

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0063858

(43) 공개일자 2020년06월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/51 (2006.01) A61K 31/4422 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/5153 (2013.01)

A61K 31/4422 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0150071

(22) 출원일자 2018년11월28일

심사청구일자 2018년11월28일

(71) 출원인

건양대학교산학협력단

충청남도 논산시 대학로 121 (내동)

(72) 발명자

박환우

대전광역시 서구 관저동로90번길 47

느리울아파트11단지 1101동 1303호

김도경

대전광역시 서구 관저북로 87 원앙마을1단지아파트 106동 809호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인도담, 김대영

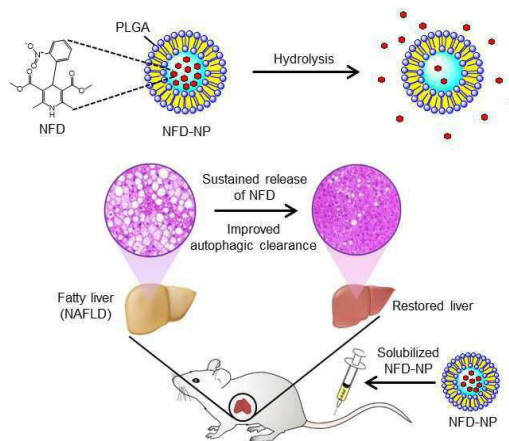
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 니페디핀 함유 나노입자를 포함하는 지방간 질환 및 인슐린 저항성 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 니페디핀을 함유하는 나노입자 및 이를 포함하는 지방간 질환 및 인슐린 저항성 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기 니페디핀 나노입자의 제조를 통해 난용성 니페디핀을 가용화하여 정맥주사가 가능하며, 약물 지속 방출형 나노입자로 생체이용률과 효율성이 현저히 개선될 수 있으며, 상기 니페디핀 함유 나노입자를 포함하는 조성물은 지방간 질환 및 인슐린 저항성의 개선 및 치료에 우수한 효과를 가진다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/0019 (2013.01)

A61K 9/5138 (2013.01)

A61P 1/16 (2018.01)

(72) 발명자

이슬지

충청북도 청주시 흥덕구 흥덕로180번길 13

한대원

충청남도 논산시 대림길 7 , 103동 508호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018R1D1A3B07045858

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 지역대학우수과학자지원사업

연구과제명 대사성 질환 치료를 위한 TBK1 조절약물-나노복합체의 개발 및 오토파지 조절기전 연구

기 여 율 10/100

주관기관 건양대학교

연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A5A1009701

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터지원사업

연구과제명 인간화 돼지 연구센터

기 여 율 60/100

주관기관 건국대학교

연구기간 2015.06.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI17C1238

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발

연구과제명 유산 및 조산의 염증조절을 통한 치료기술 개발

기 여 율 30/100

주관기관 건양대학교

연구기간 2017.05.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 니페디핀 화합물; 및

(b) 생분해성 고분자 및 안정제를 포함하는,

니페디핀 나노입자를 포함하는 지방간 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물. 지방간 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 생분해성 고분자는, 폴리-L-락트산, 폴리-글리콜산, 폴리-D-락트산-코-글리콜산, 폴리락틱-코-글리콜산, 폴리-D,L-락트산-코-글리콜산, 폴리-카프로락톤, 폴리-발레로락톤, 폴리-하이드록시 부티레이트 및 폴리하이드록시 발리테이트로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는,

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 생분해성 고분자는 폴리-L-락트산-코-글리콜산(PLGA)인 것을 특징으로 하는, 지방간 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 안정제는 폴리비닐알코올 (PVA), 하이드록시프로필셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 소듐 라우릴 설페이트, 디옥틸설포석시네이트, 젤라틴, 카세인, 레시틴(포스파티드), 텍스트란, 아카시아검, 콜레스테롤, 트라가칸트, 스테아르산, 벤즈알코늄 클로라이드, 칼슘 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 세토스테아릴 알콜, 메틸 셀룰로스, 하이드록시에틸셀룰로스, 하이프로멜로스 프탈레이트, 비결정형 셀룰로스, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 트리에탄올아민으로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 지방간 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 안정제는 폴리비닐알코올 (PVA)인 것을 특징으로 하는, 지방간 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 나노입자는 평균직경이 약 210nm 인 것을 특징으로 하는, 지방간 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 나노입자는 제타전위(ζ - potential)가 pH 7.4에서 -13.2mV 인 것을 특징으로 하는, 지방간 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 나노입자는 물에 대한 용해도가 $625\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 것을 특징으로 하는, 지방간 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 니페디핀 나노입자는 세포에 비독성인 것을 특징으로 하는, 지방간 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

상기 지방간은 비알콜성 지방간(NAFLD)인 것을 특징으로 하는, 지방간 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 비알콜성 지방간은 인슐린 저항성, 포도당 내성 또는 비만에 기인한 비알콜성 지방간인 것을 특징으로 하는, 지방간 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 정맥 주사용 제제인 것인 특징으로 하는, 지방간 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

상기 조성물이 1종 이상의 약학적 허용성 부형제, 담체 또는 이의 조합을 추가로 더 포함하는 것인, 지방간 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 14

니페디핀 화합물과 생분해성 고분자를 유기용매상에서 1차 초음파 처리하는 단계;

안정제를 첨가하여 2차 초음파 처리하는 단계;

유기용매를 증발시키는 단계; 및
시료를 동결건조 하는 단계;
를 포함하는 것을 특징으로 하는 니페디핀 나노입자의 제조방법

청구항 15

제 14 항에 있어서,
상기 생분해성 고분자는 폴리-L-락트산-코-글리콜산(PLGA)인 것을 특징으로 하는,
니페디핀 나노입자의 제조방법

청구항 16

제 15 항에 있어서,
상기 유기용매는 에틸아세테이트인 것을 특징으로 하는, 니페디핀 나노입자의 제조방법.

청구항 17

제 15 항에 있어서,
상기 안정제는 폴리비닐알코올 (PVA)인 것을 특징으로 하는, 니페디핀 나노입자의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 니페디핀을 함유하는 나노입자 및 이를 포함하는 지방간 질환 및 인슐린 저항성 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 제2 형 당뇨병, 고지혈증 및 심혈관 질환을 비롯한 비만 및 관련 질환은 21 세기의 가장 심각한 공중 보건 문제 중 하나이다. 비만의 유행은 미국에서 급격히 증가했으며 성인 인구의 3 분의 1 이상이 미국에서 비만이다.

[0003] 비만은 또한 현재 성인과 어린이 모두에서 가장 흔한 대사성 간 질환 인 비알콜성지방간질환 (NAFLD)의 위험을 초래하고, 간세포 괴사 염증 및 섬유증 진행과 함께 비알콜성지방간염 (NASH)을 유도 할 수 있다. 그동안 비알콜성지방간염은 체중 감소 수술, 지방 흡입 수술, 약리 요법 및 에너지 섭취 감소와 같은 비만 치료법의 여러 가지가 시행되었다. 그러나 안전성 문제, 심각한 부작용 또는 장기 효능의 부재 등으로 치료에 한계가 있고, 비만 및 NAFLD에 대한 새로운 치료법이 요구되고 있다.

