCA와 같은 계면활성제는 활성 성분으로 간주되는 PPC를 분산 또는 용해시키기 위해서 단순히 첨가되었다. 그러나, 실제로는 DCA가 국소화된 지방 유화에 있어서 활성 성분이라는 점이 밝혀졌다.
- [0009] DCA가 담즙염 계열에 있어서 강한 계면활성제 중 하나이기 때문에, PPC 및 DCA 또는 DCA 단독에 의한 치료는 원치 않는 해로운 결과를 야기할 수 있다.
- [0010] DCA를 투여하게 되면, 주사 부위로부터 주변 조직이 파괴되는 현상이 초래된다. 또한, DCA를 사용한 신체 지방 제거는 통증, 화상 감각 (burning sensation), 저림, 멍, 부종, 부기, 색소 침착, 및 경화를 포함하는 심각한 유해 사례와 관련되어 있다. 더 나아가, 기존 연구진들은 DCA 노출 이후에 유방 또는 대장암의 위험성이 증가한다는 점을 제시하고 있다.
- [0011] 일부 성공적 측면도 존재하지만, 종래 기술들 및 조성물들은 소정 한계가 있다. 따라서, 외과수술 또는 지연된 회복 시간을 필요로 하지 않고, 현재 이용가능한 방법에 비해서 더 적은 유해 부작용을 갖는 국소화된 지방 축적을 감소시키는 방법을 갖는 것이 바람직할 것이다. 본 발명은 이러한 요구사항을 충족시킨다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 대상에서 국소화된 지방 침적 (fat deposit)을 비수술적으로 제거하기 위한 제제를 제공한다. 일 구현예에서, 상기 제제는 9 미만의 pH를 갖는 약제학적으로 허용가능한 제제 중 지방-용해 농도의 콜레이트 (cholate) 및 케노데옥시콜레이트 (chenodeoxycholate) 중 하나 이상을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 제제는 8 미만의 pH를 갖는다. 다른 구현예에서, 상기 제제는 7.5 미만의 pH를 갖는다.
- [0013] 일 구현예에서, 상기 제제는 지방-용해 농도의 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상을 약 0.5% 내지 약 4.0%의 농도로 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 농도는 약 0.5% 내지 약 2.0%이다.
- [0014] 일 구현예에서, 상기 제제는, 항염증제, 진통제, 분산제 및 투과 증강제로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가적인 활성 성분을 더 포함한다.
- [0015] 일 구현예에서, 상기 제제는 항미생물제, 항혈전제, 항응집제, 거품-억제제, 항염증제, 마취제, 진통제, 스테로이드, 진정제, 항분산제, 및 근육 이완제로 이루어진 군으로부터 선택된 치료제를 더 포함한다.
- [0016] 일 구현예에서, 상기 제제는 주사가능한 제제이다. 다른 구현예에서, 상기 제제는 지방용해 주사 제제이다.
- [0017] 본 발명은 또한 국소화된 지방 축적 (fat accumulation)을 갖는 환자에서 국소화된 지방 침적을 비수술적으로 제거하기 위한 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 상기 방법은 9 미만의 pH를 갖는 약제학적으로 허용가능한 제제 중 지방-용해 농도의 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상을 포함하는 제제를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0018] 일 구현예에서, 상기 투여 단계는 피하 주사를 포함한다.
- [0019] 일 구현예에서, 상기 국소화된 지방 축적은 하안검 지방 헤르니아 (lower eyelid fat herniation), 지방종 (lipomas), 지방이상증 (lipodystrophy), 및 셀룰라이트 관련성 지방 축적 (fat deposits associated with cellulite)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0020] 일 구현예에서, 상기 지방 침적은 상기 대상의 눈 밑, 턱 밑, 팔 밑, 엉덩이, 종아리, 등, 넓적다리, 발목, 또는 위에 국소화되어 있다.
- [0021] 본 발명은 또한: (a) 9 미만의 pH를 갖는 약제학적으로 허용가능한 제제 중 지방-용해 농도의 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상을 포함하는 대상에서 국소화된 지방 침적을 비수술적으로 제거하기 위한 제제를 포함하는 제1 용기; 및 (b) 수술을 사용하지 않고 대상에서 지방 침적을 감소시키기 위한 제제를 사용하기 위한 설명서 (written instruction)를 포함하는 키트를 제공한다.
- [0022] 일 구현예에서, 상기 제1 용기는: 항미생물제, 항혈전제, 항응집제, 거품-억제제, 항염증제, 마취제, 진통제, 스테로이드, 진정제, 항분산제, 및 근육 이완제로 이루어진 군으로부터 선택된 치료제를 포함한다.
- [0023] 일 구현예에서, 제2 용기를 더 포함하며, 상기 제2 용기는 항미생물제, 항혈전제, 항응집제, 거품-억제제, 항염증제, 마취제, 진통제, 스테로이드, 진정제, 항분산제, 및 근육 이완제로 이루어진 군으로부터 선택된 제2 치료제를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0024] 하기 본 발명의 바람직한 구현예들에 대한 상세한 설명은 첨부 도면들과 함께 읽힐 경우 더욱 잘 이해될 수 있을 것이다. 본 발명의 설명을 위해서, 도면에는 현재 바람직한 구현예들이 도시되어 있다. 그러나, 본 발명이 도면에 도시된 구현예들의 정확한 배열 및 수단들로만 한정되는 것은 아니라는 것은 이해되어야 한다.

도 1A 내지 1C를 포함하는 도 1은 3T3-L1 전구-지방세포의 분화를 나타낸 일련의 이미지들이다. 3T3-L1 전구-지방세포 (도 1A)는 분화 배지 (MDI 배지)로 처리하였으며, 분화된 지방세포 (도 1B)는 세척 및 고정하였다. 0.2% triton-X 100으로 투과시킨 후에, Oil Red O (도 1 C)로 염색하고, 200X 배율로 촬영하였다.

도 2A 내지 2C를 포함하는 도 2는 3T3-L1 지방세포에서 계면활성제의 세포 용해 효과를 도시한 일련의 이미지들이다. 분화된 3T3-L1 지방세포를 데옥시콜레이트 (DCA), 케노데옥시콜레이트 (CDCA), 타우로우로소데옥시콜레이트 (taurooursodeoxycholate, TUDCA), 및 콜레이트 (CA) (0 ~ 0.1%) (도 2A), 및 TUDCA 및 CA (0 ~ 2%) (도 2B), 및 우르소데옥시콜레이트 (UDCA), 하이오데옥시콜레이트 (hyodeoxycholate, HDCA), 및 CA (0 ~ 1%) (도 2C)에 1 시간 동안 노출시켰으며, 세포 생존도를 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로미드

(MTT) 분석법에 의해서 측정하였다. TUDCA를 제외한 모든 계면활성제는 용량-의존적인 세포 용해 효과를 나타내었다. 실험은 각 처리 당 3회 반복하였다. 결과는 미처리된 대조군 대비 생존 세포의 총 백분율로서 표현하였다.

도 3A 내지 3B를 포함하는 도 3은 DCA, CDCA, HDCA, 및 CA로 처리한 후 지방 패드 (fat pad) 용해의 측정을 나타낸 일련의 차트들이다. 95 ~ 100 mg 지방 조직을 식이 유도된 비만 마우스들로부터 절개하고 다양한 농도의 DCA, CDCA, 및 CA (도 3A), 및 HDCA (도 3B)에 노출시켰다. 지방 조직의 생존도는 MTT 분석에 의해서 측정하였으며, 상대 흡광도 (OD570)는 분광광도계로 측정하였다. 계면활성제의 농도를 증가시키에 따라서 지방 조직 용해가 더욱 두드러졌다. 실험은 각 처리 당 5회 반복 수행하였다.

도 4는 고지방 식이를 먹인 마우스로부터의 평균 체중 증가를 나타낸 그래프이다. 체중은 매 2주마다 모니터링 하였다.

도 5A 및 5B를 포함하는 도 5는 1% DCA, CDCA, CA, 및 인산 완충 식염수 (PBS)로 주사된 비만 마우스의 체중 (도 5A) 및 서혜부 (inguinal) 지방 패드 중량 (도 5B)을 도시한 일련의 차트들이다. 담즙염 (DCA, CDCA 및 CA) 용액을 마우스의 우측 서혜부 지방 패드에 주사하였다. 마우스의 좌측 서혜부 지방 패드에는 대조군으로서 동일 부피의 PBS를 주사하였다. 주사는 2 주 동안 4회 더 반복하였다. 마우스는 최종 주사 이후 4일 경과 시점에서 희생시키고, 서혜부 지방 패드를 절개한 다음 그 중량을 측정하였다.

도 6은 담즙염 투여된 마우스로부터의 지방 패드에서 관찰되는 조직학적 변화를 도시한 이미지들이다. 담즙염 및 PBS 주사 이후에, 주사된 영역의 지방 조직을 절개하였다. 절개된 조직을 파라포름알데히드로 고정하고, 파라핀 블록 중에 함침시킨 다음, 슬라이드 글라스에 단편화하였다. 조직 손상 및 괴사는 H & E 염색에 의해서 관찰하였다.

도 7은 괴사 영역 측정을 위한 대표적 과정이다. 주사 후 24 시간 경과 시점에서 얻어진 2,3,5-트리페닐테트라졸륨 클로리드 (TTC)-염색된 지방 패드의 이미지들을 도시한 것이다. 정상 조직은 적색으로 염색되고, 괴사 영역은 백색으로 염색되었으며, 영상 분석 시스템을 사용하여 정량하였다. 괴사 영역들 (백색, 미염색된 영역)은 영상 분석 시스템 (ImageJ; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 사용하여 측정하였다.

도 8은 인 비모 괴사영역의 정량화를 도시한 차트이다. 다양한 농도의 담즙염 (DCA, CDCA, 및 CA) 및 PBS로 주사된 지방 패드를 절개하고 괴사 영역들을 TTC 염색 (각 그룹 당 n=8)에 의해서 측정하였다. 계면활성제의 농도를 증가시킬수록 더욱 현저한 지방 패드 용해가 발생되었다.

도 9는 다양한 담즙염 (DCA, CA, CDCA) 및 비히클 (PBS)로 처리된 후 TTC-염색된 지방 패드를 도시한 대표적 이미지들이다.

도 10A 및 10B를 포함하는 도 10은 정상 PBS와 비교한 조직 생존도 (도 10A) 및 MTT 분석 이후의 상대 흡광도 (도 10B)를 나타낸 일련의 그래프이다. 마우스 서혜부 지방 패드는 CA, DCA 및 CDCA를 함유하는 인산 완충용액 중 다양한 염 농도 (0 ~ 200 mM 염화나트륨) 중에 노출되었다. 95 -100 mg의 지방 조직을 다양한 염 농도 중 DCA, CDCA, 및 CA의 EC₅₀ 농도 (정상 PBS 중에서 50%의 조직 생존도 감소를 나타내는 농도)로 인큐베이션하였다. 실험은 각 처리 당 5회 반복하였다.

도 11A 내지 11D를 포함하는 도 11은 DCA, CDCA, CA, HDCA, 및 PBS와 함께 다양한 pH 조건 (pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0) 중에 노출된 마우스 서혜부 지방 패드의 생존도 (도 11A, 11C) 및 상대 흡광도 (도 11B, 11D)를 나타낸 일련의 이미지들이다. 95-100 mg의 지방 조직을 다양한 pH 조건 중 DCA, CDCA, HDCA 및 CA의 EC₅₀ 농도로 배양하였다. 지방 조직의 생존도는 MTT 분석법에 의해서 측정하고, 흡광도 (OD₅₇₀)는 분광광도계로 측정하였다. 실험은 각 처리 당 5회 반복하여 수행하였다.

도 12A 내지 12C를 포함하는 도 12는 상대 괴사 영역을 도시한 일련의 그래프들이다. 다양한 농도의 DCA, CDCA, 및 CA (도 12A), UDCA (도 12B), HDCA (도 12C)로 주사된 지방 패드를 절개하고 괴사 영역들을 TTC 염색 (각 그룹 당 n=10)에 의해서 측정하였다. 괴사 영역들 (백색, 미염색된 영역)은 영상 분석 시스템을 사용하여 측정하였다. 계면활성제를 더 높은 농도로 주사하는 경우 지방 조직 용해가 더욱 두드러졌다.

도 13은 담즙염을 투여한 이후 마우스 지방 패드에서 관찰되는 조직학적 변화를 도시한 일련의 이미지들이다. 지방 조직을 절개하였으며, 파라포름알데히드로 고정하고, 파라핀 블록에 함침시킨 다음, 1.5 % CA, 1.5% HDCA, 및 1.5% UDCA 용액의 주사 이후에 슬라이드 글라스에 단편화하였다. 다형핵 (polymorphonuclear: PMN) 세포의 지방 패드 조직 내로의 침윤 (infiltration)이 H & E 염색에 의해서 HDCA 또는 UDCA 처리된 조직에서 관찰되었

다.

도 14A 내지 14C를 포함하는 도 14는 3T3-L1 지방세포 중에서 다양한 담즙염이 세포 용해 효과를 나타내는 일련의 차트를 도시한 것이다. 분화된 3T3-L1 지방세포를 타우로콜레이트 (TCA), 글리코콜레이트 (GCA), CA, 타우로테옥시콜레이트 (TDCA), 글리코테옥시콜레이트 (GDCA), DCA, 타우로케노테옥시콜레이트 (TCDCA), 및 CDCA (도 14A-14C)에 1 시간 동안 노출시켰으며, 세포 생존도를 MTT 분석법에 의해서 측정하였다. 모든 계면활성제는 용량-의존적 세포 용해 효과를 나타내었다. 타우린, 글리신의 접합 (conjugation)은 CA, DCA, 및 CDCA의 세포 용해 활성에 영향을 미치지 않는다. 실험은 각 처리 당 3회 반복하여 수행하였다. 결과는 미처리된 대조군 대비 생존 세포의 총 백분율로서 표시하였다.

도 15A 및 15B를 포함하는 도 15는 CA, GCA, TCA 용액 및 비히클 (PBS)의 다양한 pH 조건 (pH 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0) 중에 노출된 마우스 서혜부 지방 패드의 조직 생존도를 나타낸 일련의 이미지들이다. 95~100 mg의 지방 조직을 다양한 pH 조건에서 0.1% GCA, TCA 및 CA로 배양하였다. 지방 조직의 생존도는 MTT 분석에 의해서 광학 밀도 (도 15A) 및 상대 흡광도 (도 15B)로서 모니터링하였다. 실험은 각 처리 당 5회 반복 수행하였다.

도 16은 DCA, CA, 및 PBS 주사 후 14일 경과 시점에서 마우스 꼬리에 대한 조직학적 검사를 나타낸 이미지들이다. H&E 염색은 처리된 꼬리에서 피하 지방의 피사를 보여준다. 또한 근육 및 피부층의 조직 구조도 처리된 꼬리에서 관찰된다.

도 17A 내지 17E를 포함하는 도 17은 랫트의 뒷 발에 1% DCA, 1.5% CA, 0.8% CDCA, 1.5% UDCA, 1.5% HDCA 및 PBS를 주사한 후, 발 외형 (도 17A, 17C) 및 발 두께 (도 17B, 17D, 17E)를 나타낸 일련의 이미지들이다.

도 18A 및 18B를 포함하는 도 18은 DCA, CA 및 PBS를 다양한 농도로 (pH 7.4 용액 중 0.5~1.5%) 피하 주사한 후, 마우스 피부의 외형 (도 18A) 및 피부 병변의 중증도 (도 18B)를 나타낸 일련의 이미지들이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명은 인 비보에서 콜레이트의 지방용해 효과가 인 비트로 및 엑스 비보에서 관찰되는 콜레이트의 활성으로부터는 예측가능하지 않다는 예기치 않은 발견에 기초한 것이다. 즉, 비록 콜레이트는 인 비트로에서 테옥시콜레이트 및 케노테옥시콜레이트와 비교해서 낮은 용해 활성을 나타내었지만, 인 비보에서는 콜레이트가 탁월한 결과를 나타내었다. 예를 들어, 인 비보에서 콜레이트를 처리함으로써, 테옥시콜레이트를 처리할 때와 비교할 때, 피부에서 현저하게 감소된 유해 사례 (adverse events)를 나타내었다. 콜레이트가 인 비보에서 감소된 유해 사례를 야기하면서 예기치 않은 지방 용해 효과를 나타낸다는 점, 특히 인 비트로 및 엑스 비보 결과로부터 예측되지 않은 농도에서 이러한 효과를 나타낸다는 점은 콜레이트를 지방용해 주사에 있어서 활성 성분으로서 사용할 수 있다는 점을 뒷받침한다.
- [0026] 본 발명은 지방 침적을 감소시키기 위한 비수술적 방법을 제공함으로써 동물들에서 국소화된 지방 축적의 문제점을 해결한다. 일 구현예에서, 본 발명은 약제학적으로 허용가능한 제제 중 콜레이트 및 케노테옥시콜레이트 중 하나 이상을 지방-용해 농도의 유효량으로 투여하는 단계를 포함한다.
- [0027] 본 발명은 동물, 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간에서 지방을 감소시키기 위해서 담즙산 또는 그 염을 사용하는 것과 관련된다. 일 구현예에서, 상기 담즙산 또는 그 염은 콜레이트 및 케노테옥시콜레이트 중 하나 이상이다.
- [0028] 일 구현예에서, 본 발명은 약제학적으로 허용가능한 제제를 표적 부위에 국소적으로 투여함으로써 포유류에서 피하 지방 축적을 감소시키기 위한 콜레이트 및 케노테옥시콜레이트 중 하나 이상의 사용에 관한 것이다. 일 구현예에서, 상기 제제는 지방용해 주사의 형태이다.
- [0029] 본 발명은 지방 침적을 콜레이트 및 케노테옥시콜레이트 중 하나 이상을 포함하는 제제와 접촉시키는 단계를 포함하는 포유류 중 지방 침적을 감소시키는 방법에 관한 것이다.
- [0030] 다른 구현예에서, 본 발명은 셀룰라이트 및 여분 지방 침적과 관련된 지방 세포를 용해하기 위해서 콜레이트 및 케노테옥시콜레이트 중 하나 이상으로 셀룰라이트 및 여분 지방 침적을 처리하는 방법에 관한 것이다.
- [0031] 다른 구현예에서, 본 발명은 제제의 pH를 조절하여 콜레이트 및 케노테옥시콜레이트 중 하나 이상의 활성을 향상시킴으로써 지방을 제거하는 방법에 관한 것이다. 일 구현예에서, 콜레이트 및 케노테옥시콜레이트 중 하나 이상을 포함하는 상기 제제는 약 9 미만의 적당한 pH를 갖도록 제제화될 수 있다.