[0004] 단백질 항상성은 단백질 합성, 접합, 수송 및 분해를 담당하는 건강한 세포의 중요한 기능이다. 오토파지는 자가포식소체라고 하는 이중막소포의 형성과 리소좀과의 융합을 통해 장수명의 세포질 단백질, 지질 방울, 잘못된 접힌 단백질 응집체 또는 손상된 세포 기관의 리소좀 분해를 담당하는 세포 경로이다. 오토파지의 과정에서의 결합은 대사 장애의 발병 및 발달에 기여한다. 유비퀴틴의 결합 부위를 포함하는 선택적 오토파지의 어댑터 p62 / sequestosome-1 (SQSTM1)은 유비퀴틴화된 기질을 인식하여 자가포식소체의 막과 접촉시킨다. 그러므로 불충분한 오토파지의 정리는 p62와 유비퀴틴화된 단백질의 축적을 회복시키는 효과를 일으킬 수 있는데, 이는 다양한 병리학적 상태를 가진 조직에서 종종 관찰된다.

[0005] Nifedipine(NFD)은 1,4-dihydropyridine 유도체로 calcium channel blocking 약물이다. 이 약물은 백색의 결정형 분말로 물과 알콜 중에서 불용성이다. 약물학으로 다른 dihydropyridine calcium channel blocking 약물들과 마찬가지로 혈청의 칼슘의 농도 변화 없이 혈관 평활근세포내적수 세포막의 세포 밖 칼슘이온의 막 통과와 저해로 약효를 발현하게 된다. NFD는 칼슘 채널 길항제 및 방출 제어제로써 혈압을 강하시키는 고혈압의 치료제로 쓰인

다.

[0006] 본 발명자들은 최근에 고지방식(HFD) 또는 간세포에서 포화 지방산으로 치료하는 동안 손상된 칼슘항상성에 의해 p62 및 유비퀴틴화된 단백질 함유물의 형성이 유도된다고 보고했다. 또한 수용성 L 형 Ca^{2+} 채널 차단제인 베라파밀(verapamil)은 세포질내 칼슘항상성을 회복시켜 HFD에 의해 유도된 p62 및 유비퀴틴화된 단백질 함유물의 축적을 억제했다. 그러나 in vivo에서 약물은 짧은 작용 기간으로 인해 투여 간격이 짧고 많은 양의 약물을 필요로 한다. 또한 다른 종류의 칼슘 통로 차단제인 nifedipine(NFD)은 베라파밀보다 임상적으로 덜 독성이지만 NFD의 수용성이 좋지 않아 임상 효능과 생체 이용률이 제한되어 비만 관련 질환을 치료할 수 있는 효과적인 치료법으로 다용도 경로의 가능성을 제공하는 약물 전달 시스템을 개발하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 국제공개특허 W02010/008203

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) (연구논문 0001) N. Chalasani, Z. Younossi, J.E. Lavine, A.M. Diehl, E.M. Brunt, K. Cusi, M. Charlton, A.J. Sanyal, The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association, Hepatology 55(6) (2012) 2005-23.

(비특허문헌 0002) (연구논문 0002) G. Musso, M. Cassader, R. Gambino, Non-alcoholic steatohepatitis: emerging molecular targets and therapeutic strategies, Nat Rev Drug Discov 15(4) (2016) 249-74.

(비특허문헌 0003) (연구논문 0003) D.J. Klionsky, S.D. Emr, Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation, Science 290(5497) (2000) 1717-21.

(비특허문헌 0004) (연구논문 0004) S. Pankiv, T.H. Clausen, T. Lamark, A. Brech, J.A. Bruun, H. Outzen, A. Overvatn, G. Bjorkoy, T. Johansen, p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy, J Biol Chem 282(33) (2007) 24131-45.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 니페디핀의 용해성 및 용출성을 개선한 이중층 구조의 나노입자 및 그 제조방법을 제공하는 것이다.

[0010] 또한 본 발명의 다른 목적은 상기 니페디핀 나노입자를 포함하는, 인슐린 저항성, 포도당 내성 또는 비만에 기인한 비알콜성 지방간 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은

[0012] (a) 니페디핀 화합물; 및

[0013] (b) 생분해성 고분자 및 안정제를 포함하는,

[0014] 니페디핀 나노입자를 포함하는 지방간 치료를 위한 약학적 조성물을 제공하는 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 생분해성 고분자는, 중량평균 분자량이 60,000이하인 것, 바람직하게는 60,000~5,000인 것을 사용한다. 예를 들면, 폴리-L-락트산, 폴리-글리콜산, 폴리-D-락트산-코-글리콜산, 폴리락틱-코-글리콜산, 폴리-D,L-락트산-코-글리콜산, 폴리-카프로락톤, 폴리-발레로락톤, 폴리-하이드록시 부티레이트 및 폴리하이드록시 발리레이트로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상으로 이루어질 수 있고, 바람직하게는

폴리-L-락트산-코-글리콜산(PLGA)인 것을 특징으로 한다.

- [0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 안정제는 폴리비닐알코올 (PVA), 하이드록시프로필셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈(Polyvinyl Pyrrolidone), 소듐 라우릴 설페이트, 디옥틸설포크시네이트, 젤라틴, 카세인, 레시틴(포스와티드), 텍스트란, 아카시아검, 콜레스테롤, 트라가칸트, 스테아르산, 벤즈알코늄 클로라이드, 칼슘 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 세토스테아릴 알콜, 메틸셀룰로스, 하이드록시에틸셀룰로스, 하이프로멜로스프탈레이트, 비결정형 셀룰로스, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 트리에탄올아민으로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상으로 할 수 있고, 바람직하게는 폴리비닐알코올 (PVA)인 것을 특징으로 한다.
- [0017] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 니페디핀 나노입자는 직경이 200nm 내지 300nm로 분포되고, 평균직경이 약 210nm 인 것을 특징으로 한다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 니페디핀 나노입자는 제타전위(ζ -potential)가 pH 7.4에서 -13.2mV인 것을 특징으로 한다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 니페디핀 나노 입자는 물에 대한 용해도가 625 μ g/mL인 것을 특징으로 한다.
- [0020] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 니페디핀 나노입자의 제조방법은, 니페디핀 화합물과 생분해성 고분자를 유기용매 상에서 1차 초음파 처리하는 단계; 상기 유기상에 안정화제를 첨가하여 2차 초음파 처리하는 단계; 유기용매를 증발시키는 단계; 및 시료를 동결건조 하는 단계를 포함한다.
- [0021] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 유기용매로는 생분해성 고분자에 대한 용매성과 증발을 통한 제거 용이성이 모두 뛰어난 휘발성 유기용매이면 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 클로로포름, 아세톤, 다이메틸설포사이드, 다이메틸포름아마이드, N-메틸피롤리돈, 다이옥산, 테트라하이드로퓨란, 에틸아세테이트, 메틸에틸케톤 및 아세트니트릴에서 선택되는 1종의 용매 또는 2종 이상의 혼합용매가 사용될 수 있고, 더 바람직하게는 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 클로로포름 및 테트라하이드로퓨란에서 선택되는 1종의 용매 또는 2종 이상의 혼합용매가 사용될 수 있으며, 가장 바람직하게는 에틸아세테이트가 사용될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 니페디핀 나노입자는 세포에 비독성인 것을 특징으로 한다.
- [0023] 본 발명의 약학적 조성물은 물에 대해 난용성인 니페디핀을 나노입자화 시켜 용해도가 증가되고, 생체이용률이 증가된 용출률이 우수한 제제로 제조하여 정맥 주사용 제제로 사용하는 것을 특징으로 한다.
- [0024] 상기 정맥 주사용 제제로 사용하기 위하여 증류수, 주사용수, 완충제, pH 조절제 등과 같은 약학적 허용성 부형제, 담체 또는 이의 조합을 추가로 더 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 니페디핀 나노입자를 포함하는 약학적 조성물은 인슐린 저항성, 포도당 내성 또는 비만에 기인한 비알콜성 지방간의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0026] 본 발명은 불용성 NFD가 정맥 전달을 위해 중합체 나노입자에 탑재되어 NFD의 지속적인 방출을 일으킬수 있는 약학적 조성물으로써 NFD를 안정화 시키고, NFD의 용해도 및 용출성을 개선하여 NFD의 효능을 장기간 발휘시킴으로써 종래 통상적인 NFD 용량에 비해 더 적은 용량으로 유용하게 적용될 수 있다. 또한 NP에 탑재된 NFD의 지속적인 방출은 HFD 또는 포화 지방산에 의해 유도 된 유비퀴틴화된 단백질 함유물의 축적을 억제한다. NFD-NP의 정맥 내 투여는 HFD 유발 인슐린 저항성을 저하시켜 포도당 내성을 개선 할뿐만 아니라 HFD에 의해 유도된 지방간질환을 예방하거나 치료하는데 그 목적이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 지방간질환을 예방 또는 치료하기 위한 NFD-NP의 개략도를 나타낸 것이다. NFD를 입자화gks NP는 계면활성제(detergent)로서 폴리락틱-co-글라이콜레이트(PLGA) 및 폴리(비닐 알코올) (PVA)로 제조된다. 비만 치료를 위해 NFD-NP를 정맥 내 주사 용수에 추가로 용해시킨다.

도 2는 제조된 NFD-NP의 특성을 규명한 것을 나타낸 것이다. (a) NFD-NPs의 형태는 SEM에 의해 특징 화되었다. 스케일 바, 500 nm. (b) 동적광산란(DLS)에 의해 결정된 NFD-NP의 크기 분포. (c) NFD-NP의 ζ -포텐셜. (d) PLGA, PVA, NFD 및 NFD-NP의 FT-IR 스펙트럼. (e) NFD의 불용성과 NFD-NP의 물 용해도 (625 μ g/mL)를 보여주

는 사진. (f) 체외 이식 시험을 위한 이중 챔버 막 이송 시스템. (g) 37 °C에서 PBS 완충액 중의 수용성 NFD-NP로부터 방출되어 in vitro에 축적된 NFD. 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m로 나타낸다.

도 3은 NFD-NP의 시험관내 세포독성을 나타낸 것이다. (a)세포 생존능력은 WST-1 분석에 의해 측정되었다. (b) HepG2 세포를 5%(v/v) DMSO, DMSO (62.5 μ g/mL NFD)에 용해 된 5 % (v/v) NFD 또는 PBS에 용해 된 5 % (v/v) NFD- (1.313 mg/mL NFD-NPs, NFD 양은 62.5 μ g/mL 이다.)를 16 시간 동안 투여 했다. 세포를 Muse Annexin V 및 Dead Cell 시약으로 염색한 다음 Muse Cell Analyzer로 세포 사멸을 분석 했다. 세포 사멸에서 HepG2 세포의 비율은 (c)에 표시된다. (d) DMSO, PBS 중 NFD-NP 또는 DMSO (2 % v/v) 중 25 μ g/mL의 NFD로 16 시간 동안 처리 된 HepG2 세포에서 절단 된 카스파제-3 (녹색) 활성화화를 나타내는 면역 형광 분석. 핵은 DAPI (파란색)로 염색되었다. 박스 영역의 확대도는 절단 된 카스파제-3 양성 세포 (화살표)를 보여준다. e) 카스파제-3 활성을 정량화 했다. 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m로 나타낸다. ** P <0.01; *** P <0.001

도 4는 NFD-NP가 팔미트산 유도된 단백질 및 ER 스트레스를 완화시키는 것을 나타낸 것이다. (a) 세포 용해물을 안티-유비퀴틴 및 안티-p62 항체로 면역검출 했다. α - 튜불린은 로딩 대조군으로 사용되었다. (b) 유비퀴틴 (녹색)과 p62 (적색)를 보여주는 면역형광분석. 핵은 DAPI (파란색)로 염색되었다. 박스 영역은 가장 오른쪽 패널에서 확대된다. (c) 유비퀴틴 또는 p62 응집체의 크기를 정량화 했다. (d) HepG2 세포는 표시된 시간 동안 37 °C에서 1.313 mg/mL NFD-NP 방출 배지에서 배양된 또는 들어가지 않은 배지에 9 시간 동안 500 μ M PA 또는 비히클로 처리 했다. 면역 형광 분석법을 이용하여 p62 (적색), 핵은 DAPI (파란색)로 염색되었다. (e) p62 응집체의 크기를 정량화 했다. (f) 표시된 치료법으로 HepG2 세포에서 PDI (녹색)를 나타내는 면역 형광 분석법을 이용했다. (g) PDI의 형광 강도를 정량화 했다. 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m로 나타낸다. * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001

도 5는 식이요법(HFD)으로 비만 유도된 마우스의 꼬리정맥에 NFD-NP를 주사한 결과 인슐린 감수성과 포도당 내성을 향상시키고 간을 표적화 한다는 것을 나타낸 것이다. (a) FITC가 결합된 NFD-NP (NFD-NP-FITC)는 EDC / NHS 커플링 반응에 이어 EDA를 도입하여 아민기를 활성화시킨다. 그 후, 아민 반응성 형광 단인 FITC를 아민 활성화 된 PLGA와 결합시켰다. (b) 지시 된 시점에서 12.5 mg / kg NFD-NP-FITC (녹색, 화살표)의 정맥 내 주사 마우스 간 단면의 형광 현미경 사진. 핵은 DAPI (파란색)로 염색되었다. 박스 영역은 가장 오른쪽 패널에서 확대했다. 스케일 바, 50 μ m. (c) NFD-NP-FITC의 형광 강도를 정량화 했다. (d-g) 9 주간 고지방식(HFD)을 유지한 C57BL / 6 수컷 마우스를 NFD-NP (n = 7) 또는 비히클 (n = 6)으로 꼬리 정맥에 주사 했다. 같은 연령의 저지방식(LFD)섭취 마우스를 음성 대조군으로 사용 했다 (n = 5). NFD-NP 또는 비히클로 치료 한 LFD섭취 마우스 또는 HFD섭취 마우스를 사용하여 포도당 내성 테스트 (GTT, d) 및 인슐린 내성 테스트 (ITT, f)를 수행 했다. (e, g) 곡선 아래 면적은 GTT 및 ITT 데이터로부터 정량화되었다. 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m로 나타낸다. * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001