- [0032] **정의**
- [0033] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해서 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 비록 본 명세서에 서술된 것과 유사하거나 또는 균등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질이 서술되어 있다.
- [0034] 본 명세서에서 사용된 바와 같은, 하기 용어들 각각은 본 섹션에서 그와 관련된 의미를 갖는다.
- [0035] 관사 "a" 및 "an"은 상기 관사의 문법적 대상 중 하나 이상 (즉, 적어도 하나)을 나타내기 위해서 본 명세서에서 사용된다. 예를 들어, "요소 (an element)"는 하나의 요소 또는 그 이상의 요소를 의미한다.
- [0036] 양, 시간적 길이 등과 같은 측정가능한 수치를 지칭하는 경우 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "약 (about)"은, 하기 변이가 개시된 방법을 수행하기에 적절하기 때문에, 명시된 수치로부터 $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, 또는 $\pm 0.1\%$ 의 변이를 포함하는 것을 의미한다.
- [0037] 질병 또는 장애의 증상의 심각도, 환자가 경험하는 그러한 증상의 빈도, 또는 양자 모두가 감소되는 경우, 질병 또는 장애는 "경감되어 (alleviated)" 있다
- [0038] 본 명세서에서 사용된 바와 같은, 용어 "담즙산 (bile acid)"은 스테로이드 산 (및/또는 그 카르복실산 음이온), 및 그 염을 포함하며, 동물 (예를 들어, 인간)의 담즙에서 발견되는 것으로서, 이에 대한 비제한적인 예로는, 콜산 (cholic acid), 콜레이트, 데옥시콜산 (deoxycholic acid), 데옥시콜레이트, 하이오데옥시콜산 (hyodeoxycholic acid), 하이오데옥시콜레이트, 글리콜산, 글리코콜레이트, 타우로콜산 (taurocholic acid), 타우로콜레이트, 케노데옥시콜산 (chenodeoxycholic acid), 케노데옥시콜레이트, 리토콜산 (lithocholic acid), 리토콜레이트 등 (및 그 염)을 들 수 있다.
- [0039] 용어 "환자 (patient)", "대상 (subject)", "개체 (individual)" 등은 본 명세서에서 서로 교환가능하게 사용되며, 본 명세서에 기술된 방법에 순응할 수 있는 인 비트로 또는 인 시투든 임의의 동물, 또는 그 세포를 지칭한다. 특정 비제한적인 구현예들에서, 상기 환자, 대상 또는 개체는 인간이다.
- [0040] 본 명세서에서 사용된 바와 같은, 용어 "조성물 (composition)" 또는 "약제학적 조성물 (pharmaceutical composition)"은 본 발명의 적어도 하나의 화합물과 담체 (carriers), 안정화제, 희석제, 분산제, 현탁제, 농후제 (thickening agents), 및/또는 부형제 (excipients)와 같은 다른 화학 성분의 혼합물을 의미한다. 상기 약제학적 조성물은 상기 화합물의 유기체로의 투여를 촉진한다.
- [0041] 본 명세서에서 사용된 바와 같은, 용어 "유효량 (effective amount)", "약제학적으로 유효한 양 (pharmaceutically effective amount)" 및 "치료학적으로 유효한 양 (therapeutically effective amount)"은 비독성이지만 원하는 생물학적 결과를 제공하기에 충분한 양을 나타낸다. 상기 결과는 징후, 증상, 또는 질병의 원인의 감소 및/또는 경감, 또는 생물학적 시스템의 임의의 다른 원하는 변화 (alteration)일 수 있다. 임의의 개별적 사안에서 적당한 치료학적 양은 통상의 실험을 사용하여 통상의 기술자에 의해서 결정될 수 있다.
- [0042] 본 명세서에서 사용된 바와 같은, 용어 "효능 (efficacy)"은 분석방법 내에서 달성되는 최대 효과 (E_{max})를 나타낸다.
- [0043] 본 명세서에서 사용된 바와 같은, "지시적 물질 (instructional material)"은 본 명세서에 언급된 다양한 질병 또는 장애의 경감을 발휘하기 위한 키트 중에서 본 발명의 화합물, 조성물, 벡터, 또는 전달 시스템의 유용성을 전달하는데 사용될 수 있는 간행물, 기록 (recording), 다이어그램, 또는 임의의 다른 표현 매체를 포함한다. 선택적으로, 또는 대안으로서, 상기 지시적 물질은 포유류의 세포 또는 조직 내에서 질병 또는 장애의 경감에 대한 하나 이상의 방법을 서술할 수 있다. 본 발명의 상기 키트의 상기 지시적 물질은, 예를 들어, 본 발명의 상기 확인된 화합물, 조성물, 벡터, 또는 전달 시스템을 포함하는 용기에 부착될 수 있거나, 또는 상기 확인된 화합물, 조성물, 벡터, 또는 전달 시스템을 포함하는 용기와 함께 출하 (ship)될 수 있다.
- [0044] 대안적으로, 상기 지시적 물질은, 상기 지시적 물질 및 상기 화합물이 수용자에 의해서 협동적으로 사용되는 것을 의도로 상기 용기와는 별도로 출하될 수도 있다.
- [0045] "국소적 투여 (local administration)"는 약제학적 성분을 비전신적 경로에 의해서 환자의 근육 또는 피하 위치

(subdermal location)에, 또는 그 주변에 투여하는 것을 의미한다. 따라서, 국소적 투여는 정맥 또는 구강 투여와 같은 전신적 경로를 통한 투여는 배제한다.

[0046] "말초적 투여 (peripheral administration)"는 국소적 투여와는 반대로 증상적 위치 (symptomatic location)로부터 떨어진 위치에 투여하는 것을 의미한다.

[0047] "약제학적으로 허용가능한 (pharmaceutically acceptable)"은, 조성, 제제, 안정성, 환자 수용성 및 생물이용가능성에 관하여 약리학적/독성학적 관점에서 및 물리적/화학적 관점에서 제조하는 약제학적 화학자에게 수용가능한 특성 및/또는 물질을 나타낸다. "약제학적으로 허용가능한 담체"는 활성 성분(들)의 생물학적 활성의 유효성 (effectiveness)을 방해하지 않고 투여되는 호스트에 독성을 나타내지 않는 매체를 나타낸다.

[0048] "치료학적 (therapeutic)" 치료 (treatment)는 징후 또는 증상을 감소 또는 제거하기 위한 목적으로, 병리 징후 또는 증상을 나타내는 대상에게 투여되는 치료이다.

[0049] 본 명세서에서 사용된 바와 같은, 용어 "치료 (treatment)" 또는 "치료하는 (treating)"은 본 명세서에서 고려된 상태, 본 명세서에서 고려된 상태의 증상 또는 본 명세서에서 고려된 상태로 진전될 잠재성을 치료 (cure), 치유 (heal), 경감 (alleviate), 완화 (relieve), 변화 (alter), 구제 (remedy), 개선 (ameliorate), 향상 (improve) 또는 영향을 주기 위하여, 치료학적 작용제, 즉 본 발명의 화합물 (단독 또는 다른 약제학적 작용제와 조합으로)을 환자에게 적용 또는 투여하는 것으로 정의되거나, 또는 (예를 들어, 진단 또는 엑스 비보 적용을 위해서) 환자로부터 분리된 조직 또는 세포주에 치료학적 작용제를 적용 또는 투여하는 것 (예를 들어, 진단 또는 엑스 비보 적용을 위해서)으로 정의되고, 상기 본 명세서에서 고려된 상태, 본 명세서에서 고려된 상태의 증상(symptoms) 또는 본 명세서에서 고려된 상태로 진전될 잠재성을 갖고 있다. 상기 치료는 약리학 분야로부터 얻어진 지식에 기초하여 구체적으로 맞추어지거나 또는 변형될 수 있다.

[0050] "치료학적으로 유효한 양 (therapeutically effective amount)"은 환자에게 투여되는 경우, 질병의 증상을 개선하는 본 발명의 화합물의 양이다. "치료학적으로 유효한 양"을 구성하는 본 발명의 화합물의 양은 상기 화합물, 질병 상태 및 그 심각성, 치료되는 환자의 연령 등에 따라서 변화될 수 있다. 치료학적으로 유효한 양은 자신의 지식 및 본 개시를 고려하여 당 분야에서 통상의 기술을 지닌 자에 의하여 통상적으로 결정될 수 있다.

[0051] 범위: 본 개시 전반에 걸쳐서, 본 발명의 다양한 양상들이 범위 형식으로 제안될 수 있다. 범위 형식의 서술은 단순히 편의성 및 간략성을 위한 것이며, 본 발명의 범위에 대한 융통성 없는 제한 (inflexible limitation)으로서 해석되지 않아야 하는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 범위의 서술은 상기 범위 내의 개별적인 수치 값들뿐만 아니라 모든 가능한 하부범위 (subrange)를 구체적으로 개시한 것으로 고려되어야 한다. 예를 들어, 1 내지 6과 같은 범위의 서술은 상기 범위 내의 개별적 수치들, 예를 들어, 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3, 및 6뿐만 아니라, 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등과 같은 하부범위들을 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 이는 범위의 폭과 무관하게 적용된다.

[0052] **설명**

[0053] 담즙염의 안정성 및 활성은 그 pH 조건에 의해서 크게 영향을 받는다. 본 발명은 담즙염 주입의 안정성이 pH 조건을 조정함으로써 향상된다는 관찰에 부분적으로 관련이 있다.

[0054] 본 발명은 적당한 pH 범위에서 담즙염의 적절한 농도 범위의 조합이 유해 사례를 감소시킴으로써 원하는 치료학적 결과를 달성하는데 중요하다는 발견과 관련이 있다. 예를 들어, 더 낮은 pH 조건이 담즙염의 세포 용해 활성을 향상시키기 때문에 더 낮은 농도의 담즙염이 더 낮은 pH 제제 중에 사용될 수 있다. 바람직하게는, 상기 사용된 더 낮은 pH는 담즙염 제제의 유해 효과를 증가시키지 않는다.

[0055] 따라서, 유해 효과는 적당한 pH 조건 중 세포 용해 활성으로부터 구별될 수 있다. 그러므로, 일부 경우에 있어서, 더 낮은 pH 제제 중에서 더 낮은 농도의 담즙염을 사용함으로써 담즙염의 세포 용해 활성 감소 없이 유해 효과를 감소시킬 수 있다.

[0056] 테옥시콜레이트의 경우, 더 낮은 pH 용액에서 테옥시콜레이트의 침전이 관찰되었다. 결과적으로, 테옥시콜레이트의 경우 더 높은 pH의 완충용액이 요구된다. 그러나, 생리화적인 것보다 더 높은 pH 용액은 유해 사례를 나타낸다. 따라서, 본 발명은 테옥시콜레이트 제제에 비해서 유해 사례의 감소와 같은 추가적인 잇점을 제공하는, 생리학적 pH 및 낮은 농도의 콜레이트 및 케노테옥시콜레이트 용액 중 하나 이상의 제제를 제공한다.

- [0057] 본 발명은 데옥시콜레이트가 유해 효과를 나타내는 농도에서 콜레이트가 수용자에게 유해 효과를 나타내지 않는, 인 비오에서 콜레이트의 예기치 않은 지방 용해 효과에 기초한 것이다. 따라서, 본 발명은 콜레이트의 농도가 데옥시콜레이트의 농도보다 높을 수 있지만, 환자에서 감소된 유해 효과를 나타내는 콜레이트의 제제를 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 콜레이트의 농도는 데옥시콜레이트의 농도와 동일할 수 있지만, 환자에서 더 높은 지방 용해 효과를 나타내면서도 감소된 유해 효과를 나타내는, 콜레이트의 제제를 제공한다. 그러므로, 본 발명은 데옥시콜레이트를 사용하는 경우에 비해서 유해 효과를 나타내지 않는 콜레이트를 유효 농도로 포함하는 더욱 안전한 지방용해 주사제 (lipolysis injection)를 제공한다.
- [0058] 일 구현예에서, 본 발명은 포유류 중 지방 감소를 위한 활성 성분으로서 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상을 사용하는 조성물 및 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 본 발명은 지방용해 주사제 중 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상을 사용하는 조성물 및 방법을 제공한다.
- [0059] 일 구현예에서, 본 발명은 국소화된 지방 침적의 비수술적 감소를 필요로 하는 환자에게 국소화된 지방 침적의 비수술적 감소에 유용한 조성물 및 방법을 제공하며, 상기 방법은 약리학적으로 활성인 담즙산 또는 그 염, 예를 들어 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트를 포함하는 조성물을 사용하는 단계를 포함한다. 본 발명의 조성물은 항염증제, 진통제, 분산제 및 약제학적으로 허용가능한 부형제와 같은 다른 작용제들을 추가적으로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 포유류의 엉덩이, 종아리, 등, 넓적다리, 발목, 또는 위뿐만 아니라, 눈, 턱, 또는 팔 밑의 지방 침적을 포함하는 지방의 국소화된 축적을 치료하는데 유용하다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은, 예를 들어 안검 지방 헤르니아, 지방종, 지방이상증, 버팔로 험프 지방이상증 (buffalo hump lipodystrophy), 또는 셀룰라이트 관련성 지방 침적과 같은, 지방 침적의 특정 타입을 감소시킬 수 있다. 일 구현예에서, 상기 지방 감소는 지방흡입과 같은 수술적 과정을 필요로 하지 않는다.
- [0060] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 수술적 개입의 필요성 없이, 지방 감소를 필요로 하는 환자의 치료 부위 내로 직접 주사하기에 적합하게 제제화된다.
- [0061] 일 구현예에서, 지방 제거의 비수술적 방법은 지방흡입술, 지방성형술 또는 흡입 절제술을 포함하지 않는다.
- [0062] 일 구현예에서, 본 발명은 이완된 피부를 팽팽하게(tighten) 할 뿐만 아니라 피하 지방 침적을 감소시키기 위한 조성물, 방법, 및 키트를 제공한다.
- [0063] **조성물**
- [0064] 본 발명은 국소화된 지방 침적의 비수술적 감소 또는 제거를 필요로 하는 환자에서 국소화된 지방 침적의 비수술적 감소 또는 제거에 유용한 조성물을 제공한다. 일 구현예에서, 상기 조성물은 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상의 유효 지방 용해량을 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 다른 것들 중에서도 하안검 지방 헤르니아, 지방이상증 및 셀룰라이트 관련성 지방 침적을 포함하는 국소화된 지방 축적을 치료하는데 유용하다. 바람직하게는, 본 발명의 조성물은 지방흡입과 같은 수술적 과정을 필요로 하지 않도록 하는데 사용된다.
- [0065] 일 구현예에서, 본 발명은 수성 비히클 중에 하나 이상의 약리학적으로 활성인 담즙산 및 그 염 및 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 생물학적으로 적합한 담즙산 및 그 염의 조성물을 제공한다. 특히, 약리학적으로 활성인 담즙산 또는 그 염이 지방을 용해시키는데 사용된다는 것은 본 발명의 범위 이내이다.
- [0066] 몇몇 담즙산 및 그 염이 본 발명에 포함된다. 예를 들어, 본 발명에 포함되는 상기 담즙산 및 그 염은 콜산, 케노데옥시콜산, 및 그 염의 염으로부터 선택된다. 다양한 양태에서, 염의 담즙산 또는 담즙산 접합체 (conjugate)는 생리학적으로 허용가능한 염, 예를 들어 콜산 또는 케노데옥시콜산의 나트륨 염 또는 콜산 또는 케노데옥시콜산의 타우린 또는 글리신과의 접합체의 형태일 수 있다. 일 양태에서, 용어 "콜산 (cholic acid)"은 콜산의 나트륨 염을 나타낸다. 일 구현예에서, 콜산 (콜레이트)은 본 발명의 제제 중 활성 성분이다. 다른 양태에서, 용어 "케노데옥시콜산 (chenodeoxycholic acid)"은 케노데옥시콜산의 나트륨 염을 나타낸다. 일 구현예에서, 케노데옥시콜산 (케노데옥시콜레이트)은 본 발명의 제제 중 활성 성분이다.
- [0067] 일부 경우에서, 용어 콜레이트 화합물, 콜레이트 및 콜산은 상호교환가능하게 사용된다. 일부 경우에서, 용어 케노데옥시콜레이트 화합물, 케노데옥시콜레이트 및 케노데옥시콜산은 상호교환가능하게 사용된다.
- [0068] 일 구현예에서, 정의된 약제학적 조성물로서 적당한 담즙산의 적합량 (adequate quantities)이 본 명세서에서 제공된다. 일 양태에서, 특정 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 약제학적 조성물은 동물 기원의 모든 잔기

(moieties) 및 포유류 및/또는 박테리아 발열성 물질 (pyrogens)이 존재하지 않는다. 다른 양태에서, 정의된 약제학적 조성물로서 적당한 하나 이상의 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트의 적합량이 제공되며, 이는 관련 조성물과 함께, 국소화된 지방 제거를 위한 주사가능한 약제학적 조성물로서 사용될 수 있다. 본 발명의 정의된 하나 이상의 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 주사물 (injectates)은 지방 사멸을 야기하는 분자와 조합될 수 있다.

[0069] 일부 구현예들에서, 상기 담즙염은 나트륨 (Na^+), 칼륨 (K^+), 리튬 (Li^+), 마그네슘 (Mg^{2+}), 칼슘 (Ca^{2+}), 바륨 (Ba^{2+}), 스트론튬 (Sr^{2+}), 및 암모늄 (NH_4^+)으로 이루어진 군으로부터 선택된 양이온을 포함한다. 일부 구현예들에서, 계면활성제는 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속인 양이온과 함께 담즙염을 포함한다. 바람직하게는, 상기 알칼리 금속은 나트륨 (Na^+), 칼륨 (K^+), 또는 리튬 (Li^+)이고, 상기 알칼리 토금속은 마그네슘 (Mg^{2+}), 칼슘 (Ca^{2+}), 바륨 (Ba^{2+}), 또는 스트론튬 (Sr^{2+})이다. 특정 구현예들에서, 본 명세서에서 서술된 상기 방법 및 조성물들에 사용되는 담즙염은 비제한적인 예로서 그의 나트륨 및 칼륨 염을 포함하는, 약제학적으로 허용가능한 염이다.

[0070] 특정 구현예들에서, 본 발명의 하나 이상의 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 조성물의 농도는 본 발명의 조성물 중 중량 또는 부피로 약 0.5%, 약 1%, 약 2%, 약 3%, 약 4%, 약 5%, 약 6%, 약 7%, 약 8%, 약 9%, 약 10%, 약 11%, 약 12%, 약 13%, 약 14%, 약 15%, 약 16%, 약 17%, 약 18%, 약 19%, 약 20%, 약 21%, 약 22%, 약 23%, 약 24%, 약 25%, 약 26%, 약 27%, 약 28%, 약 29%, 약 30%, 약 31%, 약 32%, 약 33%, 약 34%, 약 35%, 약 36%, 약 37%, 약 38%, 약 39%, 약 40%, 약 41%, 약 42%, 약 43%, 약 44%, 약 45%, 약 46%, 약 47%, 약 48%, 약 49%, 약 50%, 약 51%, 약 52%, 약 53%, 약 54%, 약 55%, 약 56%, 약 57%, 약 58%, 약 59%, 약 60%, 약 61%, 약 62%, 약 63%, 약 64%, 약 65%, 약 66%, 약 67%, 약 68%, 약 69%, 약 70%, 약 71%, 약 72%, 약 73%, 약 74%, 약 75%, 약 76%, 약 77%, 약 78%, 약 79%, 약 80%, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 약 100%, 또는 이로부터 유래될 수 있는 임의의 범위일 수 있다. 따라서, 상기 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 조성물 중 하나 이상은, 임의의 조합 또는 백분율 범위로 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상을 포함할 수 있는 것으로 고려된다.