도 6은 NFD-NP가 비만 및 지방간증을 완화시킨다는 것을 나타낸 것이다. (a) HFD를 먹고 NFD-NP 또는 비히클로 처리 한 마우스의 체중. (b) injection 기간 동안의 음식 섭취. (c) 각 그룹에서 생쥐의 간에 대한 거시적인 이미지가 나타났다. (d) NFD-NP 또는 비히클로 처리 한 LFD섭취 마우스 또는 HFD섭취 마우스의 총 간 질량. (e) NFD-NP 또는 비히클로 처리 한 LFD섭취 마우스 또는 HFD섭취 마우스로부터의 H&E (상부) 및 oil-Red-O (하부) 염색 된 간 절편. (f)oil-Red-O 염색 된 영역을 정량화 했다. (g) NFD-NP 또는 비히클로 처리 한 LFD 섭취 마우스 또는 HFD 섭취 마우스의 정소상체 백색지방 조직으로부터의 H&E- 염색 절편. (h) 정소상체의 백색지방 조직의 평균 지방 세포 면적을 정량화 했다. (e, g). 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m로 나타낸다. * P <0.05; *** P <0.001

도 7은 NFD-NP가 생체내에서 유비퀴틴화된 단백질과 ER 스트레스의 축적을 약화시킨다는 것을 나타낸 것이다. (a, b) 마우스의 간에서 Triton X-100 가용성 및 불용성 분획을 표시된 항체(a)와 정량화 (b)하여 면역검출분석 했다. (c) NFD - NP 또는 비히클로 치료 HFD 섭취 마우스에서 간 조직에서 p62의 Immunohistochemistry 분석. 핵은 헤마톡실린으로 염색되었다. 상자가있는 영역은 아래쪽 패널에서 확대된다. 스케일 바, 50 μ m; 밀면 삽입, 10 μ m. (d) NFD-NP 또는 비히클로 처리 한 HFD섭취 마우스의 간 조직에서의 BiP, ERdj4, Grp94 및 CHOP의 상대적인 mRNA 발현이다. (e) NFD-NP 또는 비히클로 처리 한 LFD섭취 마우스 또는 HFD 섭취 마우스로부터의 간 조직의 p-CaMKII의 면역검출분석 했다. (f) 상대적 p-CaMKII 수준을 정량화 했다. (g) NFD-NP가 칼슘 항상성의 조절을 통해 자동식균작용 통관을 강화함으로써 비만 유도 대사 이상을 억제하는 근본적인 메커니즘을 설명하는 개략도. 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m로 나타낸다. * P <0.05; ** P <0.01

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 이하 실시예를 바탕으로 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명에 사용된 용어, 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고 통상의 기술자의 이해를 돕기 위하여 예시된 것에 불과할 뿐이며, 본 발명의 권리범위 등이 이에 한정되어 해석되어서는 안 된다.
- [0029] 본 발명에 사용되는 기술 용어 및 과학 용어는 다른 정의가 없다면 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 나타낸다.
- [0030] [시험예]
- [0031] 1. NFD담재 PLGA NP의 합성(NFD-NPs)
- [0032] 유기 용매에 용해 된 PLGA와 NFD의 혼합물을 안정제로 PVA를 이용하여 수상 단계적으로 첨가하는 유화-확산 법을 이용하여 NFD-NP를 제조 했다. 500mg의 PLGA 및 50mg의 NFD를 12.5mL 에틸아세테이트로 3 분간 초음파 처리하여 용해시켰다. 이어서, 유기상을 안정제로서 PVA를 함유하는 30mL의 혼합액에 첨가 했다. 얻어진 일차 오일/물 에멀전(emulsion)을 초음파 처리 동안에 과열을 피하기 위해 얼음이 들어간 통을 사용하여 160W로 30 초간 프로브(probe) 초음파 처리했다. 유기 용매를 마그네틱 교반기로 400rpm에서 하루 동안 증발시켰다. 시료를 1mL 튜브에 나누어 -125℃(speed vac 온도)에서 동결 건조했다
- [0034] 2. NFD-NP의 특성규명
- [0035] 푸리에 변환 - 적외선 분광법 (FTIR) 분석.
- [0036] NFD-NP의 FTIR 스펙트럼은 Platinum ATR(Bruker, USA)를 갖춘 ALPHA FTIR 분광계를 이용하여 20℃에서 기록했다. 각 샘플에 대해 총 24회의 검사를 실시했다.
- [0038] 주사 전자 현미경 (SEM) 분석.
- [0039] NFD-NP를 증류수에 다시 현탁하여 1분간 초음파 처리하여 건조한 후 주사형 전자 현미경 (SNE-4500M, SEC Co., Korea)을 이용하여 NFD-NP의 입자 크기, 모양 및 분포 품질을 분석했다.
- [0041] 입자 크기 및 제타 전위 측정.
- [0042] 샘플을 25 ℃로 온도 조절하고 Malvern Zetasizer 300 Has, Malvern Instruments Inc를 사용하여 633 nm의 입사 레이저 빔으로 90° 의 산란각으로 25℃에서 동적광산란(DLS) 분석을 수행했다. 각각 3개의 독립적인 샘플에 대해 10개의 반복측정(sub-run)을 갖는 5회 측정이 수행되었다. NFD-NP의 제타전위분석은 Malvern Zetasizer 300 Hsa, Malvern Instruments Inc. 영국의 표준 모세관 전기영동 셀에서 수행되었으며, 25℃에서 전기영동 이동도를 측정 했다.
- [0044] 이중 챔버 막 수송 시스템 (DCMTS)에서 측정된 NP에서 NFD의 방출 특성.
- [0045] 투석막 (Mw 차단 : 14kDa)을 60℃의 이중 증류수로 30분간 세척하여 글리세린을 씻어 80℃에서 1분 0.2% (w/v) Na₂S로 처리했다. 60℃에서 2분간 수세 한 후 1M H₂SO₄로 2분간 산성화했다. 마지막으로, 투석막을 60℃의 물로 세척하여 잔류 산을 제거 했다. (도 2f)에 나타난 바와 같이, DCMTS는 2 개의 챔버로 구성되어 그 중 하나는 PBS를 포함하고, 다른 하나는 PBS에 분산 된 NFD-NP를 위한 것이다. 교반기, pH 프로브, 열전대를 DCMTS에 설치했다. DDS에서 방출 된 NFD는 0링이 결합 된 2개의 챔버 사이의 중앙에 배치 된 투석막을 통해 PBS 충전 챔버로 이송 될 수 있다. 온도 및 pH를 정확하게 각각 37℃ 및 7.4로 유지했다. 소정의 시간 간격으로 100 μL 시료를 PBS 충전 챔버에서 수집했다. PBS 중에 존재하는 유리 NFD가 필터를 통과하여 그 농도를 최대 230nm 파장에서 측정되었다.
- [0047] 3. NFD-NP의 시험관내 특성규명
- [0048] NFD-NPs에 FITC 연결.

- [0049] EDC/NHS 커플 링 반응에 이어 EDA를 도입하고 FITC를 NFP-NP에 결합시켜 5mg의 NP를 1 mL의 H₂O에 분산시켜 1mg의 EDC 및 1mg의 NHS를 15분간 첨가 했다. 그 후, 샘플을 원심분리로 침전시키고 위쪽 부분을 다른 곳에 옮겼다. H₂O2 회 세척하고 초음파 처리하여 1mL H₂O에 다시 분산시킨다. 50 μL의 EDA를 첨가 한 후, 반응을 1시간 유지했다. 시료를 원심 분리하여 침전시킨 상층 액을 경사 분리했다. 예금을 ddH₂O로 2회 세척하고 1 mL의 ddH₂O에 다시 분산시켰다. 1mg의 FITC를 첨가하여 어두운 곳에서 24 시간 반응시켰다. FITC 결합 NFD-NP를 원심 진공 농축기에 의해 24시간 동안 건조시켰다.
- [0051] 세포 배양 및 처리
- [0052] 10% fetal bovine serum (FBS, Welgene) 및 100 U/mL 페니실린 - 스트렙토 마이신 (Welgene)을 첨가 한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Welgene)에서 인간 간암 세포주 인 HepG2 세포를 배양 했다. 모든 배양은 가슴 5% CO₂, 37°C로 유지했다. 포화 지방산 처리를 위해 팔미트 산 / bovine serum albumin (BSA)의 존 재 하에서 세포를 배양했다. 13% 지방산 유리 BSA 용액을 매체 대조군으로 사용한다.
- [0054] 세포 사멸 분석
- [0055] Muse Annexin V와 dead cell assay kit (Merck Millipore)를 이용하여 세포 사멸물을 정량 했다. 6well 플레이트에 부착된 HepG2 세포에 DMSO, DMSO에 용해된 5%(v/v) NFD(62.5 μg/mL NFD), 또는 5% PBS에 용해 된 NFD-NP(1.313 mg/mL의 NFD-NP, 62.5 μg/mL NFD)를 16 시간 처리했다. 부착 세포 및 부유 세포를 회수하고 차가운 PBS로 세척 한 다음, Muse Annexin V 및 Dead Cell 시약으로 염색했다. 이어, 염색 세포를 Muse Cell 분석기 (Merck Millipore)로 측정했다.
- [0057] 용해도 분석
- [0058] 1% Triton X-100를 포함하고 있는 용해 완충액 (20mM Tris-Cl pH7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 2.5mM NaPPi, 1mM β-머캅토에탄올, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na3VO4, and protease inhibitor cocktail)에서 HepG2 세포 및 간 조직을 용해한다. 용해물을 4°C에서 15 분간 18,000g로 원심 분리하여 상층과 펠릿 (pellet)을 분리했다. 펠릿(pellet)은 2% SDS를 포함한 용해 완충액에 다시 현탁시킨 후, 4°C에서 18,000g로 15 분간 원심 분리에 걸었다. 상청(Triton X-100 가용성 분획) 또는 재현탁한 펠릿(pellet) (Triton X-100 불 용성 분획)을 SDS 샘플 완충액에서 끓이고, SDS-PAGE 및 immunoblotting을 수행하였다.
- [0060] 면역검출(Immunoblotting)
- [0061] 완전 프로테아제 억제제 각테일(Roche)를 포함한 방사 면역검출분석 버퍼 중에서 HepG2 세포 및 간 조직을 용해 했다. 용해물을 얼음위에 20 분간 방치해두었다가 4°C에서 18,000g로 15분간 원심 분리했다. 단백질 농도는 BCA Protein Assay(Pierce)로 측정했다. 용해물을 1X SDS 샘플 버퍼에 5분간 끓여 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동 법으로 분리하고, polyvinylidene fluoride membranes(Millipore)으로 옮겨 유비퀴틴, p62, 인산화-CaMKII, CaMKII 및 α-tubulin에 대한 일차항체로 조사했다. horseradish peroxidase(HRP)와 결합된 이차항체와 반응 후, 발광 신호를 Fusion Solo System(Vilber Lourmat)을 이용하여 검출했다. 블랏(blot)의 농도 측정 분석은 ImageJ(National Institutes of Health, USA)를 이용하여 수행 했다.
- [0063] 정량 실시간 PCR
- [0064] Trizol 시약 (Invitrogen)를 제조자의 지시에 따라 사용하여 간 조직에서 전체 RNA를 추출하고 Moloney-Murine 백혈병 바이러스 역전사 효소 (MMLV-RT, Promega) 및 랜덤 헥사머 (Promega)을 이용하여 complementary DNA를 제조 했다. LightCycler 96 Real-Time PCR System (Roche)을 이용하여 SYBR green real-time PCR master mix(Biofact)를 이용하여 qRT-PCR을 실시했다. 상대적인 mRNA 발현은 마우스의 GAPDH에 대한 비교를 통하여 Ct 값으로부터 계산했다. 사용한 프라이머는 다음과 같다.

- [0065] GAPDH fwd 5' -AAGGTCATCCCAGAGCTGAA-3'
- [0066] rev 5' -CTGCTTCACCACCTTCTTGA -3'
- [0067] BiP fwd 5' -GGTGCAGCAGGACATCAAGTT-3'
- [0068] rev 5' -CCCACCTCCAATATCAACTTGA-3' ;
- [0069] ERdj4 fwd 5' -CCCCAGTGTCAAACGTACCAG-3'
- [0070] rev 5' -AGCGTTTCCAATTTTCCATAAAATT-3' ;
- [0071] Grp94 fwd 5' -AAGAATGAAGGAAAAACAGGACAAAA-3' ,
- [0072] rev 5' -CAAATGGAGAAGATTCCGCC-3' ;
- [0073] CHOP fwd 5' -CTGCCTTTCACCTTGGAGAC-3' ,
- [0074] rev 5' -CGTTTCTGGGGATGAGATA-3' .
- [0076] 면역 세포 화학
- [0077] 커버 슬립에 증식시킨 HepG2 세포를 PBS로 세척한 후 실온에서 15분간 4% paraformaldehyde(pH 7.4)로 고정시켰다. 세포를 실온에서 1시간 동안 블로킹 하고, 4 °C 가습 챔버에서 안티-유비퀴틴항체(1 : 500), 안티-p62항체(1 : 1000), 안티-PDI항체(1 : 400) 또는 안티-클리카스파아제-3항체(1 : 800)와 하루동안 반응하였다. 세척 후, 세포를 Alexa Fluor 결합 이차 항체(Invitrogen, 1 : 500)로 1.5 시간 동안 반응하고 DAPI (Invitrogen)로 염색했다. 레이저 스캐닝 공 초점 현미경 (LSM700, Carl Zeiss) 또는 에피 형광 현미경 (DM2500, Leica)에서 형광 이미지를 얻고 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 측정 했다.
- [0079] 4. NFD-NP의 식이요법(HFD)으로 비만 유도된 마우스에서의 효능 검증
- [0081] 동물
- [0082] 8 주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 Samtaco(Osan, Korea)로부터 구입 했다. 마우스는 12시간의 명/암주기를 갖는 환경 제어실에서 유지되고, 물 및 규정된 섭취(LFD) 또는 HFD (60 % 지방, 연구 규정)을 11주간 자유섭취시켰다. 0일째, 3일째와 6일째에 PBS(비히클) 또는 NFD-NP(13.125mg / kg)을 이용하여 2군의 동물 (n = 6)의 꼬리 정맥에 주사했다. 분자분석을 위해 14일째에 마우스의 간과 정소상체의 백색지방 조직을 수집했다.
- [0084] 조직 학적 분석
- [0085] 조직은 10% 중성 완충 포르말린에서 고정한 후 고정된 조직 절편(5µm)은 헤마톡실린 및 에오신 (H&E)으로 염색했다. immunohistochemistry를 위해 파라핀 절편을 탈 파라핀하고 다시 수화를 했고, 이어서 항원 회수를 위해 처리했다. 내부유래 퍼옥시다아제는 3% 과산화수소로 처리했다. 비특이적 항원을 차단 한 후 슬라이드를 4 °C에서 하루 동안 안티-p62 항체와 함께 반응시키고, 바이오틴화된 이차 항체(Vector Laboratories)와 반응했다. 항체는 디아미노벤지딘 (Sigma- Aldrich)를 사용하여 Streptavidin-HRP(BD Pharmingen)로 시각화했다. Oil Red O 염색을 위해 간 조직을 조직 동결 배지 (Leica)에 포매 한 다음, 냉동 마이크로톰 (Leica)의 절편으로 절단한 후 Oil Red O (Sigma)로 염색했다.
- [0087] 혈당 측정
- [0088] 포도당 및 인슐린 내성 시험을 위해 6시간 절식한 마우스에 D-포도당(1g kg⁻¹ 체중) 또는 인슐린 (0.65U kg⁻¹ 체중)을 복강주사 했다. 혈액은 표지된 시점마다 꼬리로부터 혈액을 채취하여 Accu-Chek 혈당 측정기(Roche)에서 혈당을 측정했다.