[0071] 일 구현예에서, 본 명세서의 상기 조성물은 용액이다. 바람직하게는, 상기 용액은 수성이다.

[0072] 일 구현예에서, 본 발명은: (i) 하나 이상의 약리학적으로 활성인 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트의 치료학적으로 유효한 양; 및 (ii) 약제학적, 수의학적, 또는 미용적 부형제를 포함하는, 피하 주사를 위한 용액에 관한 것이다.

[0073] 일부 구현예들에서, 상기 용액은: 항미생물제, 혈관수축제, 항혈전제, 항응집제, 거품-억제제, 항염증제, 진통제, 분산제, 항분산제, 투과 강화제, 스테로이드, 진정제, 근육 이완제, 및 항설사제로 이루어진 군으로부터 선택된 제2 치료제를 더 포함할 수 있다.

[0074] 일부 구현예들에서, 용액은 500 mL까지 용액을 포함하는 용기 중에 존재한다. 상기 용기는 주사기 또는 주사기-담재가능한 용기일 수 있다.

[0075] 상기 조성물 (예를 들어, 용액)은 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상의 치료학적 유효량을 포함한다. 상기 치료학적 유효량은 피하 지방 침적을 감소시키거나 또는 유해 효과가 있는 이완된 피부 영역을 팽팽하게 하는데 효과적이다.

[0076] 본 발명의 용액 중에 존재하는 하나 이상의 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트는 약 0.001 내지 10, 0.01 내지 5, 또는 0.1 내지 2% w/w, w/v, 또는 v/v의 농도일 수 있다. 바람직하게는, 상기 용액 중에 존재하는 하나 이상의 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트는 약 0.1 내지 5 w/w 또는 더욱 바람직하게는 약 1% w/w의 농도일 수 있다.

[0077] 일 구현예에서, 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상은 상기 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상이 지방을 용해하기에 효과적일 수 있도록 약 9 미만의 pH로 제제화되어 있다. 일 구현예에서, 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상은 상기 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상이 지방을 용해하기에 효과적일 수 있도록 약 8 미만의 pH로 제제화되어 있다. 일 구현예에서, 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상은 상기 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상이 지방을 용해하기에 효과적일 수 있도록 약 7.5 미만의 pH로 제제화되어 있다. 일 구현예에서, 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상은 상기 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상이 지방을 용해하기에 효과적일 수 있도록 약 7.0 미만의 pH로 제제화되어

있다. 바람직하게는, 상기 제제는 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상이 25 ℃에서 안정적인 형태인 액체 제제이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 안정적인 형태는 겔화 형태 또는 침전 형태가 아니다.

[0078] 일 구현예에서, 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상은 약 0.5% 내지 약 4.0%의 농도로 제제화되어 있다. 일 구현예에서, 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상은 약 0.5% 내지 약 2.0%의 농도로 제제화되어 있다. 바람직하게는, 상기 제제는 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상이 25 ℃에서 안정적인 형태인 액체 제제이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 안정적인 형태는 겔화 형태 또는 침전 형태가 아니다.

[0079] 일 구현예에서, 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상은 약 9 미만의 pH 완충용액 중 약 0.5% 내지 약 4.0%의 농도로 제제화되어 있다. 일 구현예에서, 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상은 약 8 미만의 pH 완충용액 중 약 0.5% 내지 약 4.0%의 농도로 제제화되어 있다. 일 구현예에서, 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상은 약 7.5 미만의 pH 완충용액 중 약 0.5% 내지 약 4.0%의 농도로 제제화되어 있다. 일 구현예에서, 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상은 약 7 미만의 pH 완충용액 중 약 0.5% 내지 약 4.0%의 농도로 제제화되어 있다. 바람직하게는, 상기 제제는 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상이 25 ℃에서 안정적인 형태인 액체 제제이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 안정적인 형태는 겔화 형태 또는 침전 형태가 아니다.

[0080] 일 구현예에서, 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상은 약 9 미만의 pH 완충용액 중 약 0.5% 내지 약 2.0%의 농도로 제제화되어 있다. 일 구현예에서, 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상은 약 8 미만의 pH 완충용액 중 약 0.5% 내지 약 2.0%의 농도로 제제화되어 있다. 일 구현예에서, 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상은 약 7.5 미만의 pH 완충용액 중 약 0.5% 내지 약 2.0%의 농도로 제제화되어 있다. 일 구현예에서, 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상은 약 7 미만의 pH 완충용액 중 약 0.5% 내지 약 2.0%의 농도로 제제화되어 있다. 바람직하게는, 상기 제제는 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상이 25 ℃에서 안정적인 형태인 액체 제제이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 안정적인 형태는 겔화 형태 또는 침전 형태가 아니다.

[0081] 일 구현예에서, 본 발명은, 25 ℃에서 안정적인 형태로, 약 8 미만의 pH 완충용액 중, 약 0.5% 내지 약 2.0%의 농도를 갖는 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상의 제제를 제공한다. 본 발명의 제제의 잇점은 생리학적인 pH 및 낮은 농도의 상기 담즙염 용액이 더 높은 pH 용액 및 더 높은 담즙염 용액을 사용하는 경우의 유해 효과를 감소시킬 수 있다는 것이다.

[0082] **방법**

[0083] 본 발명의 조성물은 다양한 임상적 상황들에 적용될 수 있다. 본 발명은 그러한 제제를 표적 부위에 국소적으로 투여함으로써 포유류에서 피하 지방 축적을 감소시키기 위한 약리학적으로 활성인 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상의 사용에 관한 것이다. 이 조성물에 대한 다른 사용은, 지방종, 지방의 용해, 메소테라피 (mesotherapy), 조직 분리, 종양 감소, 암 감소, 암 치료, 및 신체의 부분 또는 영역으로부터 왁스, 지방, 단백질, 또는 탄수화물을, 이완, 제거, 또는 신체 소비 또는 용해를 돕는데 사용하는 것을 원할 수 있는 임의의 다른 임상적 상황이 포함된다. 예를 들어, 지방종의 치료에 있어서, 상기 조성물은 지방종과 접촉되어 피하로 주사되어 지방종을 용해시킬 수 있다. 지방종에 대한 다른 적당한 적용 방법 또한 사용될 수 있다.

[0084] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 대상에서 지방 침적을 감소시키기 위해서 사용된다. 일부 경우들에서, 지방 침적은 비만, 지방 재분배 증후군, 하안검 지방 헤르니아, 지방종, 데르컴병 (Dercum's disease), 지방이상증, 버팔로 험프 지방이상증, 후경부 지방 (dorsocervical fat), 내장 지방과다증 (visceral adiposity), 유방 확대증, 고도비만증 (hyperadiposity), 옆구리 및 팔 주변의 확산된 신체 지방, 및 셀룰라이트와 관련된 지방 침적으로 이루어진 군으로부터 선택된 상태와 관련이 있다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 방법은 대상에 수술을 행하는 것을 포함하지 않는다.

[0085] 본 발명의 조성물은 육아종 (granulomas), 흉터, 종양, 여드름 낭포 (acne cysts), 피지 낭포 (sebaceous cysts), 피지 과형성 (sebaceous hyperplasia), 피지의 질환, 여드름 관련 피부병, 피하 지방의 질환, 종양, 문신 제거, 감염 및 바이오필름, 셀룰라이트, 지방 침적, 지방 조직, 및 관련된 상태들의 치료에 유용할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 피부 윤곽 결함 (예를 들어, 피부 필러로 과다 교정한 후, 또는 주사에 대한 신체의 과다반응 후 유방 비대칭 또는 입술 비대칭)을 펴는데 (even out) 사용될 수도 있다. 상기 과정은 살아있는 조직 중에서, 신체로부터 분리된 조직에서, 또는 병리적 또는 결함 검사의 보조를 위해서 수행될 수 있다.

상기 과정은 조직, 혈청, 또는 임의의 다른 신체 부분에 대하여 수행될 수 있다. 인간 의료에 더해서, 상기 조성물은 동물 의료에도 또한 적용가능하다.

- [0086] 일 구현예에서, 본 발명은 대상에서 지방을 감소시키기 위한 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 본 발명의 조성물을 표적 영역에 국소적으로 (locally) 투여하는 단계를 포함한다.
- [0087] 일부 구현예들에서, 상기 투여 단계는 본 발명의 조성물을 피하 또는 경피 주사를 통해서 전달하는 단계를 포함한다.
- [0088] 일부 구현예들에서, 상기 투여 단계는 본 발명의 조성물을 피부 패치, 펌프, 또는 피하층 저장 (subdermal depot)을 통해서 전달하는 단계를 포함한다.
- [0089] 일부 구현예들에서, 상기 투여 단계는 본 발명의 조성물을 국소적으로 (topically) 또는 피하로 전달하는 단계를 포함한다.
- [0090] 일부 구현예들에서, 치료되는 표적 부위의 영역은 눈 밑, 턱 밑, 팔 밑, 엉덩이, 뺨, 이마, 종아리, 등, 넓적다리, 발목 또는 위이다.
- [0091] 일부 구현예들에서, 대상에서 지방을 감소시키기 위해서 사용되는 상기 조성물은 피부 긴장 용액 (skin tightening solution)과 함께 제제화되어 있다. 상기 피부 긴장 용액은: 항미생물제, 혈관수축제, 항혈전제, 항응집제, 거품-억제제, 항염증제, 진통제, 분산제, 항분산제, 투과 강화제, 스테로이드, 진정제, 근육 이완제, 및 항설사제로 이루어진 군으로부터 선택된 제2 치료제를 더 포함할 수 있다.
- [0092] 일부 구현예들에서, 본 발명의 방법은 대상에 대한 수술을 수행하는 단계를 포함하지 않는다.
- [0093] 특정 구현예들에서, 본 발명의 제1 치료와 제2 치료 사이의 시간 간격은 적어도 1 주, 적어도 2 주, 적어도 1 달, 적어도 2 달, 적어도 12 주, 적어도 13 주, 적어도 14 주, 적어도 15 주, 적어도 16 주, 적어도 17 주, 적어도 18 주, 적어도 19 주, 적어도 20 주, 적어도 21 주, 적어도 22 주, 적어도 23 주, 적어도 24 주, 적어도 25 주, 적어도 26 주, 적어도 27 주, 적어도 28 주, 적어도 29 주, 적어도 30 주, 적어도 31 주, 적어도 32 주, 적어도 33 주, 적어도 34 주, 적어도 35 주, 적어도 36 주, 적어도 37 주, 적어도 38 주, 적어도 39 주, 적어도 40 주, 적어도 41 주, 적어도 42 주, 적어도 43 주, 적어도 44 주, 적어도 45 주, 적어도 46 주, 적어도 47 주, 적어도 48 주, 적어도 49 주, 적어도 50 주, 적어도 51 주, 적어도 52 주 또는 그 이상이다.
- [0094] **약제학적 조성물**
- [0095] 일 구현예에서, 본 발명은 약 9 미만, 약 8 미만, 약 7.5 미만, 또는 약 7 미만의 pH 완충용액 중 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상을 포함하는 액체 약제학적 조성물을 제공한다. 일 구현예에서, 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상은 25 °C에서, 액체 약제학적 조성물 중에서 안정하다. 일 구현예에서, 25 °C에서, 액체 약제학적 조성물 중에서 안정하다는 것은 콜레이트 및 케노데옥시콜레이트 중 하나 이상이 겔화된 형태 또는 침전 형태가 아니라는 것을 의미한다.
- [0096] 본 명세서에 서술된 상기 약제학적 조성물의 제제는 약리학 분야에서 알려진 또는 이후 개발된 임의의 방법에 의해서 제조될 수 있다. 일반적으로, 상기 제조방법은 활성 성분을 담체 또는 하나 이상의 다른 부수 성분들과 결합시키는 단계, 이후에, 필요하거나 원하는 경우에는, 산물을 원하는 단일 또는 다중 투여 단위로 성형 또는 포장하는 단계를 포함한다.
- [0097] 비록 본 명세서에서 제공된 약제학적 조성물의 서술은 주로 인간에 대한 윤리적 투여에 적합한 약제학적 조성물에 대한 것일지라도, 그러한 조성물이 모든 종류의 동물들에 투여하기에도 일반적으로 적합하다는 것은 통상의 기술자에 의하여 이해될 것이다.
- [0098] 인간에 대한 투여에 적합한 약제학적 조성물을 변형하여 다양한 동물들에 투여하기에 적합한 조성물을 제조하는 것은 잘 이해되고 있으며, 통상의 기술을 가진 수의 약물학자라면, 필요한 경우에는, 그러한 변형을 단지 보통의 실험을 통해서 고안 및 수행할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 투여가 고려되는 대상은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 인간 및 다른 영장류, 비인간 영장류, 가축, 돼지, 말, 양, 고양이 및 개와 같은 상업적으로 관련성 있는 포유류들을 포함한, 포유동물을 포함한다.
- [0099] 본 발명의 방법에서 유용한 약제학적 조성물은, 눈 (ophthalmic), 입, 직장, 질, 비경구, 국소, 폐, 비강내, 불

쪽 (buccal), 또는 다른 투여 경로에 적합한 제제로 제조, 포장, 또는 판매될 수 있다. 다른 고려된 제제는 돌출된 나노입자 (projected nanoparticle), 리포솜 제제, 활성 성분을 함유하는 재밀봉된 적혈구, 및 면역적으로 기반된 제제를 포함한다.

[0100] 본 발명의 약제학적 조성물은 단일 유닛 용량, 또는 복수의 단일 유닛 용량으로서, 제조, 포장 또는 벌크로 판매될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은, "유닛 용량 (unit dose)"은 미리 정해진 양의 활성 성분을 포함하는 약제학적 조성물의 구별되는 양 (discrete amount)이다. 상기 활성 성분의 양은 일반적으로 대상에게 투여될 활성 성분의 투여량 (dosage), 또는 예를 들어, 그러한 투여량의 절반 또는 3분의 1과 같은, 그러한 투여량의 편리한 분획과 일반적으로 동일하다.

[0101] 본 발명의 약리학적 조성물 중 활성 성분, 약제학적으로 허용가능한 담체, 및 임의의 추가적 성분의 상대적 양은, 치료되는 대상의 정체 (identity), 크기, 및 상태에 따라서, 또한 상기 조성물이 투여되는 경로에 따라서 변할 것이다. 예를 들어, 상기 조성물은 0.1% 내지 100% (w/w)의 활성 성분을 포함할 수 있다.

[0102] 본 발명의 약제학적 조성물의 조절된- 또는 지속된-방출 제제는 통상적인 기술을 사용하여 제조될 수 있다.

[0103] 상기 약제학적 조성물은 멸균 주사가능 수성 또는 유성 현탁액 또는 용액의 형태로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 이 현탁액 또는 용액은 알려진 기술에 따라서 제제화될 수 있으며, 활성 성분에 더해서, 본 명세서에서 서술된 분산제, 습윤제, 또는 현탁제와 같은 추가적인 성분들을 포함할 수 있다. 상기 살균 주사가능 제제는, 예를 들어 물 또는 1,3-부탄 디올과 같은 비독성 비경구적으로 허용가능한 희석제 또는 용매를 사용하여 제조될 수 있다. 다른 허용가능한 희석제 및 용매는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 링거액, 등장 염화나트륨 용액, 및 합성 모노- 또는 디-글리세리드와 같은 고정된 오일을 포함한다. 유용한 다른 비경구적으로-투여가능한 제제는, 활성 성분을 미세결정 형태 중에, 리포솜 제제 중에, 또는 생분해가능한 폴리머 시스템의 성분으로서 포함하는 것들을 포함한다. 지속된 방출 또는 이식 (implantation)을 위한 조성물들은 에멀전, 이온 교환 수지, 난용성 폴리머, 또는 난용성 염과 같은 약제학적으로 허용가능한 폴리머성 또는 소수성 물질을 포함할 수 있다.

[0104] 본 발명의 약제학적 조성물은 볼쪽 (buccal) 투여에 적합한 제제로 제조, 포장, 또는 판매될 수 있다. 상기 제제는, 예를 들어, 통상적인 방법을 사용하여 제조된 정제 (tablets) 또는 로젠지 (lozenges) 형태일 수 있으며, 예를 들어, 0.1 내지 20% (w/w)의 활성 성분, 잔량은 구강 용해가능하거나 또는 분해가능한 조성 (composition)을 포함하는 잔량 (balance) 및, 선택적으로는, 본 명세서에서 서술된 하나 이상의 추가적 성분일 수 있다. 대안으로서, 볼쪽 투여에 적합한 제제는 상기 활성 성분을 포함하는 분말 또는 에어로졸화된 또는 안개화된 (atomized) 용액 또는 현탁액을 포함할 수 있다. 상기 분말화, 에어로졸화, 또는 에어로졸화된 제제는, 분산되는 경우, 바람직하게는 약 0.1 내지 약 200 나노미터 범위의 평균 입자 또는 액적 크기를 가지며, 본 명세서에서 서술된 하나 이상의 추가적인 성분들을 더 포함할 수 있다.

[0105] 본 명세서에서 사용된 바와 같은, "추가적 성분 (additional ingredients)"은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 하기 서술된 것들 중 하나 이상을 포함한다: 부형제; 표면 활성제; 분산제; 비활성 희석제; 과립화 및 봉해제 (granulating and disintegrating agents); 결합제; 윤활제; 감미제; 향미제; 착색제; 보존제; 젤라틴과 같은 생리학적으로 분해가능한 조성물; 수성 비히클 및 용매; 유성 비히클 및 용매; 현탁제; 분산 또는 습윤제 (dispersing or wetting agents); 유화제; 완화제 (demulcents); 완충제; 염; 농후제 (thickening agents); 필러; 향산화제; 항생제; 항진균제; 안정화제; 및 약제학적으로 허용가능한 폴리머 또는 소수성 물질. 본 발명의 약제학적 조성물 중에 포함될 수 있는 다른 "추가적인 성분 (additional ingredients)"은 동 분야에 알려져 있으며, 예를 들어 원용에 의해서 본 명세서에 포함되는, Remington's Pharmaceutical Sciences (1985, Genaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA)에 서술되어 있다.

[0106] **실험적 실시예**

[0107] 본 발명은 하기 실시예들을 참조하여 상세하게 더욱 설명된다. 하기 실시예들은 단지 설명의 목적으로 제공되는 것이며, 달리 명시되지 않는 한, 본 발명의 범위를 제한할 의도는 아니다. 따라서, 본 발명이 결코 하기 실시예들에만 제한되는 것으로 해석되어서는 아니되며, 오히려 본 명세서에서 제공된 가르침의 결과로서 명백하게 될 임의의 및 모든 변형들을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0108] 추가적인 설명 없이, 본 기술 분야의 통상의 기술자는, 전술한 서술 및 하기 예시적인 실시예를 사용하여, 본 발명의 화합물을 제조 및 이용하고, 청구된 방법을 실시할 것으로 믿어진다. 하기 실시예들은, 따라서, 본 발명

의 바람직한 구현예들을 구체적으로 지적하며, 결코 상기 개시의 나머지를 제한하는 것으로 해석되지 않는다.

[0109] **실시예 1: 지방 감소를 위한 담즙산 및 염**

[0110] 본 실시예에서 제공된 결과는 콜레이트의 지방 용해 효과는 콜레이트를 지방 용해 주사의 활성 성분으로서, 특히 인 비트로 및 엑스 비보 결과로부터는 예상되지 않은 농도로 사용할 수 있도록 한다는 예기치 않은 발견을 입증한다.

[0111] 하기 실험에서 채용된 물질 및 방법을 이하에 서술한다.

[0112] **인 비트로에서 세포 배양 및 지방세포 분화**

[0113] 3T3-L1 세포를, 37 °C에서, 5% CO₂/95% 가습한 분위기 (humidified atmosphere) 중에서, 10% 우태아 혈청으로 보충된 Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM) 중에서 컨플루언스 (confluence)까지 배양하였다. 지방세포 분화를 유도하기 위해서, 3T3-L1 전구-지방세포(pre-adipocyte)를 96-웰 플레이트 중에 접종하고 (5X10³ 세포/웰), 컨플루언스 이후 2일째 (day 0)까지 성장시키고, 성장 배지 플러스 MDI (0.5 μM 메틸이소부틸잔틴, 1 μM 텍사메타손 및 10 ug/ml 인슐린; 모든 물질은 Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO, USA로부터 구입)로 2일 동안 처리하였으며, 이어서 10 ug/ml 인슐린 단독만을 함유하는 배지로 2일 동안 처리하였다. 배지는 이후 8일 동안 매 2일마다 교환해 주었다.

[0114] **Oil Red O 염색**

[0115] 분화 유도 후 7일 내지 10 일째에, 세포를 인산 완충 식염수 (PBS)로 2회 세척하고, 10% 포르말린으로 1 시간 동안 고정한다. 다음, PBS로 3회 세척하였다. 세포를 여과된 Oil Red O (0.3%) 작업 용액으로 20분 동안 염색시킨 다음, 염색된 세포를 증류수로 3회 세척하였다. 이미지들은 Olympus 디지털 카메라를 구비한 Olympus 역상 현미경을 사용하여 수집하였다.

[0116] **인 비트로에서 계면활성제에 의한 세포 용해 효과**

[0117] 96 웰 플레이트 중의 분화된 지방세포를 PBS로 2회 세척하고, 무혈청 DMEM 중 다양한 농도의 담즙염 중에서 인큐베이션하였다. 37 °C에서 1 시간 동안 인큐베이션한 후, 배지를 바꾸고, 20 μl의 MTT 용액 (PBS 중 5 mg MTT/ml)을 각 웰에 첨가하고, 37 °C에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 결과물인 포르마잔 산물을 100 μl의 DMSO/웰 중에서 용해시키고, 세포 생존도는 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 570 nm (OD₅₇₀)에서의 광학적 밀도를 측정함으로써 결정하였다.

[0118] **마우스로부터 지방세포 조직의 준비 및 엑스 비보 지방 용해 분석**

[0119] 서혜부 지방 패드 (피하 지방)를 식이 유도된 비만 마우스로부터 절개하고, 대략 동일한 크기로 썰었다. 100 mg 조직 샘플들을 48 웰 플레이트로 옮기고, 다양한 농도 및 pH의 DCA, CDCA, CA 및 인산완충용액 350 μl와 함께 10분 동안 인큐베이션하였다. 70 μl의 MTT 용액 (PBS 중 5 mg/ml)을 각각의 웰에 첨가하고, 37 °C에서 밤새도록 인큐베이션하였다. 용액을 제거하고, 침전된 포르마잔 산물을 300 μl의 DMSO에 용해시켰다. 조직 생존도는 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 570 nm에서의 광학적 밀도 (OD₅₇₀)를 측정함으로써 모니터링하였다.

[0120] **마우스에서 식이 유도된 비만의 유도**

[0121] 4주령의 수컷 C57BL/6N 마우스를 Orient Bio (대한민국, 성남)로부터 구입하였다. 마우스에 4주령부터 18주까지 고지방 식이 (58% 칼로리는 지방으로부터, 16.4% 칼로리는 단백질로부터, 또한 25.5%의 칼로리는 탄수화물, 주

로 수크로스로부터 이루어진-D 12331; Research Diets, New Brunswick, NJ, USA)를 공급하였다. 마우스는 기후 조절된 환경 (22.8 ± 2.0 °C, 45 ~ 50% 습도)에서, 12 시간 명/12 시간 암 사이클로 사육하였다. 물 및 지정된 식이는 자유롭게 (ad libitum) 공급하였다. 개개 마우스의 체중을 격주마다 모니터링하였다.

[0122] **담즙염 유도된 지방 감소의 인 비보 모니터링**

[0123] 수컷 C57BL/6N 마우스를 우리에게 가두고 12 주 동안 고 지방 식이를 공급하였다. 담즙염의 인 비보 효과는 피하 지방 조직에 담즙염에 직접 주사함으로써 모니터링하였다. 요약하면, 식이 유도된 비만 이후, 마우스를 케타민 및 자일라진 (각각 60 mg/kg 및 12.5 mg/kg; 복강내 주사에 의해서 투여)으로 마취시켰다. 마우스의 주사 부위를 전자 클리퍼로 면도하였다. 100 µl의 담즙염 (DCA, CDCA, 및 CA, 1% w/v)을 비만 마우스의 우측 서혜부 지방 패드 내로 주사하였다. 주사는 2 주동안 4회 더 반복하였다. 마우스의 좌측 서혜부 지방 패드에도 대조군으로 동일 부위의 PBS를 주사하였다. 최종 주사 후 4일 경과 시점에서 마우스를 희생시켰다. 각 그룹 마우스의 체중 및 서혜부 지방 패드 중량을 측정하였다. 주사된 영역의 지방 조직을 절개하고, 10% 포르말린으로 고정하고, 조직학 검사를 위해서 파라핀 블록 내로 함침(embedded)시켰다.

[0124] **인 비보 피사 영역의 정량화**

[0125] 식이 유도된 비만의 유도 이후에, 마우스를 케타민 및 자일라진 (각각 60 mg/kg 및 12.5 mg/kg; 복강내 주사에 의해서 투여)으로 마취시켰다. 마우스의 주사 부위를 전자 클리퍼로 면도하였다. 100 µl 부위의 PBS 중 다양한 농도의 담즙염 (DCA, CDCA, 및 CA)을 비만 마우스의 서혜부 지방 패드에 주사하였다. 마우스는 주사 1일 경과 후 희생시켰다. 마우스 서혜부 지방 패드를 PBS 중 2% TTC (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO, USA)로 2 시간 동안 염색시킴으로써 비피사 및 피사 영역들을 확인하고, 이어서 대조를 뚜렷하게 하기 위해서 10% 포르말린 중에 침지시켰다. 피사 영역은 TTC에 의해서 염색되지 않은 영역으로 표시되었다. 피사 지방 영역의 출현 및 면적을 캡처한 다음 스캐너로 영상화하였다. DCA, CDCA, CA, 및 PBS로 처리된 지방 패드의 피사 영역은 Image J에 의해서 계산하였다.

[0126] **수성 용액 중 담즙염의 안정성**

[0127] 담즙염의 용해도 및 안정성을 시험하기 위해서, 다양한 pH의 인산 완충용액 (10 mM; pH 6.5, 6.7, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8.0, 8.3)을 이가염기 인산 나트륨 (dibasic sodium phosphate) 및 일가염기 인산 나트륨 (monobasic sodium phosphate)을 물에 용해시켜 제조하였다. 0.01 g의 담즙염 (UDCA, DCA, CDCA 및 CA)을 1 ml의 인산 완충용액에 용해시키고, 실온에서 10일 동안 방치하였다.

[0128] **담즙염의 조직 특이적 효과에 대한 인 비보 모니터링**

[0129] 100 µl의 DCA 및 CA (1%, 0.5% 및 0.25%), 및 PBS를 암컷 ICR 마우스의 꼬리 내로 (뿌리 쪽으로 1 cm 꼬리부) 주사하였다. 마우스는 이후 14일 경과 시점에서 희생시켰으며, 이때 주사 부위의 조직을 수집하여 4% 포르말린 중에 고정시켰다. 표준 조직학 단편을, 주사 부위 5 mm 이내에서 꼬리의 장축 방향에 수직으로 절단하였다. 이어서, 헤마톡실린 및 에오신 (H & E)으로 염색하기 위해서 샘플들을 제조하였다. Olympus 디지털 카메라를 구비한 Olympus 현미경으로 이미지들을 캡처하였다.

[0130] **피부에 대한 유해 사례 (adverse events)의 인 비보 모니터링**

[0131] 피부에 대한 담즙염의 유해 사례를 모니터링하기 위해서, 다양한 농도 (100 µl 부피 중 1.5%, 1% 및 0.5%)의 DCA, CA 및 PBS를 마우스의 옆구리에 피하로 주사하였다. 주사는 첫 번째 주사 후 3일경과 시점에서 1회 더 반복하였다. 최종 주사 후 4일 경과 시점에서 마우스를 희생시켰다. 피부 병변의 심각도를 하기 기준에 따라서 검사하였다. 총 피부 중증도 점수는 병변의 하기 특성들 각각 및 길이에 대한 개별 점수들의 합으로 정의하였다. 병변의 길이는 확인된 가장 큰 병변의 가장 큰 직경을 측정함으로써 결정하였다. 측정된 길이는 병변만을 포함하여야 하며, 임상적으로 정상인 피부를 가로질러서는 아니 된다. 각각의 주사 부위 내의 병변 포함 길이는 0

내지 3으로 점수 매겼으며, 여기에서 영향을 받은 부위의 길이가 0 = 미포함 (no involvement); 1 = ≤ 0.2 cm, 2 = 0.2 ~ 0.5 cm, 3 = > 0.5 cm이다. 병변의 특성은 0 내지 3으로 점수 매겼으며, 여기에서 0 = 병변 부존재, 1 = 오직 한 군데 찰과상 또는 하나의 작은 반점 껍질 (< 2 mm), 2 = 다중의 작은 반점 껍질 (punctuate crust) 또는 복합 껍질 (coalescing crust) (> 2 mm), 3 = 짓무름 또는 궤양이다.

[0132] **담즙염-유도된 족부 부종 (paw edema)**

[0133] 수컷 SD 랫트 (6 주령)는 Koatech Co. (대한민국, 서울)로부터 구입하였으며, 1주 적응 이후에 사용하였다. 랫트들 (200 ~ 230 g)은 무작위로 선택하였으며, 온전한 랫트 족부의 부피는 모든 그룹들에서 디지털 캘리퍼 (Bluebird, 대한민국, 서울)를 사용하여 측정하였다. 족부 부종을 유도시키기 이전에, 랫트들을 케타민 및 자일라진 (각각 60 mg/kg 및 12.5 mg/kg; 복강내 주사에 의해서 투여)으로 마취시켰다. 부종을 유도하기 위해서, 랫트들의 뒷발 발바닥 부위 내로 다양한 담즙염 및 PBS 100 μ l를 투여하였다. 족부 부피의 측정은 담즙염 주사 직전 및 주사 후 4 시간 경과 시점에, 캘리퍼에 의해서 수행하였다.

[0134] 실험 결과를 하기에 서술한다.

[0135] **담즙산 및 염의 생물학적 활성**

[0136] 담즙염 분자의 생물학적 활성은 히드록실기의 갯수 및 배향 또는 그 컨จู게이션과 같은 그의 화학적 특성과 강하게 연관되어 있다. 이러한 변수들은 독성 및 계면활성제 강도의 잘 알려진 예측인자 (predictor)인, 그의 소수성에 직접적으로 영향을 미친다. 담즙염의 친수성 지수는 히드록실기의 갯수에 비례할 뿐만 아니라, 스테롤 고리 양쪽에서 그들의 위치에 의해서도 영향을 받는다.

[0137] 담즙염의 계면활성제 능력은 그들의 독성에 직접적인 영향을 미친다. 일반적으로, 더 강한 계면활성제가 더 독성인 특성을 나타낸다. DCA는 담즙염 계열 중에서 가장 강한 계면활성제 중 하나로 알려져 있기 때문에 종종 세포를 용해하고 (lyse) 그 세포 성분들을 용해시키기 (solubilize) 위한 생물학적 계면활성제로서 사용되고 있다. 신체 지방 제거를 위하여 DCA를 사용하는 것은 중대한 유해 사례와 연관되어 있다. 심각한 부작용을 회피하기 위해서, DCA를 대체하기 위한 더 안전한 담즙염을 사용하는 것이 바람직하다. 그러나, 덜 독성인 담즙염은 더 약한 계면활성력 및 생물학적 활성을 보유할 것으로 예상된다.

[0138] 이러한 연유로, 세포 생존도를 측정하는 단순한 정량적 분석을 사용하여 DCA에 대한 다양한 담즙염의 세포 용해 활성을 비교하기 위하여 실험들을 수행하였다. 지방세포 용해 활성을 모니터링하기 위해서, 분화된 3T3-L1 지방세포 세포주를 사용하였다 (도 1). 세포 생존도는 MTT 분석을 사용하여 모니터링하였다. 예비 실험들에서, TUDCA, CDCA, CA, HDCA, UDCA 및 DCA를 포함하는 담즙염의 세포 용해 효과를 다양한 농도에서 비교하였다. 저농도에서 (예를 들어, 0.1% 미만), 오직 두 종류의 담즙염, DCA, CDCA만이 지방세포의 생존도를 감소시켰다 (도 2A). CDCA는 유사한 농도에서 DCA와 유사한 세포 용해 활성을 나타내었다. 고농도에서 나머지 담즙염의 용해 효과를 시험하기 위해서, 2% 농도까지의 CA 및 TUDCA를 사용하여 실험들을 수행하였다. TUDCA 처리는 지방세포의 생존도를 감소시키지 않았다. 그러나, CA는 이러한 고농도에서 세포 사멸을 나타내었다 (도 2B). HDCA 및 HDCA는 유사한 농도의 CA에 비해서 약간 더 높은 세포 사멸 효과를 나타내었다 (도 2C). CA, HDCA 및 UDCA의 세포 용해 활성은 DCA 및 CDCA보다 훨씬 더 낮았다. 각 담즙염의 상대적 세포 용해 활성을 비교하기 위해서, DCA, CDCA, HDCA, UDCA 및 CA의 EC₅₀ (세포의 50%를 사멸시키는 농도)을 측정하였다. DCA, CDCA, HDCA, UDCA 및 CA의 EC₅₀은 각각 0.051%, 0.060%, 0.42%, 0.25% 및 0.42%이었다 (표 1 참조). CA의 EC₅₀은 DCA 및 CDCA보다 약 7 내지 8배 높았다.

표 1

[0139] 인 비트로에서 지방세포의 용해에 요구되는 담즙염의 EC₅₀ 수치

계면활성제	EC ₅₀ (%w/v)
데옥시콜레이트 (DCA)	0.0509
케노데옥시콜레이트 (CDCA)	0.0597
콜레이트 (CA)	0.42

하이오데옥시콜레이트 (HDCA)	0.249
우르소데옥시콜레이트 (UDCA)	0.328

[0140] 인 비트로 조건으로부터의 결과는 DCA 및 CDCA가 효과적으로 지방세포를 용해시킬 수 있고, 따라서 지방용해 주사의 성분으로 고려될 수 있다는 것을 보여주었다. 임의의 특정 이론에 구애됨 없이, TUDCA가 세포 용해 효과를 나타내지 않은 점은, 아마도 계면활성이 낮기 때문일 수 있으며, 이는 TUDCA가 지방용해 주사로는 적합하지 않다는 것을 보여준다. 인 비트로 조건 하에서 CA, HDCA 및 UDCA의 매우 낮은 용해 활성은, 지방용해 주사 성분으로서 매우 고농도의 CA, HDCA 및 UDCA를 필요로 한다는 것을 보여준다. 따라서, 본 실시예에서 제시된 인 비트로 결과로부터, 지방용해 주사에 있어서 오직 CDCA만이 효과적으로 DCA를 대체할 수 있는 것으로 판단된다.

[0141] 그러나, 본 실시예에서 제시된 결과는 인 비트로 결과가 항상 실제 인 비보 상황을 대표하는 것은 아니라는 것을 입증한다. 예를 들어, 배양된 세포의 단층 (monolayer)은 온전한 조직 구조를 반영할 수 없다. 온전한 조직 내로 투과하는 것은 담즙염의 세포 용해 활성에 영향을 미칠 수 있기 때문에, 다양한 농도에서 DCA, CDCA, HDCA 및 CA의 엑스 비보 지방세포 조직 용해 효과를 시험하기 위한 실험을 수행하였다. 피하 지방 조직을 12주 동안 고지방 식이를 공급한 C57BL/6N 마우스로부터 신중하게 분리하였다. 지방 조직을 다양한 농도의 담즙염 용액 중에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 조직 용해 활성을 MTT 분석에 의해서 측정하였다 (도 3). 모든 4 종류의 담즙염 용액이 지방세포 조직 용해 효과를 나타내었다. DCA 및 CDCA는 배양된 세포로부터의 결과와 유사한 조직 용해 활성을 나타내었다. 엑스 비보 조건 하에서 각각의 담즙염의 상대 용해 활성을 비교하기 위해서, DCA, CDCA, HDCA 및 CA의 EC₅₀을 계산하였다. DCA, CDCA, HDCA 및 CA의 EC₅₀ 농도는 각각 0.0179%, 0.0180%, 0.0250% 및 0.0727%였다 (표 2). CA, HDCA의 용해 활성은 DCA 또는 CDCA보다 훨씬 더 낮았다. 그러나, 인 비트로 세포 배양 실험에서, CA의 EC₅₀이 DCA 및 CDCA보다 약 7 내지 8배 더 높았던 것과는 대조적으로, CA의 EC₅₀은 DCA 또는 CDCA에 비해서 단지 4배 더 높았다. 더 나아가, 인 비트로 세포 배양 실험에서, HDCA의 EC₅₀이 DCA 및 CDCA에 비해서 약 4 내지 5 배 더 높았던 것과는 대조적으로, HDCA의 EC₅₀은 DCA 또는 CDCA에 비해서 단지 1.4배 높았다.