[0090] 통계 분석

[0091] 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차(s.m.m)로 나타낸다. 달리 언급되지 않는 한, 그림 패널에 제시된 데이터는 최소 3가지 독립적인 실험을 대표한다. 2개의 실험 그룹 간의 차이의 중요성은 양측 스튜던트 t 테스트를 사용하여 결정되었다. 0.05 미만의 P 값은 통계적으로 유의하다고 간주되었다 (** P < 0.001; * P < 0.01; * P < 0.05; ns, 통계적으로 유의 한 차이 없음).

실시예 1

[0093] NFD이 탑재된 NP의 합성 및 특성화

[0094] NFD는 황색을 띠는 결정성 물질이며, 물에 불용성이다. 본 발명에서는 NFD를 수중 오일 중 물 형 (w/o/w) 이중 에멀전법을 이용하여 PLGA-NP를 형성함으로써 안정성을 높여 NFD의 수중으로 방출 특성을 연장 시키려고 시도했다. 본 발명의 NFD-NP는 기름 중 물방울 (W/O) 에멀전 형태로 10 중량%의 NFD를 함유하는 내부 수성 단계로 구성되어 있다(도 1). SEM 이미지는 NFD-NP가 평균 직경 210nm의 구형을 갖는 것으로 나타났다(도 2a). NFD-NP의 동적 광산란(DLS)은 분자량 분포 0.3 (도 2b)에서 258nm인 것으로 판정되었다. 입자의 유체 역학적 크기는 물과 상호 작용하는 코팅 층(이 경우는 PVA)을 포함하기 때문에, SEM에 의해 결정되는 물리적 '중간' 크기보다 항상 크다. NFD-NP의 ζ -포텐셜은 pH 7.4에서 13.2mV의 값으로 음성이었다(도 2c). PLGA, PVA, NFD 및 NFD-NP의 FTIR 스펙트럼은 -CH, -CH₂ 및 -CH₃ 신축 (2905-2952cm⁻¹)의 흡수 밴드를 보였다(도 2d). NFD-NP 및 PLGA의 카보닐 -C=O 신축 진동은 1758cm⁻¹ 및 1744cm⁻¹로 나타났다. 순수한 NFD는 3431cm⁻¹ N-H 신축 진동의 특징적인 피크를 가진다. 에스테르기의 2차 아미드 (amide II) C-O 신축의 C=O 신축 1667cm⁻¹ 날카로운 피크를 할당 할 수 있다. 1436cm⁻¹ 및 1373cm⁻¹의 피크는 각각 아미드 에테르 결합 및 NH 신축(아미드 III) 밴드 NH 신축에 속해 있을 수 있다. NFD-NP 및 PLGA의 C-O-C 신축은 1차 탄소의 수산기 (1차 탄소의 알코올 C-O 신축의 -CH₂ OH의 특징적인 피크) 인 1025cm⁻¹로 나타난다. 순수한 PVA의 경우엔, 분자간 및 분자 내 수소 결합의 -OH 기의 신장에 기인하여 3500-3000cm⁻¹ 광범위한 흡수 밴드가 관찰된다. 특히 3431cm⁻¹의 NFD의 피크를 아민과 수산기 N-H 신축 진동에 귀속시킬 수 있다. 3000-2800cm⁻¹의 진동 밴드는 알킬기 그룹 (-CH 및 -CH₂)이며, 1810-1650cm⁻¹ 사이의 피크는 나머지 PVA 아세테이트 기반에서 C=O 및 C-O 신축이다. FT-IR 스펙트럼의 결과는 NFD 분자가 PLGA NP에 성공적으로 입자화 된 것을 보여준다. NFD는 물에 거의 녹지 않지만, NFD-NP의 용해도는 625 μ g/mL (NFD 환산)이며, 이것은 106배 증가한 것이다(도 2e). 이 증가 된 수용성은 in vitro 및 in vivo 적용을 위해, DMSO 기반 제제를 물 또는 식염수로 대체 할 수 있음을 보여 주고 있다. NFD-NP에서 NFD의 방출역학을 DCMT를 이용하여 37°C에서 방출 특성을 조사했다(도 2f). NFD-NP는 NFD의 연속 방출을 나타내며, 포함 된 NFD의 50 %가 1 일 이내에 방출 되는것을 보여준다(도 2g). NFD-NP의 방출 정보는 확산 모델의 합의 안에서 초기 단계에서의 빠른 방출 속도를 나타낸다. 용해 모델은 고체 약물이 매체에 용해되는 경우에 기대할 수 있다. 약물의 용해 속도는 흡수 속도가 용해 속도보다 빠른 경우 속도 결정 단계인 경우가 많다. 용해 속도는 약물이 난용성일 때 확산모델보다 고려되어야 한다. 이 실험에서는 방출 특성은 $C_{1\infty}V_r / C_0$ 값이 하락함에 따라 3 일 후 점차 확산 모델에서 용해 모델을 향해 이동한다. C_0 는 PLGA 안에 들어있는 NFD의 초기 농도이며, C_1 은 매체 안에 있는 NFD의 시간에 따른 농도이며, $C_{1\infty}$ 는 매체의 NFD의 평형 상수이며, V_r 은 매체 V의 총 용량과 미셀의 체적 사이의 부피 비이다. 방출 속도는 DDS가 더 낮은 V_r 의 값을 나타낼 때, 공의 표면에 더 큰 기공 크기로 인해 증가한다. 고체 제형 중 약물의 용해 속도는 적절한 DDS를 설계하는데 있어서 중요한 매개변수이다. 6일 후 누적 NFD 방출은 약 90 %에 달했다.

실시예 2

[0096] NFD 탑재된 NP의 체외 세포 독성.

[0097] 우리는 WST-1 분석을 이용하여 NFD 및 NFD-NP에 대한 세포독성을 비교하였다. DMSO, NFD 및 NFD-NP의 상이한 농도로 처리 된 인간 간암세포인 HepG2 세포의 생존력을 측정했다. 도 3a에 나타난 바와 같이, NFD-NP는 12.5, 25

및 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 HepG2 세포에 대해 매우 낮은 세포 독성을 나타내었다. 그러나 DMSO 또는 NFD의 처리는 용량 의존적으로 세포 생존율을 유의미하게 감소시켰다. 다음에 Annexin V 및 죽은 세포 시약 표지 유동세포계측법을 이용하여 HepG2 세포에서 NFD 및 NFD-NP의 세포 사멸 효과를 조사했다. DMSO 또는 NFD에서 16시간 처리하면 HepG2 세포에서 세포사멸이 유의하게 유도 되었다.(도 3b 및 3c). 하지만 HepG2 세포에 NFD-NPs를 처리 한 경우에는 세포 사멸에 영향을 주지 않았다. caspase-3를 포함한 caspase는 세포사멸반응의 중요한 역할을 한다. caspase-3의 활성을 알아보기 위해 면역형광염색법을 시행했다. NFD-NP로 처리 한 후 절단 된 caspase-3 양성 세포에는 변화가 없었다(도 3d 및 3e). 그러나 단절된 caspase-3 양성 세포는 NFD-NP로 처리 한 세포와 비교하여 DMSO 및 NFD에서 각각 처리 한 HepG2 세포에서 유의하게 증가했다. 결론적으로, 수용성 NFD-NP는 세포에 비독성임을 보여주고 있다.

실시예 3

- [0099] NFD-NPs는 단백질 응집과 ER 스트레스를 억제한다.
- [0100] 본 발명의 이전 연구는 수용성 칼슘 채널 차단제 베라파밀이 간세포에서 자동 식균 작용의 저하에 의해 포화 지방산 유도 단백질 응집물을 감소시키고, NFD 또한 HepG2 세포에서 팔미트산 유도된 단백질 응집을 감소시켰다.
- [0101] NFD-NP가 포화 지방산에 의한 단백질 응집의 축적에 영향을 미치는지 알아보기 위해, 면역 검출로 HepG2 세포의 세제 용해성 및 불용성 분획에서 유비퀴틴화된 단백질과 p62의 수준을 분석했다. NFD-NP는 HepG2 세포의 계면활성제(detergent)에 대해 불용성 분획물에서 팔미트산에 의해 유도된 폴리유비퀴틴화된 단백질 및 p62를 현저하게 감소시켰다(도 4a). 다음으로 HepG2 세포에서 면역염색을 이용하여 단백질 응집체의 형성을 조사했다. 팔미트산으로 처리한 세포와 이 세포에 NFD-NP로 처리 한 세포와 비교 했을 때, 유비퀴틴과 p62에 대한 항체로 표지된 응집체의 크기가 유의하게 감소하고 개선된 자동 식균작용이 확인되었다(도 4b 및 4c).
- [0102] NFD-NP로 배양 한 후 시간에 따른 배지 내 방출이 단백질 응집체의 오토파지에 미치는 영향을 시험하기 위해, p62의 총 크기를 측정하여 HepG2 세포에서 팔미트산 및 NFD-NP를 시간에 따라 처리했을 때 감소한 것으로 나타났다(도 4d 및 4e). 이는 나노입자에서 NFD의 지속적인 방출을 나타낸다.
- [0103] 또한 NFD-NP가 팔미트산 유도 ER 스트레스에 영향을 미치는지 여부를 조사했다. 면역염색분석에서, 팔미트산 처리 된 세포에 비해 팔미트산과 NFD-NP로 처리된 세포에서 ER 스트레스에 의해 유도 된 ER 샤페론을 포함한 단백질 이황화아소메라제 (PDI)의 수준을 저하를 시키는 것으로 보였다(도 4f 및 4g). 이러한 결과는 팔미트산에 의해 유도 된 ER 스트레스가 NFD-NP에 의해 감소되는 것을 보여준다.

실시예 4

- [0105] NFD-NP는 식이요법으로 유도된 인슐린 저항성과 포도당 내성을 향상시킨다.
- [0106] in vivo에서 NFD-NP의 효능을 확인하기 위하여, 먼저 HFD로 유도된 마우스에 꼬리 정맥 주사 후 FITC로 표지된 PLGA NP (NP-FITC)의 간조직내 분포를 조사 했다. NFD-NP를 추적하기 위해, NFD-NP의 표면을 하기 절차에 따라 변형시켰다(도 5a).; 첫째, PLGA NP의 카르복실기는 EDC/NHS에 의해 활성화되고, EDC는 PLGA NP의 카르복실기와 반응 한 다음 불안정한 아민 반응성 O-아실 우레아 중간체를 형성한 후 O-아실 우레아와 NHS 사이의 반응에 의해 안정한 NHS-에스테르를 얻을 수 있었다. 마지막으로, NHS-에스테르를 EDA의 아미노기와 반응시켜 PLGA의 표면에 아마이드 결합 및 아민 말단기를 형성시켰다. 그 후 아민 반응성 형광단인 FITC를 아민 활성화 된 PLGA와 접합시켰다. 투여 후 6 시간 또는 24 시간 후 NFD-NP-FITC는 간 조직에서 강한 형광 신호를 나타내었고 적어도 24 시간 동안 지속되었다(도 5b 및 5c). NAFLD는 간장 인슐린 저항성과 연관되어 있기 때문에, 우리는 HFD로 유도된 비만 마우스에서 꼬리 정맥 주사 후 포도당 항상성에 대한 NFD-NP의 효과를 평가했다. 포도당 내성 검사 및 인슐린 내성 검사 결과는 NFD-NP 처리 후 인슐린 감수성이 HFD 섭취 마우스에서 유의하게 개선되었음을 보여 주었다(도 5d-5g). 이러한 결과는 NFD-NP 처리가 인슐린 저항성을 개선하며, 비만 동안 혈당 항상성을 손상을 회복 시킨다는 것을 보여준다.

실시예 5

[0108] NFD-NP는 식이요법으로 유도된 비만 및 지방간증을 완화시킨다.

[0109] HFD 섭취된 C57BL/6 마우스에서 NFD-NP의 잠재적인 항 당뇨병 효과를 조사하기 위해, NFD-NP를 0일째, 3일째와 6일째에 정맥주사 하고 체중을 관찰했다. NFD-NPs 투여는 HFD 섭취 마우스의 체중을 감소시켰다(도 6a). 한편, 음식물 섭취는 비히클 및 NFD-NP로 처리 한 2군의 비만 마우스가 비슷했다(도 6b). 육안 관찰에 의하면 비히클 처리 된 HFD 섭취 마우스의 간은 지질의 축적으로 인해 옅은 색으로 보였으나, NFD-NPs 처리한 HFD 섭취 마우스의 간은 적갈색이며 거의 정상이었다(도 6c). 간의 질량은 NFD-NPs를 처리한 마우스가 비히클 처리한 마우스보다 감소했다(도 6d). 비만 마우스의 지방간증에 대한 NFD-NPs의 영향을 평가했고 NFD-NP로 치료 한 후 간의 지질소립의 유의한 감소를 발견했다(도 6e 및 6f). 헤마톡실린 및 에오신(H&E)염색은 정소상체의 백색지방세포 크기가 NFD-NP 처리된 HFD마우스가 비히클 처리된 HFD마우스와 비교했을 때 현저하게 감소되었음을 보여 주었다(도 6g 및 6h). 따라서 이러한 결과는 NFD-NP 처리가 식이요법으로 유도된 비만 및 지방간증을 예방한다는 것을 보여 준다.