표 2

[0142] 엑스 비보에서 지방 조직의 용해에 요구되는 담즙염의 EC₅₀ 수치

계면활성제	EC ₅₀ (%w/v)
데옥시콜레이트 (DCA)	0.0179
케노데옥시콜레이트 (CDCA)	0.018
콜레이트 (CA)	0.0727
하이오데옥시콜레이트 (HDCA)	0.0250

[0143] 엑스 비보 연구의 결과는 담즙염의 용해 활성이 인 비트로 결과로부터 단순하게 추정될 수 없다는 것을 보여준다. 엑스 비보 조건은 인 비트로 조건에 비해서 더욱 복잡하다. 예를 들어, 조직의 구조는 각각의 담즙염이 지방 세포로 투과하는데 영향을 주며, 조직 내 내부 구조의 존재 역시 담즙염의 용해 활성에 영향을 준다. 인 비트로 결과와 비교할 때, 엑스 비보 결과는 상대적으로 낮은 농도의 CA 또는 HDCA가 지방 조직을 용해시키는데 충분할 수 있다는 것을 암시한다. 그러나, DCA 또는 CDCA와 유사한 정도의 지방용해 활성을 얻기 위해서는 CA의 4배 더 높은 용량이 요구될 것이다.

[0144] 상기 엑스 비보 결과를 기초로, CA가 인 비트로보다는 인 비보 또는 엑스 비보 조건에서 DCA 또는 CDCA와 비교되는 지방 조직에 대한 유사한 용해 활성을 갖는다면, 주변 조직의 손상에 의해서 야기되는 유해 사례는 DCA 또는 CDCA 처리로부터 구별될 수 있을 것으로 가정하였다. 이를 시험하기 위해서, DCA, CDCA, 및 CA의 인 비보 지방 조직-용해 활성을 검사하기 위한 실험을 수행하였다. 인 비트로 및 엑스 비보 조건과는 달리, 인 비보 조건은 투여된 약물의 분배, 배설 및 대사와 같은 더욱 복잡한 양상 및 많은 변수를 갖는다. 담즙염 용액을 비만 마우스의 피하 지방 조직에 직접 적용하였다. 마우스의 비만은 60% 고지방 함유 식이를 C57BL/6N 마우스에 공급해 줌으로써 유도되었다. 고지방을 12주 동안 먹인 다음, 마우스의 체중은 대략 50 그램에 도달하였다 (도 4). 일 실험에서, 1%의 담즙염 용액을 서혜부 지방 조직에 2주 동안 5회 적용하였다. 식염수가 주사된 마우스와 비교할 때, 담즙염이 주사된 마우스는 감소된 체중 및 피하 지방 함량을 나타내었다. 흥미롭게도, 감소된 체중 및 지방

함량은 모든 3가지 종류의 담즙염에 대해서 유사하였다 (도 5A, 5B).

- [0145] 담즙염의 조직 용해 활성을 확증하기 위해서, 피하 지방 조직의 주사 부위를 관찰하였다 (도 6). 식염수 주사된 마우스로부터의 지방 조직에서는 뚜렷한 비정상 병변이 관찰되지 않았다. 담즙염 중 하나 (예를 들어, DCA, CDCA, 및 CA)가 주사된 마우스로부터의 지방 조직은 투여 영역 중에 황색 병변을 나타내었으며, 이는 피사 염증 부위를 나타낸다. 조직 조직학 (tissue histology)에 대한 담즙염의 효과는 주사 영역을 H & E 염색함으로써 모니터링하였다. 3가지 모든 담즙염의 주사에 의해서 식염수의 경우와 비교할 때 지방 조직 구조 (organization)의 현저한 파괴가 유도되었다. DCA, CDCA, 및 CA가 주사된 영역에서 섬유성 영역 (fibrotic area)이 관찰되었다. 임의의 특정 이론에 구애됨이 없이, 이는 담즙염의 반복 투여가 반복된 염증 (recurrent inflammation)에 의한 조직 섬유증 (fibrosis)을 야기할 수 있는 것으로 판단된다.
- [0146] 이러한 결과는 3가지 모든 담즙염이 살아 있는 마우스에서 지방용해 활성을 가지며, DCA, CDCA, 및 CA의 인 비보 효과가 동일한 농도에서 유사하다는 것을 나타낸다. 인 비트로 또는 엑스 비보 조건과는 대조적으로, 인 비보 조건 중 CA로 반복 투여함으로써 얻어지는 지방용해 효과는 DCA 또는 CDCA의 효과와 양립가능하다.
- [0147] 비록 마우스에서 체중 및 지방 질량의 감소가 담즙염 처리에 기인한 것이지만, 주사된 담즙염으로부터의 유해 효과 및 마취 과정보다 담즙염 처리된 마우스에서의 체중 감소에 영향을 줄 수 있는 것으로 판단된다. 담즙염의 인 비보 효과를 검증하기 위해서, 살아 있는 마우스에서 담즙염의 조직 용해 활성을 직접 모니터링하였다 (도 7 내지 도 9).
- [0148] 지방 조직의 피사 영역을 정량하기 위해서, TTC 용액을 사용하는 새로운 실험 방법을 개발하였다. TTC는 특히 허혈성 쇼크 이후에 경색 영역을 나타내는, 생물학적 실험들에서 통상적으로 사용되는 산화환원 지시자 (redox indicator)이다. TTC는 다양한 히드로게나아제의 활성으로 인하여 살아있는 조직 중에서 적색 1,3,5-트리페닐포르마잔으로 효소적으로 환원되는 반면에, 피사 영역에서는 백색으로 남아 있다. TTC 염색 이후에, 피사성 백색 영역과 살아 있는 적색 영역의 사이에서 구별되는 경계들이 형성되었다 (도 7). 백색 피사 영역은 영상 분석 프로그램에 의해서 용이하게 측정된다. 이러한 새로운 방법은 담즙염과 같은 화학물질의 조직 피사 효과의 더욱 정확한 계산법을 제공하며, 다양한 물질의 조직 용해 효과의 비교를 가능케 한다.
- [0149] 다양한 용량의 DCA, CDCA 또는 CA를 비만 C57BL/6N 마우스의 서혜부 지방에 주사하였다. 담즙염 주사 후 1일 경과 시점에서, 주사된 마우스의 피하 지방 중 피사 영역들을 측정하였다 (도 8 및 도 9). 주사된 담즙염의 농도가 증가하면, 피사 영역들도 비례하여 증가하였다. DCA 및 CDCA는 인 비트로 및 엑스 비보 데이터를 반영하는 동일한 투여량에서 유사한 조직 피사를 나타내었다. CA 처리된 마우스의 피사 영역들은 동일한 농도에서 DCA 또는 CDCA보다 더 작았다. 그러나, 대략 2배 정도 높은 농도의 CA는 DCA 및 CDCA와 유사한 피사 효과를 나타내기 에 충분하였다. DCA, CA, CDCA 주사 이후의 대표적 이미지들을 도 9에 도시하였다.
- [0150] 종합하면, DCA 또는 CDCA에 대한 CA의 상대적 조직 용해 효과는 인 비트로, 엑스 비보, 및 인 비보 조건에서 상이하하였다. 일반적으로, 활성 시약 (active reagent)으로부터의 인 비보 투여량 효과는 인 비트로 또는 엑스 비보 실험에 의해서 추측될 수 있다. 그러나, 많은 경우에서, 신체 내의 예기치 않은 효과가 시약의 실제 생물학적 활성에 영향을 준다. 따라서, 인 비트로 또는 엑스 비보 결과가 인 비보 조건에 대한 것으로 용이하게 해석될 수 없다. 본 실시예에서 제시된 인 비트로 및 엑스 비보 데이터는 DCA 또는 CDCA와 비교할 때, CA가 조직을 용해하기 위해서는 4배 더 많은 고용량이 요구된다는 것을 보여준다.
- [0151] 그러나, 인 비보 데이터는 실제 지방 용해 효과를 나타내기 위해서 이와 같이 더 높은 용량의 CA는 필요하지 않다는 것을 입증한다. 담즙염의 계면활성제 활성은 지방 또는 단백질의 가용화 힘 (solubilizing power)을 나타낸다. 따라서, 세포 용해 활성은 계면활성제의 활성과 비례하는 것으로 예상된다. DCA 및 CDCA는 CA 보다는 더 강한 계면활성제 활성을 갖기 때문에, 이들 역시 더 높은 세포 용해 활성을 나타낸다. 그럼에도 불구하고, 담즙염의 인 비보 세포 용해 활성은 단순히 담즙염의 계면활성제 능력을 나타내는 것은 아니다. 이러한 CA의 예기치 않은 지방 용해 효과는 CA를 지방용해 주사의 활성 성분으로서, 특히 인 비트로 및 엑스 비보 결과로부터 예측되지 않았던 농도에서, 사용할 수 있도록 한다.
- [0152] 용액 중 염의 농도 또한 담즙염의 계면활성제 활성에 영향을 줄 수 있다. 담즙염의 지방 용해 활성에 대한 염화나트륨 농도의 영향을 시험하였다. 식이 유도된 비만 마우스로부터의 서혜부 지방 조직을 다른 농도의 염화나트륨을 함유한 다양한 용액 중에서 인큐베이션하였다. 각 담즙염의 농도는 pH 7.4 중에서 EC₅₀으로 조정하였다. 그러나, 나트륨 염의 다양한 농도의 처리는 개별적인 담즙염의 지방 용해 활성에 어떤 차이를 야기하지 않았다 (도 10).

[0153] 계면활성제 용액의 pH는 미셀 형성 및 계면활성제 활성화에 영향을 줄 수 있다. 지방 용해 활성화에 대한 담즙염의 pH 효과를 시험해보기 위해서, 식이 유도된 비만 마우스로부터의 서혜부 지방 조직을 DCA, CDCA, HDCA 및 CA의 다양한 pH 조건 (pH 6.0 ~ pH 9.0) 중에서 인큐베이션하였다. 담즙염 용액의 pH는 인산염 완충용액으로 조정하였다. 각 담즙염의 농도는 pH 7.4 중에서 EC₅₀으로 조정하였다. 흥미롭게도, 용액의 pH가 증가하면 CDCA, HDCA 및 CA의 지방용해 활성이 크게 감소하였다 (도 11). DCA의 경우에는, 더 낮은 pH 용액 중에서 DCA의 침전이 관찰되었다. 결과적으로, CA, HDCA 또는 CDCA의 경우와 비교할 때, DCA의 더 높은 완충용액의 pH는 지방 용해 활성을 크게 감소시키지 않았다. pH 9 초과인 CA 및 CDCA 용액은 지방 용해 활성을 거의 상실하였다. 따라서, CA 또는 CDCA 용액을 사용하여 효과적으로 지방을 용해시키기 위해서는 9 미만의 pH가 요구된다.

[0154] 담즙염의 안정성은 용액의 pH에 영향을 받는다. 다양한 인산염 완충용액 (10 mM; 25 °C에서 pH 6.5, 6.7, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8.0, 8.3) 조건 중 1% (w/v) 담즙염의 안정성을 시험하기 위해서 실험을 수행하였다(도 12). 더 낮은 pH에서, 담즙염의 침전 또는 겔화가 관찰되었다. DCA, CDCA, HDCA, UDCA 및 CA의 수용액은 각각 8.3, 7.4, 7.4, 7.8 및 7.0보다 낮은 pH에서 안정적으로 유지되었다 (표 3). 일반적으로, 주사 부위에서 불편함 또는 통증은 정상적인 생리학적 pH보다 낮거나 또는 높은 pH의 용액에 의해서 야기된다. CDCA, HDCA 및 CA는 정상적 pH에서 안정한 특성을 갖기 때문에, 이들을 주사 성분으로 사용하는 것은 DCA 및 UDCA와 같은 다른 담즙염을 사용하는 것에 비해서 불편감 및 통증을 감소시킬 수 있을 것으로 예측된다.

표 3

[0155] 다양한 pH 중 담즙염 용액의 안정성 (25 °C, 10 mM 인산염 완충용액 중 1%)

pH	6.5	6.7	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0	8.3
DCA	겔화	겔화	겔화	겔화	겔화	겔화	겔화	겔화	안정적
CA	침전	침전	안정적	안정적	안정적	안정적	안정적	안정적	안정적
CDCA	겔화	겔화	겔화	침전	안정적	안정적	안정적	안정적	안정적
HDCA	겔화	겔화	겔화	겔화	안정적	안정적	안정적	안정적	안정적
UDCA	침전	침전	침전	침전	침전	침전	안정적	안정적	안정적

[0156] DCA 용액이 생리학적 pH에서는 안정적이지 않다는 점을 고려하면, 지방용해 주사를 위한 DCA 용액의 제제는 pH 8.3보다 높아야 한다. 더 높은 pH를 갖는 담즙염 용액은 더 낮은 조직 용해 활성을 나타낸다. CA, CDCA, UDCA, 및 HDCA 용액은 더 낮은 pH에서 안정하기 때문에, 더 적은 양의 CA, CDCA, UDCA 및 HDCA로도 높은 pH DCA 용액과 유사한 조직 용해 효과를 나타내기에 충분할 것으로 예상된다. 이를 시험하기 위해서, pH 8.3 조건의 1% DCA 용액과 유사한 조직 용해 활성을 나타내는 농도를, 다양한 농도의 CA (pH 7.0) 및 CDCA (pH 7.4)로 주사한 후 조직 괴사 영역을 모니터링함으로써 선택하였다. pH 8.3 조건의 DCA 용액의 조직 용해 활성은 pH 7.4 조건의 DCA 제제의 활성화에 비해서 더 낮은 것으로 관찰되었다. 동일한 pH 조건 (pH 7.4)에서, 약 2% CA 또는 약 1% CDCA 용액의 주사는 1% DCA의 주사와 유사한 조직 용해 활성을 나타내었다. 그러나, 1.5% CA (pH 7.0) 또는 0.6% CDCA (pH 7.4)의 농도는 더 높은 pH (pH 8.3)를 갖는 1% DCA와 유사한 조직 용해 효과를 나타내기에 충분하였다 (도 12 A). 생리학적 pH 및 저농도의 담즙염 용액은 유해 사례의 감소와 같은 추가적인 잇점을 제공할 수 있다.

[0157] CDCA 및 CA와는 달리, UDCA 또는 HDCA의 조직 용해 효과는 그 농도가 더 높아지더라도 비례적으로 증가하지 않았다 (도 12B 및 12C). 흥미롭게도, UDCA 또는 CDCA를 피하 지방에 1회 주사함으로써 주사된 부위에서 황색 구조가 유도되었다 (도 13A). H&E 염색은 다량의 다형핵 (polymorphonuclear: PMN) 세포가 주사 부위로 침윤된다는 것을 나타낸다 (도 13B). 황색 구조는 UDCA 또는 HDCA 주사 이후에 PMN-풍부 삼출물 (PMN-rich exudates) (고름)의 형성의 결과인 것으로 예측되었다. UDCA 또는 HDCA 주사에 의한 PMN 세포의 침윤 및 염증이 UDCA 또는 HDCA의 괴사 활성화에 영향을 주는 요인일 수 있다. UDCA 또는 HDCA를 피하 지방에 주사한 이후에 심각한 염증이 관찰되는 것은, UDCA 또는 HDCA는 지방용해 주사의 성분으로서 사용되기에 적합하지 않다는 것을 나타낸다.

[0158] 담즙염은 간에서 타우린 또는 글리신과 콘주게이션된다. 타우린 또는 글리신이 담즙염에 콘주게이션되는 것이 지방세포 용해 활성화에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 실험을 수행하였다. 글리신 또는 타우린과 콘주게이션된 형태의 CA, CDCA 및 DCA를 분화된 지방 세포에 처리하였다 (도 14 및 도 15). 글리신 또는 타우린 콘주게이션된 담즙염의 세포 용해 활성은 콘주게이션되지 않은 형태의 담즙염의 그것과 거의 동일하였다. 이러한 결과는 글리신 또는 타우린이 담즙염과 콘주게이션되는 것은 세포 용해 활성화에 거의 영향을 미치지 않는다는 것을

보여준다.

[0159] 다양한 조건 하에서 지방 용해의 다른 양상들이 또한 다른 조직에서 발생할 수도 있다. 비록 인 비트로 조건 하에서 지방 세포의 분해 효과와 근육 세포의 분해 효과에 큰 차이점이 존재하지 않지만, 개별적인 조직 용해 활성은 인 비보 조건 하에서 달라질 수 있다. 따라서, 만약 일부 담즙염이 지방 조직에 비해서 감소된 피부 또는 근육 용해 활성을 나타낼 수 있다면, 증가된 안전성을 갖는 지방분해 시약이 개발될 수 있다. 이를 시험하기 위해서, pH 7.4 용액 중 다양한 농도의 DCA 및 CA를 마우스 꼬리에 주사하고, 꼬리의 조직 견고성 (integrity)을 평가하였다 (도 16). 꼬리는 지방, 근육 및 피부로 구성되기 때문에, 개별적인 조직 층들의 견고성은 한 번에 용이하게 모니터링될 수 있다. 꼬리의 지방층은 식염수 주사와 비교할 때 DCA 및 CA 주사 모두에 의해서 파괴되었다. 흥미롭게도, 동일 농도의 CA가 주사된 꼬리에 비해서, DCA 주사된 꼬리에서 근육의 손상이 두드러졌다. DCA 또는 CA 주사된 마우스의 피부층은 두 경우 모두에서 심각하게 손상되지는 않았다.

[0160] 부종 (edema)은 DCA 주사에 의해서 야기되는 전형적인 유해 사례 중 하나이다. 부종의 심각도는 담즙염 주사 후 랫트 발의 두께에 의해서 모니터링하였다 (도 17). 담즙염 용액의 제제는 유사한 조직 용해 효과를 나타내는 농도 및 pH로 조정되었다 (도 17A 및 17B). 동일한 부피의 PBS 주사는 발 두께의 증가를 보이지 않았다. 대조적으로, 담즙염의 주사에 의해서는 랫트 발의 두께가 증가하였다. 비록 모든 담즙염 조성들에서 조직 괴사 활성은 유사하였지만, 부종의 심각성은 각 담즙염에서 달랐다. DCA가 투여된 발이 가장 심각한 부종 표현형을 나타내었다. UDCA, HDCA 및 CDCA는 DCA와 비교할 때 주사 후 약간 더 낮은 증상을 나타내었다. 가장 놀랍게도, CA 주사에 의해서 유도된 부기 (swelling)는 DCA와 비교할 때, 매우 온건한 정도였다. CA에 의한 발 두께의 증가는 DCA의 경우에 비해서 절반 미만이었다. 이러한 결과는 동일한 pH (pH 7.4)를 갖는 담즙염 용액의 처리에 의해서 재현되었다 (도 17C 및 17D). 이전의 실험과 거의 동일한 결과는, pH는 담즙산 주사 이후 부종에 영향을 미치는 요인이 아니라는 것을 나타낸다 (도 17E).

[0161] 다음으로, 피부층에서 담즙염의 유해 효과에 대해서 시험하였다. 다양한 농도의 담즙염 (pH 7.4로 조정) 및 PBS를 살아있는 마우스의 피부 아래에 주사하였으며, 상기 피부에 대해서 관찰되는 손상을 모니터링하였다 (도 18). PBS 처리된 마우스의 피부에서는, 검출가능한 병변이 관찰되지 않았다. DCA로 처리함으로써 주사된 영역에서 심각한 피부 병변이 야기되었다. 가장 낮은 용량 (0.5%)으로 DCA를 처리한 경우라도 피부 상에서 작은 반점 병변이 유도되었다. 큰 병변, 깃무름 (erosion) 및 궤양이 더 높은 농도로 DCA가 주사된 부위에서 관찰되었다. DCA와는 대조적으로, CA로 주사한 경우에는 주사된 영역에서 현저하게 적은 병변이 형성되었다. CA의 고용량 (1.5%)에서 오직 작은 반점 병변만 관찰되었다. 더 낮은 용량에서는, 어떠한 검출가능한 병변도 CA 처리된 마우스의 피부에서 관찰되지 않았다. 피부 손상은 담즙염의 주사 부위 상에 형성된 병변의 크기 및 심각도에 의해서 점수를 매겼다. 가장 높은 용량으로 CA를 처리한 경우라도 (1.5%) 가장 낮은 용량으로 DCA를 처리한 경우에 비해서 (0.5%) 더 낮은 손상 점수를 나타내었다. 이러한 결과는 CA 처리가 DCA 처리에 비해서 피부 중에서 현저하게 감소된 유해 사례를 야기한다는 것을 나타낸다.

[0162] 흥미롭게도, 오직 상업적으로 구입가능한 지방용해 주사의 성분인 DCA만이 생리학적 pH에서 불안정성을 나타내고 다른 담즙염에 비해서 주사 후에 더욱 심각한 유해 사례를 야기시켰다. 시험되어진 담즙염 중에서, TUDCA는 인 비트로 시험에서 세포 용해 활성을 갖지 않았으며, 추가 분석으로부터 배제되었다. 비록 UDCA 및 CDCA는 인 비트로 및 엑스 비보 시험에서 온건한 세포 용해 활성을 나타내었지만, 이들은 인 비보 시험에서 적당한 조직 용해 활성을 나타내지 않았다. 이러한 화합물은 또한 주사 부위에서 심각한 염증을 나타내었다. 결과적으로, CDCA 및 CA가 이들 시험되어진 담즙염 중에서 지방용해 주사를 위한 적당한 성분으로 선택되었다. 상기 실험의 결과를 하기 표 4에 요약하였다.

표 4

본 연구에서 시험되어진 담즙염의 특성

[0163]

	DCA	CDCA	UDCA	HDCA	TUDCA	CA
인 비트로 세포 용해 효과	+++	+++	+	++	-	+/-
엑스 비보 세포 용해 효과	+++	+++	n.d.*	++	n.d.*	+
인 비보 세포 용해 효과	+++	+++	+	+	n.d.*	++
pH 안정성	<8.3	<7.4	<7.8	<7.4	n.d.*	<7.0

주사 부위의 염증	+/-	+/-	+++	+++	n.d.*	+/-
유해 사례: 부종	+++	++	++	++	n.d.*	+
유해 사례: 피부	+++	++	+	+	n.d.*	+

[0164] * n.d.: 측정되지 않음

[0165] 본 실시예에서 제시된 결과는 개별적인 담즙염에 의한 지방 용해 효능을 평가한 최초의 연구인 것으로 판단된다. 비록 계면활성제의 강도가 담즙염의 지방 용해 효과의 핵심적 결정인자 (critical determinant)일지라도, 인 비트로, 엑스 비보 및 인 비보 조건에서 다른 투여량 반응은, 개별적인 담즙염의 용해 효과가 그의 환경에 의해서 조절될 수 있다는 것을 암시한다. CA가 인 비보에서 예기치 않은 높은 용해 활성을 나타내고 주사된 영역에서 감소된 유해 사례를 나타낸다는 것은 더욱 안전한 지방용해 주사의 개발을 촉진한다.

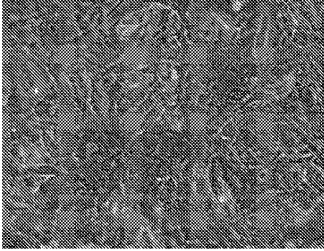
[0166] 본 실시예에서 제시된 결과는 더 낮은 pH가 담즙염의 세포 용해 활성을 향상시킬 수 있기 때문에, 본 실시예에서 개시된 실험에서 사용된 pH와 같은 더 낮은 pH에서, 더 낮은 담즙염의 농도가 사용될 수 있다는 것을 입증한다. 그러나, 본 실험들에서 사용된 더 낮은 pH가 담즙염 제제의 유해 효과를 증가시키지는 않았다. 이러한 결과는 유해 효과가 적당한 pH 조건에서 세포 용해 활성으로부터 구분될 수 있다는 것을 입증한다. 따라서, 더 낮은 농도 및 더 낮은 pH의 담즙염을 사용하는 것은 세포 용해 활성의 감소 없이도 유해 효과를 감소시킬 수 있다. 더 나아가, 중성 pH는 주사 통증과 관련된 유해 효과를 감소시킬 수 있다.

[0167] 본 명세서에서 인용된 각각의 또한 모든 특허, 특허 출원, 및 간행물의 개시는 그 전체로서 인용에 의해서 본 명세서에 통합된다. 본 발명이 비록 특정 구현예들을 참조하여 개시되었지만, 본 발명의 다른 구현예들 및 변형물들이 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 기술을 가진 자들에 의해서, 본 발명의 진정한 정신 및 범위로부터 벗어남 없이 고안될 수 있다는 것은 명백하다. 첨부된 특허청구범위는 그러한 모든 구현예들 및 균등한 변형물들을 포함하도록 해석되어야 한다.

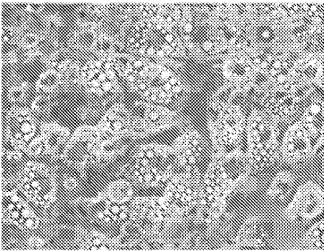
도면

도면1

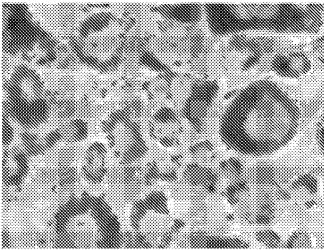
A



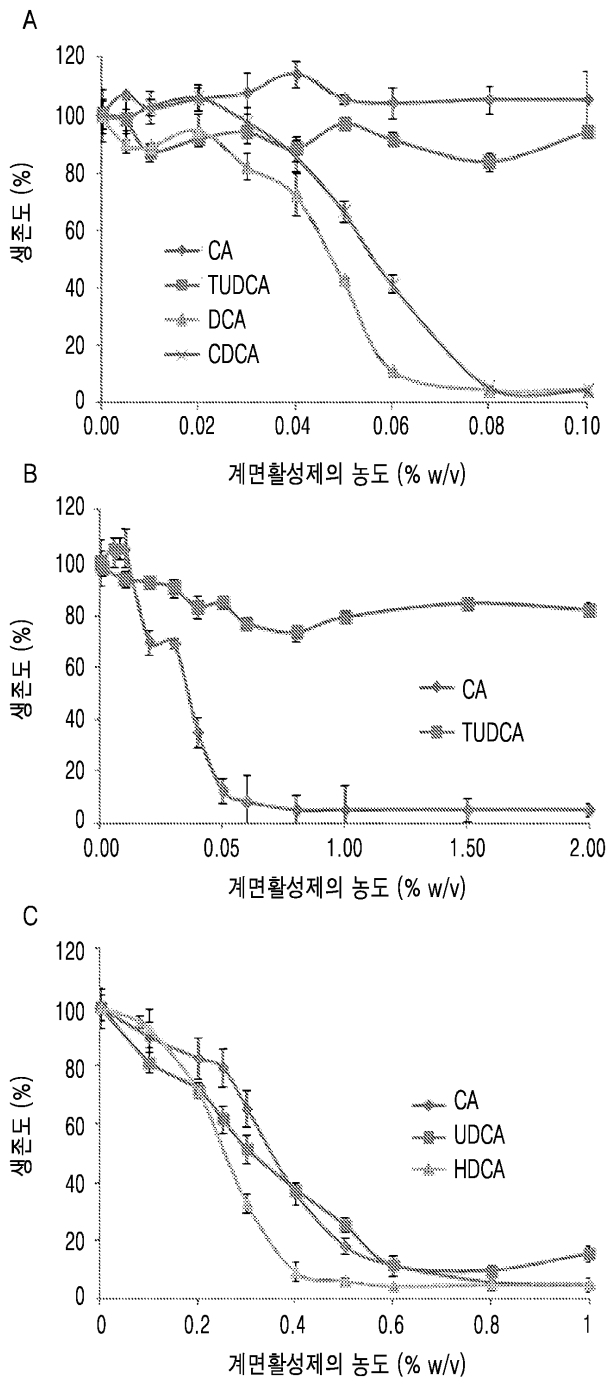
B



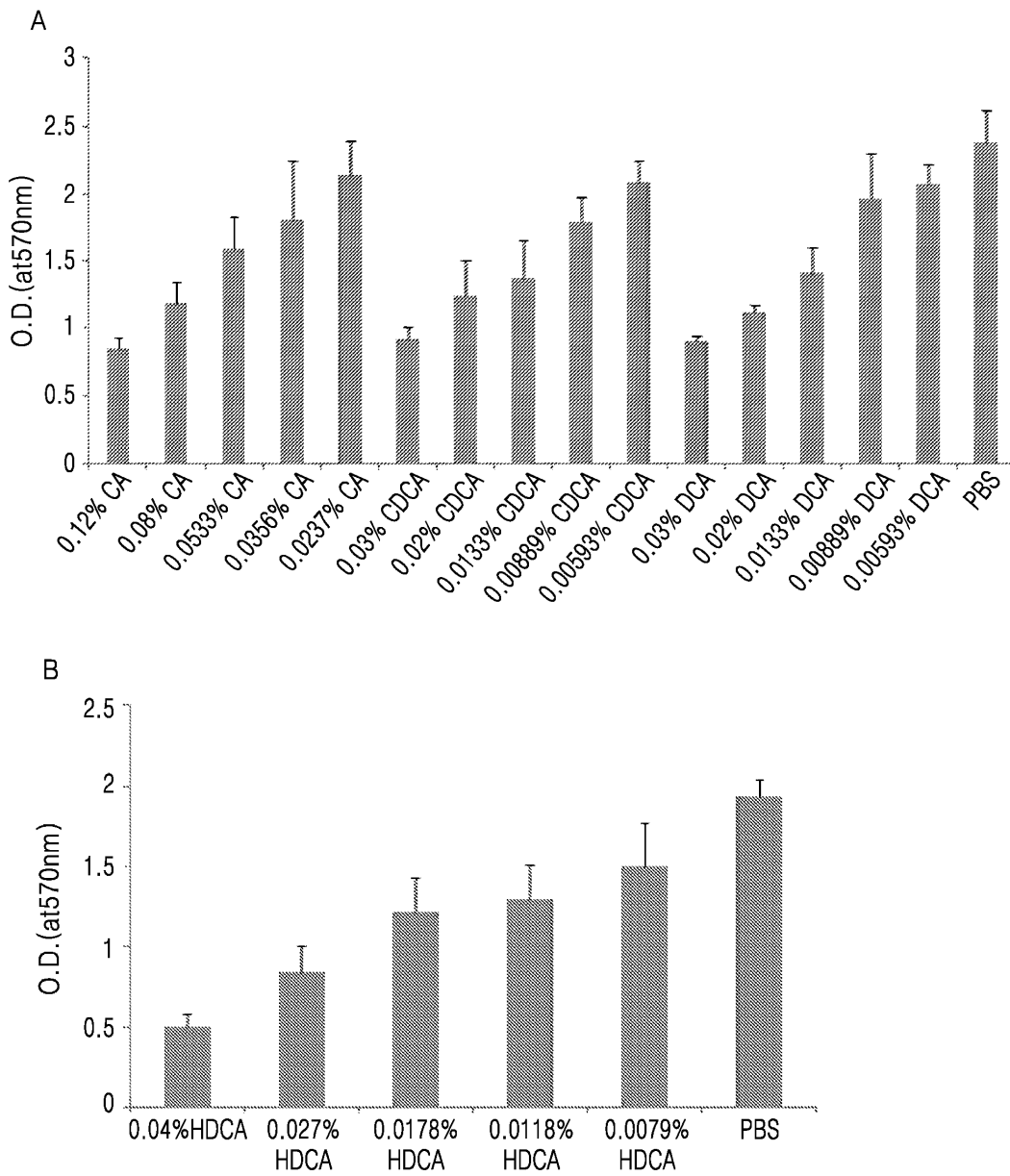
C



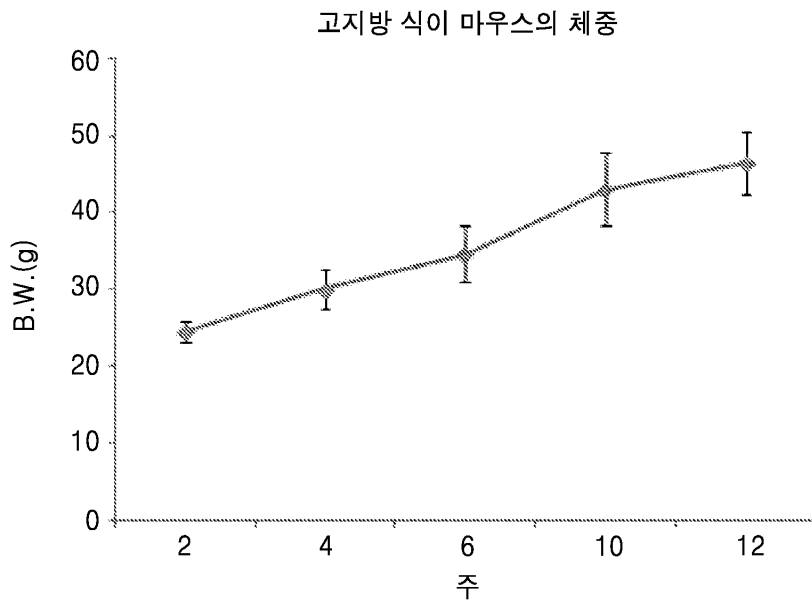
도면2



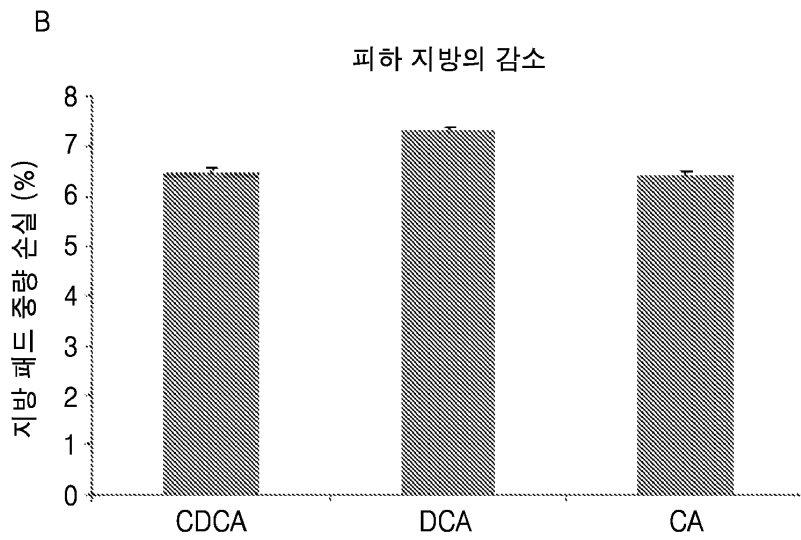
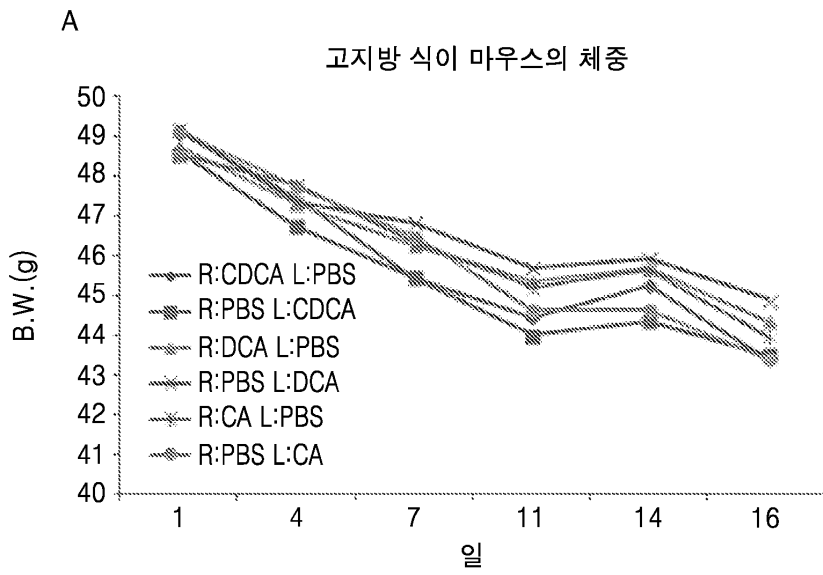
도면3



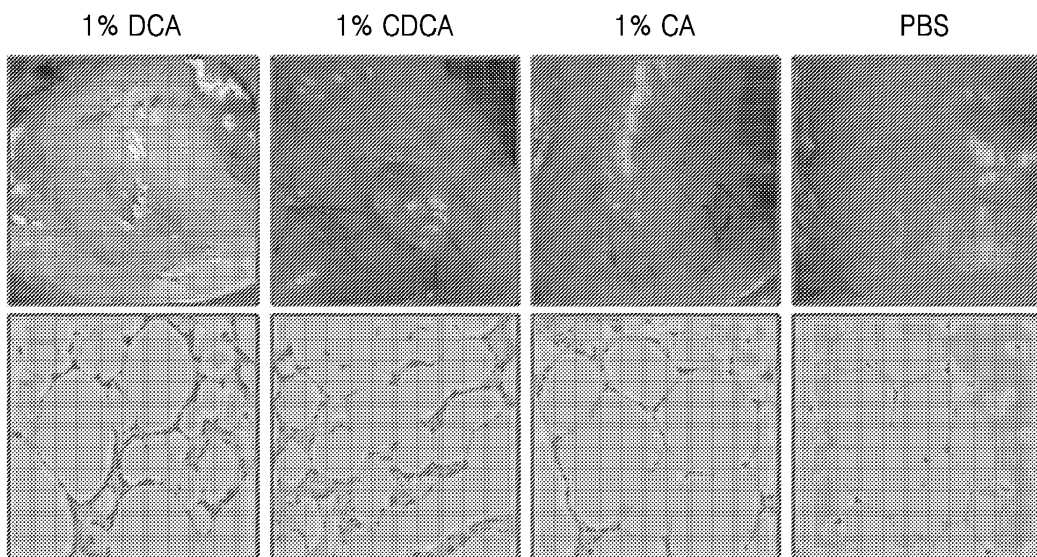
도면4



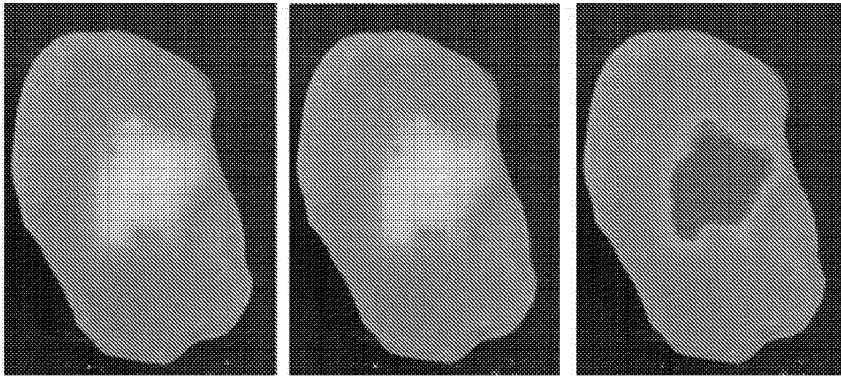
도면5



도면6

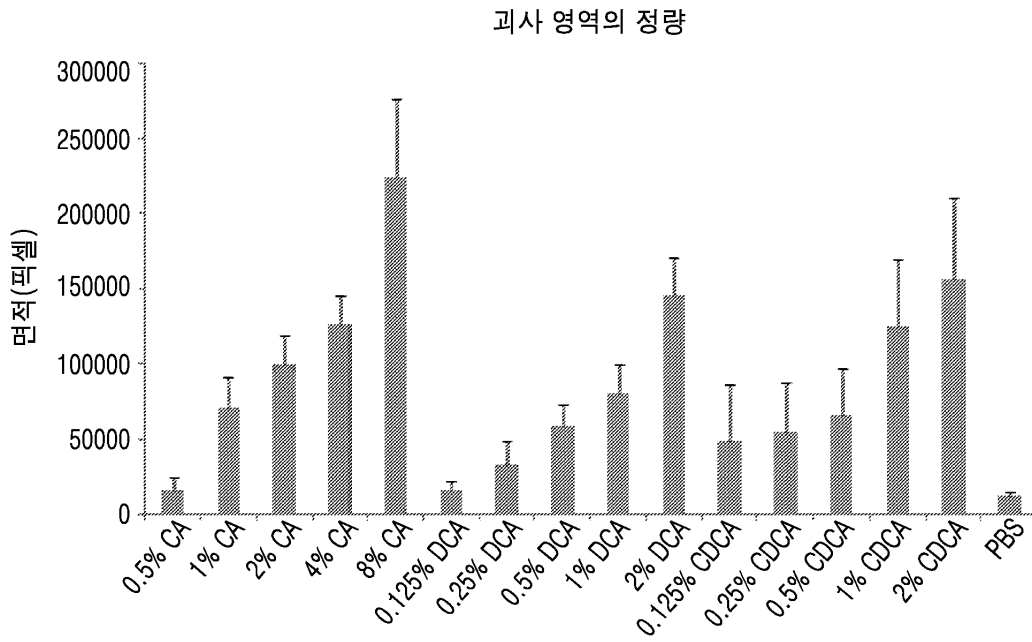


도면7

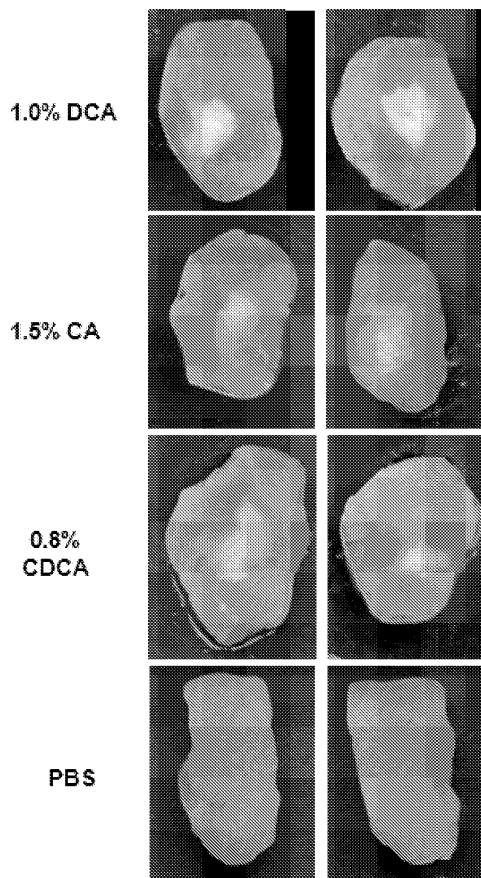


<1.5% CA>

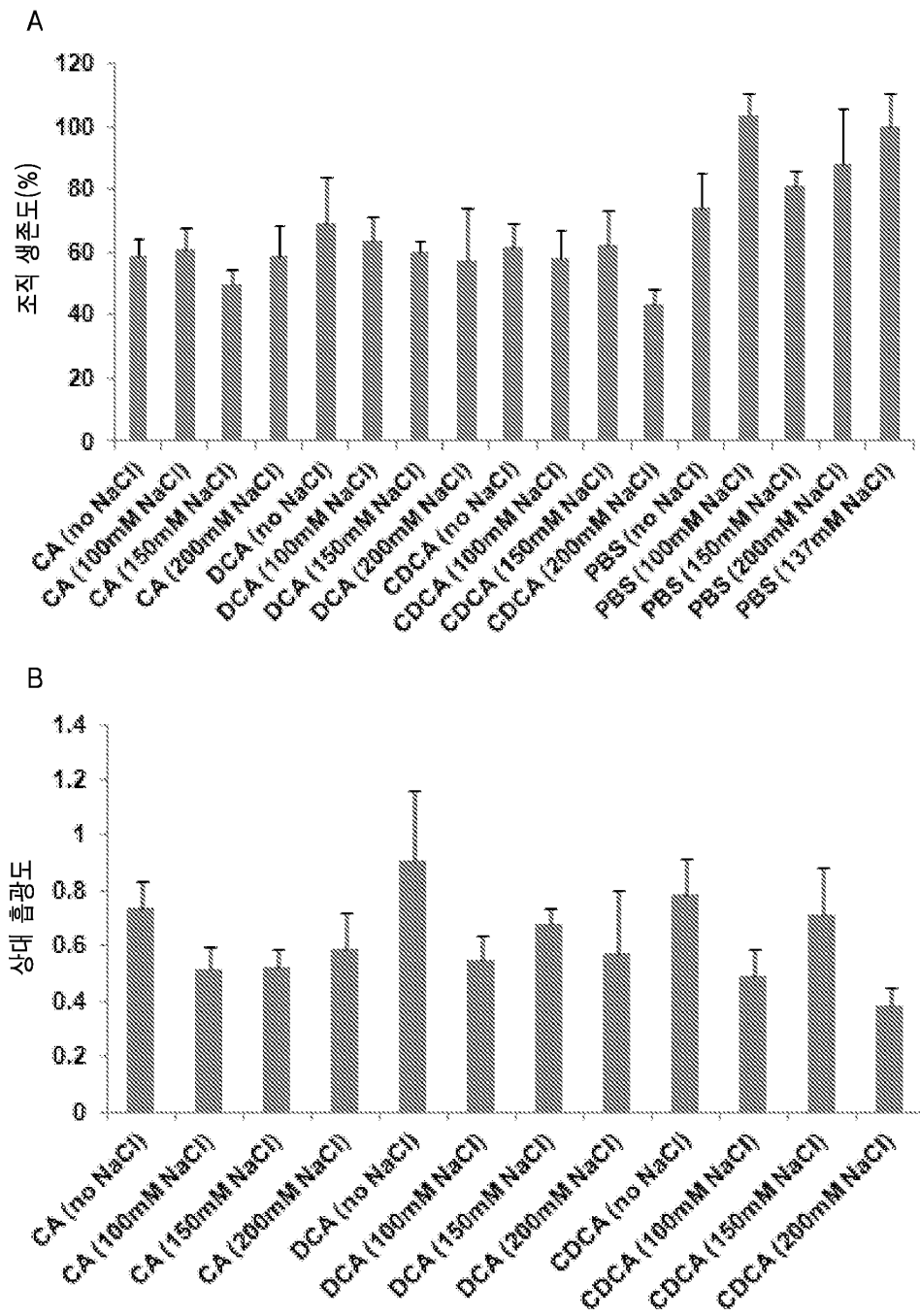
도면8



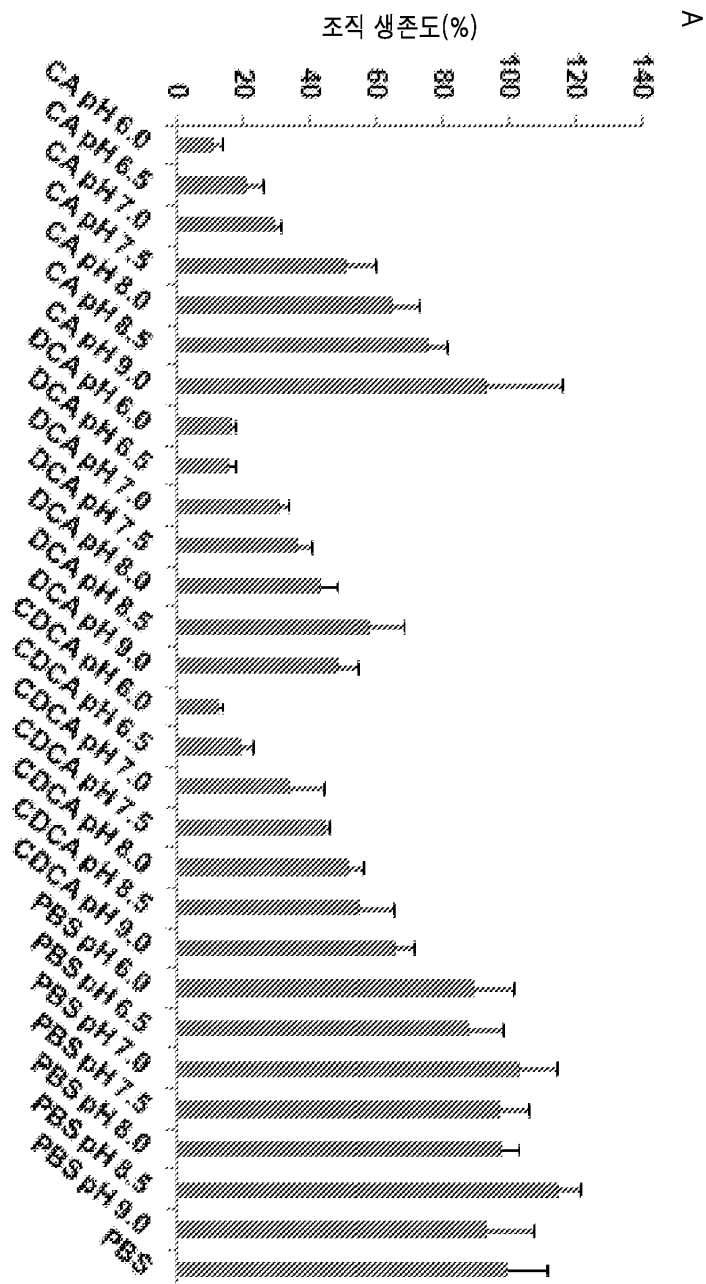
도면9



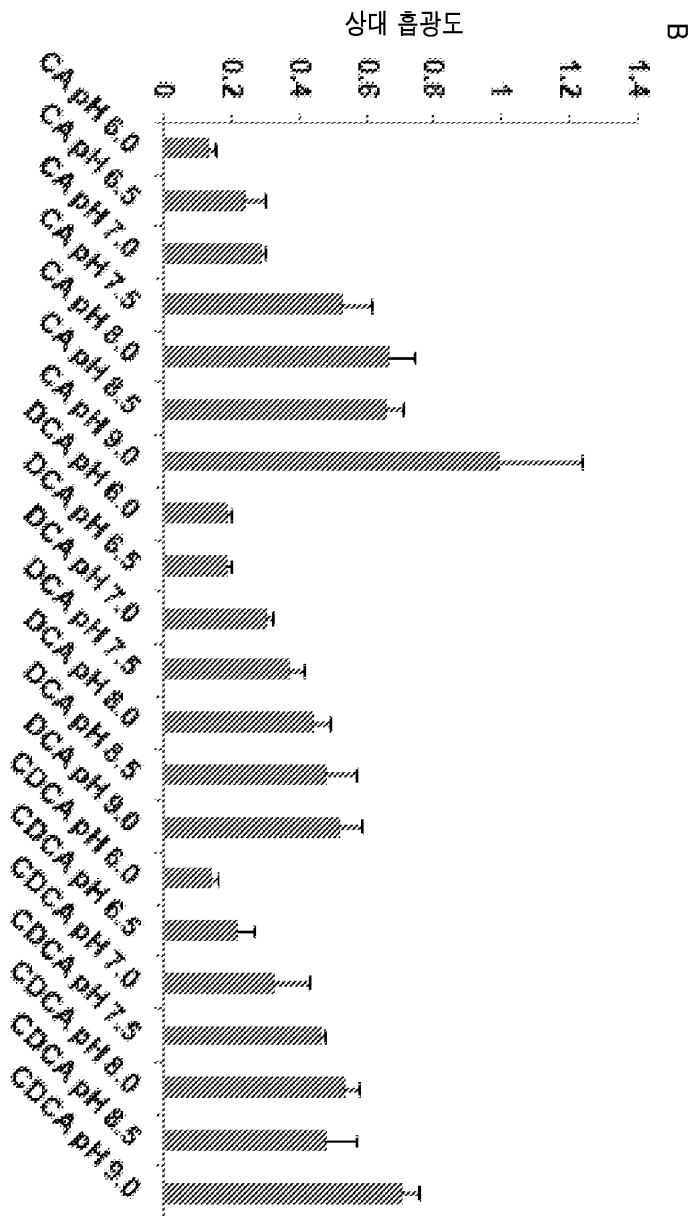
도면10



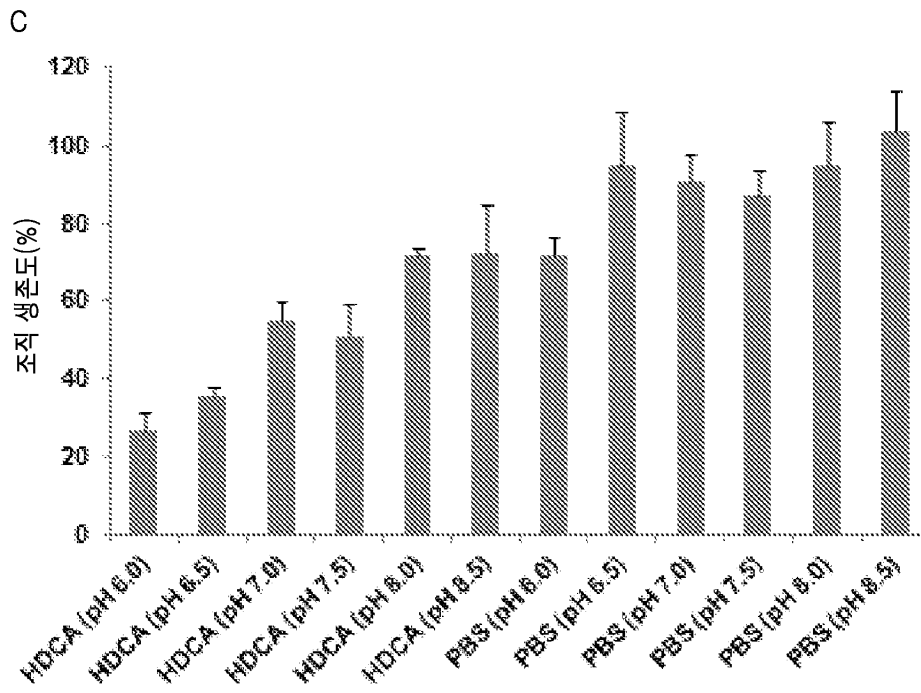
도면11a



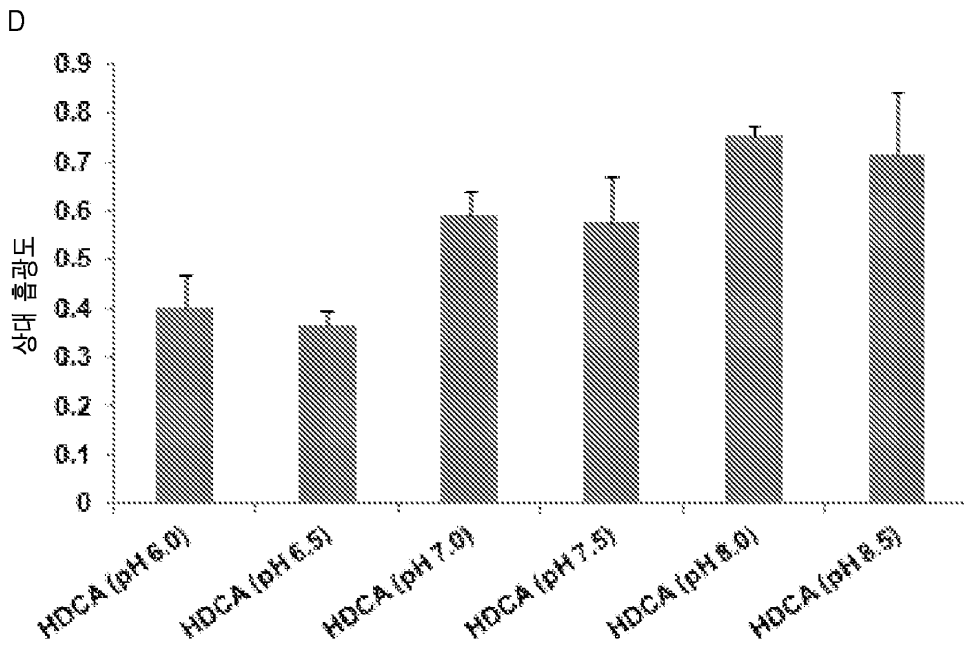
도면11b



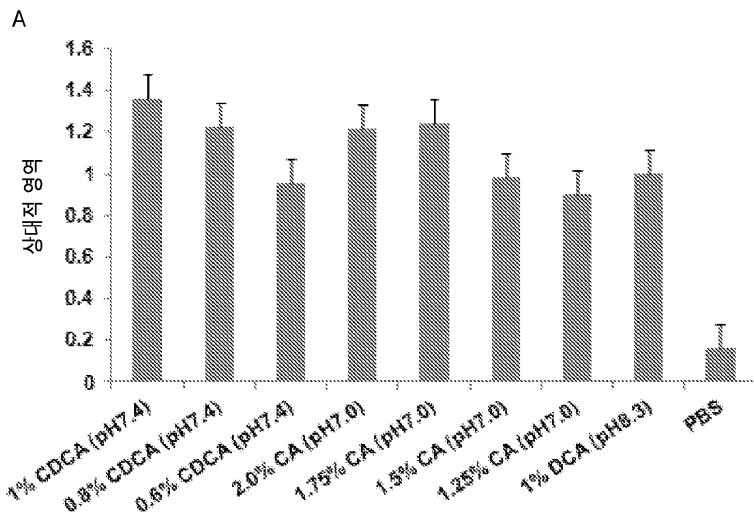
도면11c



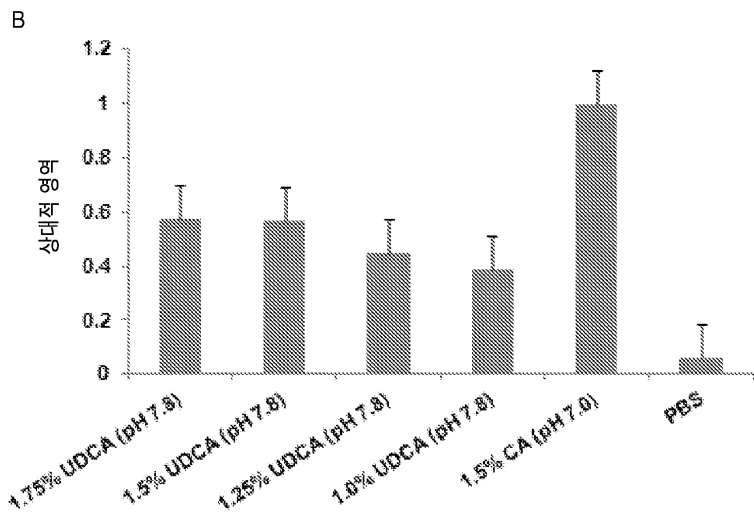
도면11d



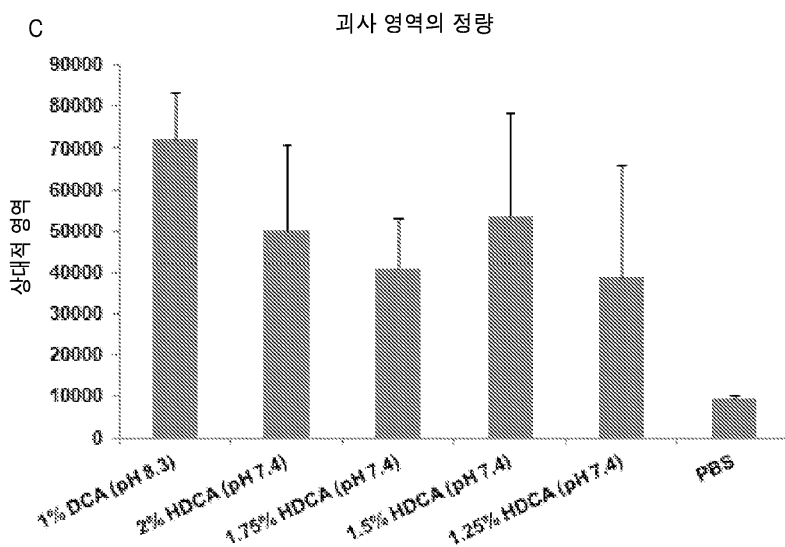
도면12a



도면12b

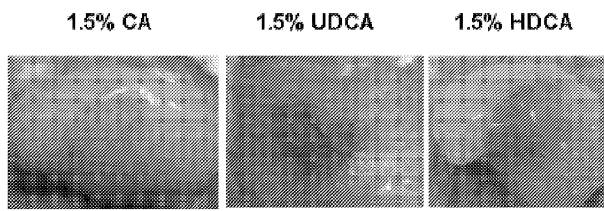


도면12c

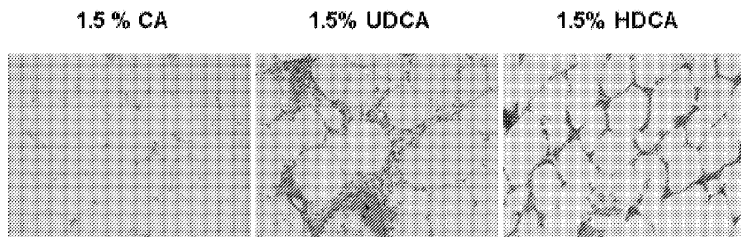


도면13

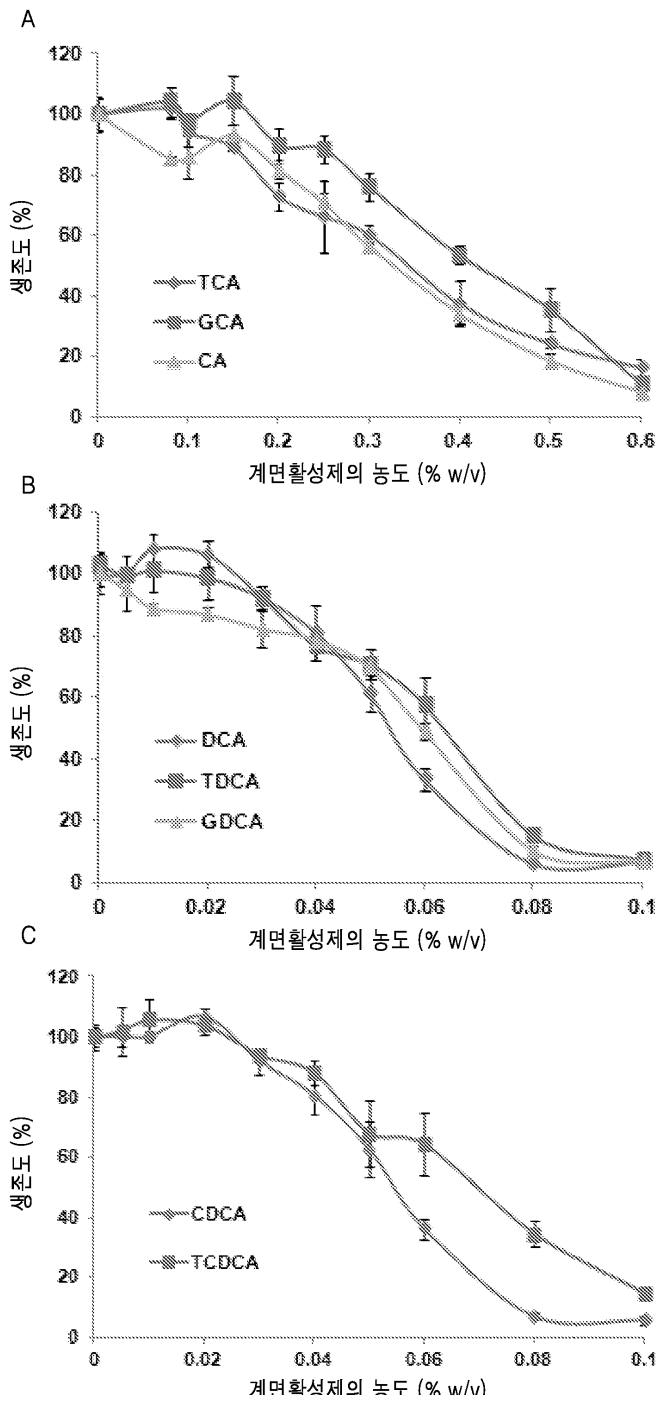
A



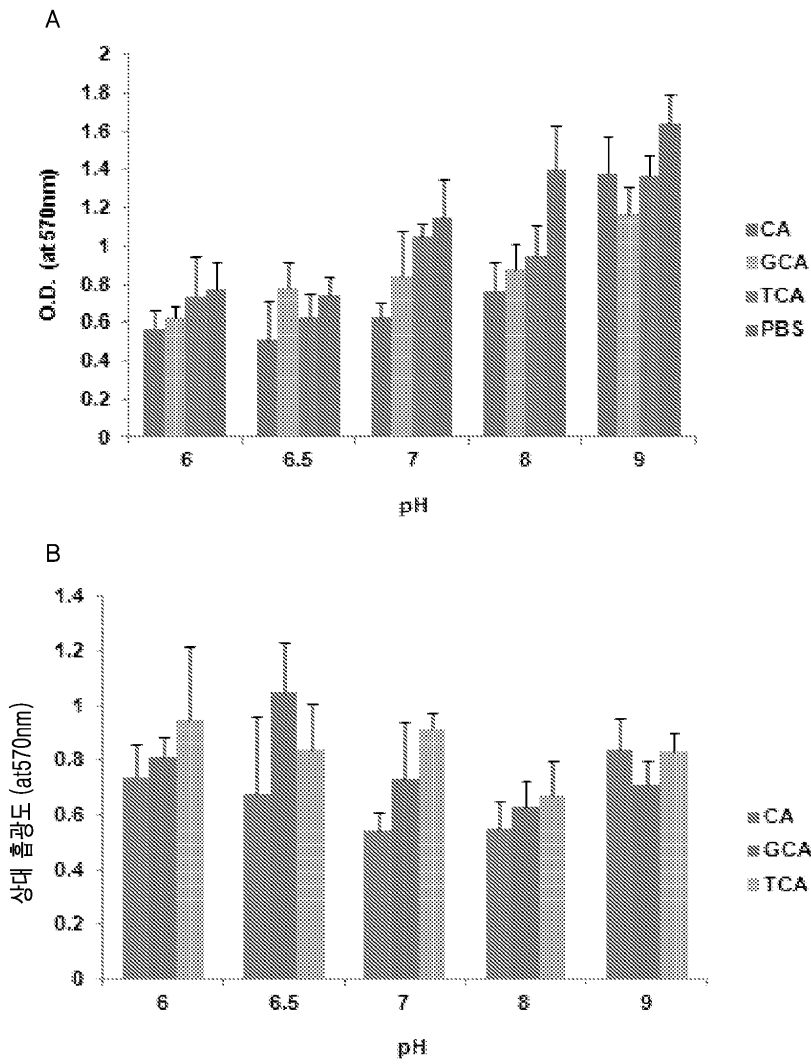
B



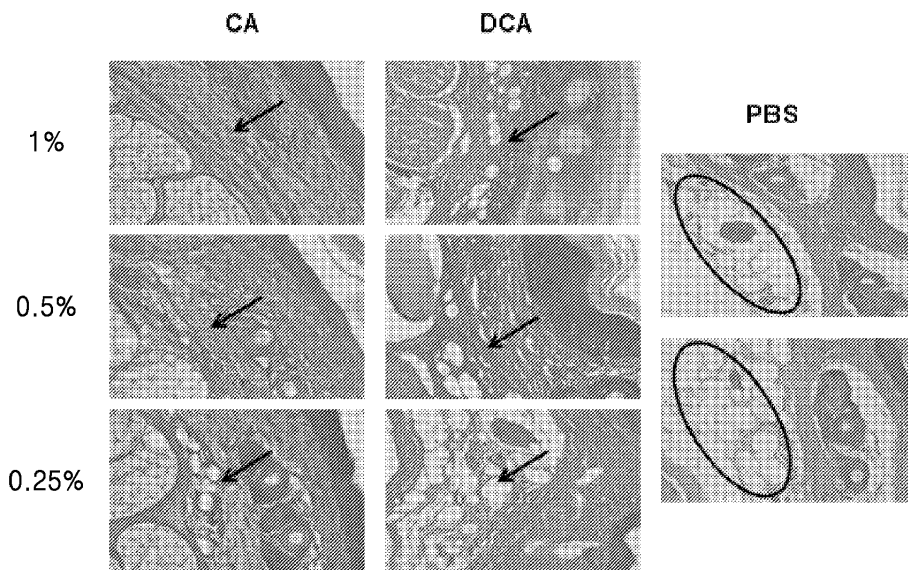
도면14



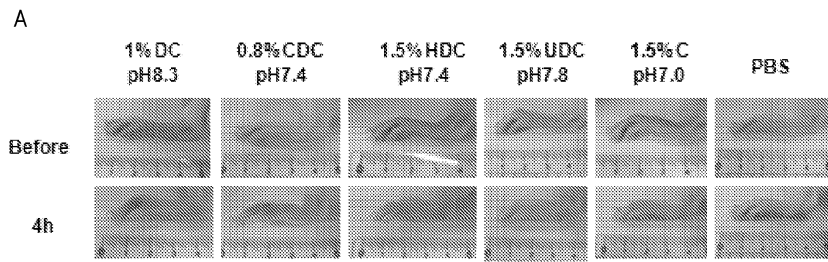
도면15



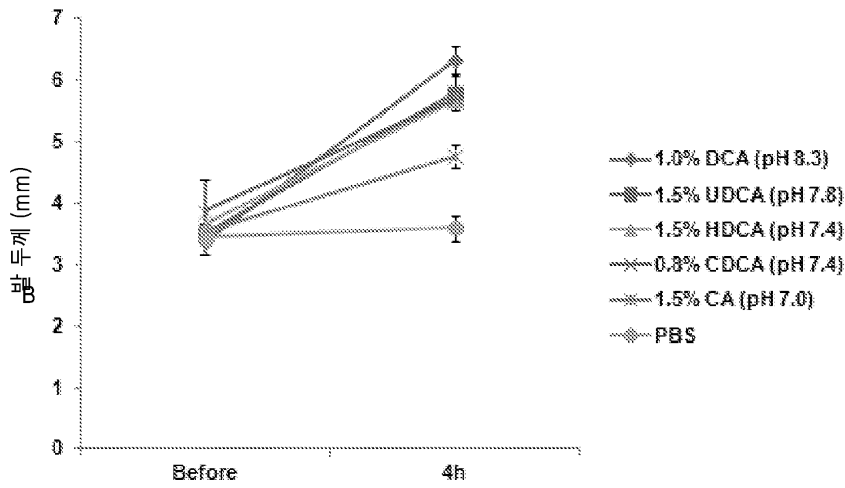
도면16



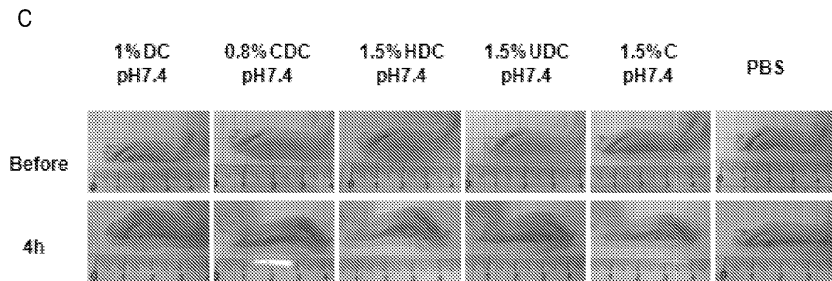
도면17a



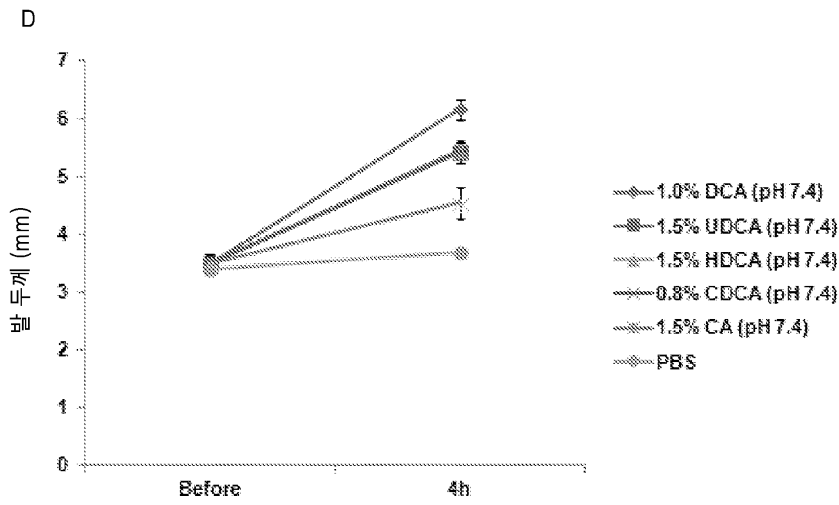
도면17b



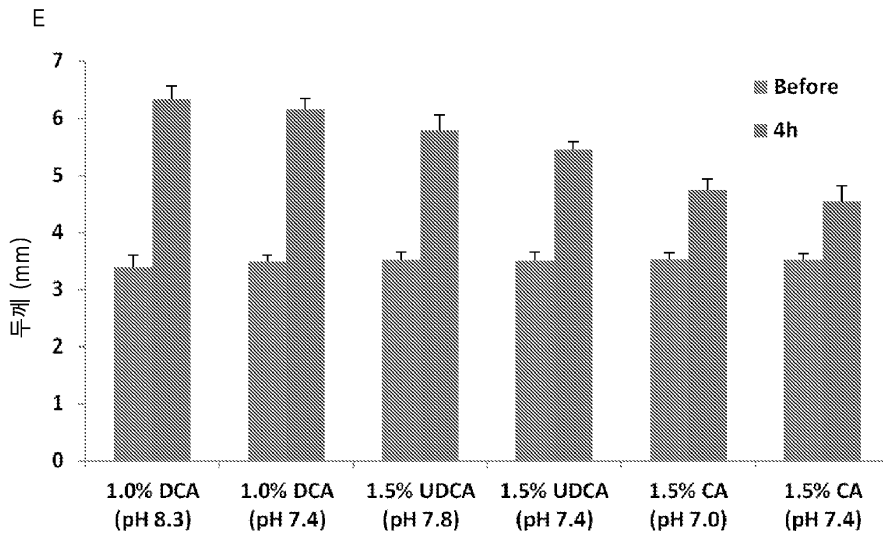
도면17c



도면17d

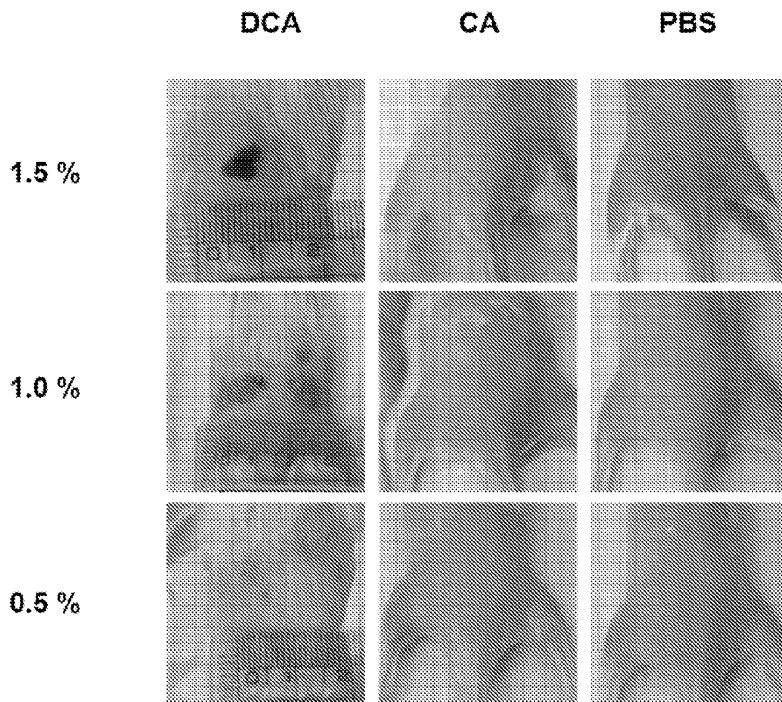


도면17e



도면18

A



B

DCA 1.5%	DCA 1%	DCA 0.5%	CA 1.5%	CA 1%	CA 0.5%	PBS
3	3.9375	0.625	0.25	0	0	0