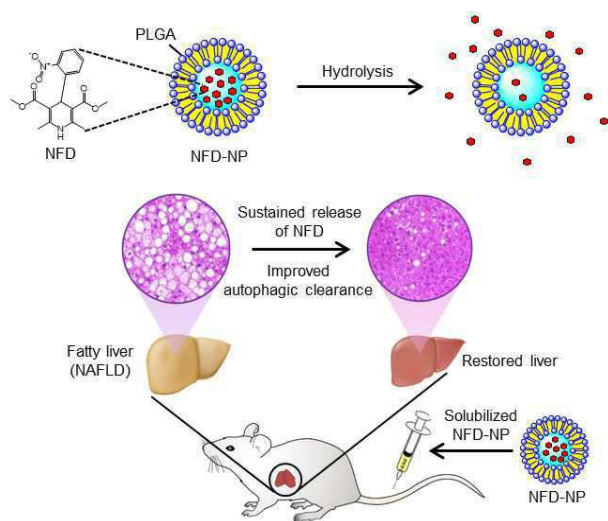
[0110] 본 발명은 간에서 NFD-NP의 치료 효과에 대한 분자 기작을 결정했다. NFD-NP 처리한 마우스는 비히클 처리된 마우스와 비교하여 간 용해물의 계면활성제(detergent) 불용성 분획에서 p62 및 폴리우비퀴틴화된 단백질의 축적을 상당히 감소시켰고(도 7a 및 7b), 이는 HFD로 유도된 마우스의 지질소립 및 단백질 응집체의 감소를 제시한다. 면역조직화학 분석 결과 비히클 처리 된 HFD 섭취 마우스와 비교하여 NFD-NP로 처리된 마우스에서 간세포에서 p62를 함유하는 단백질 응집체가 감소한 것을 나타내었다(도 7c).

[0111] NFD-NP 처리가 HFD에 의한 생체 스트레스에 영향을 미치는지 알아보기 위해 간에 대한 전사 분석을 수행했다. ER 스트레스에 관여하는 간 유전자의 발현은 NFD-NP 처리된 HFD마우스에서 감소되었다(도 7d). 또한 NFD-NP 처리가 비만 동안 칼슘/칼모둘린 의존성 단백질 키나아제 II (CaMKII) 활성을 조절하는지 여부를 결정했다. 면역검출분석은 CaMKII의 인산화가 NFD-NP처리 된 HFD마우스의 간에서 현저하게 억제됨을 보여 주었고(도 7e 및 7f), NFD-NP 치료가 비만 동안 손상된 칼슘 항상성을 회복시킨다는 것을 보여 준다.

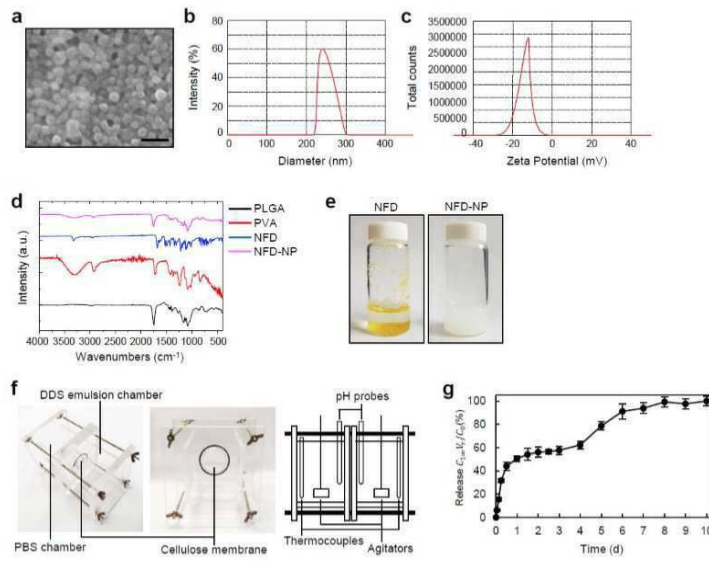
[0113] 결론적으로, NFD-담재된 PLGA NP (NFD-NPs)의 꼬리정맥주사는 마우스 간에서 NFD 및 나노입자(NPs)의 효율적인 전달을 나타낸다. NP에 담재된 NFD의 지속적인 방출은 HFD 또는 포화 지방산에 의해 유도 된 유비퀴틴화된 단백질 함유물의 축적을 억제한다. NFD-NP의 정맥 내 투여는 HFD 유발 인슐린 저항성을 저하시켜 포도당 내성을 개선 할뿐만 아니라 HFD에 의해 유도된 지방간질환을 완화한다.

도면

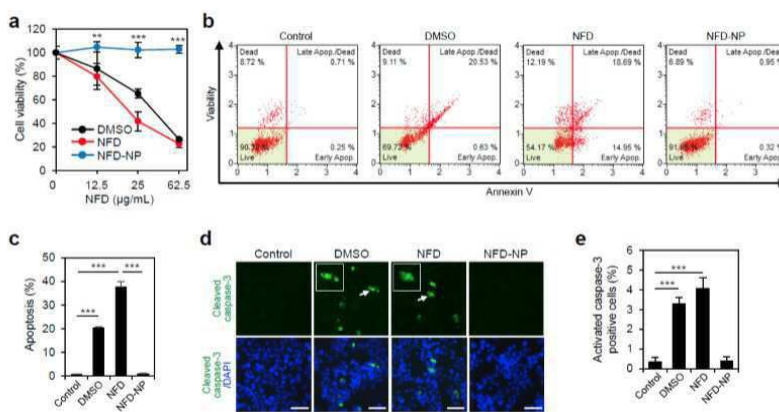
도면1



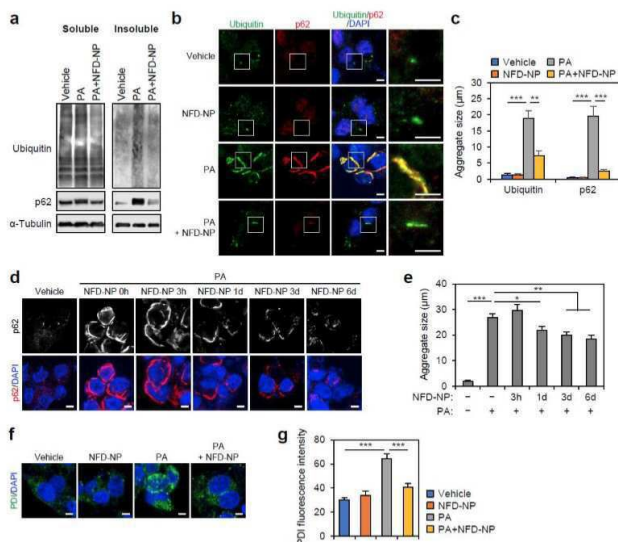
도면2



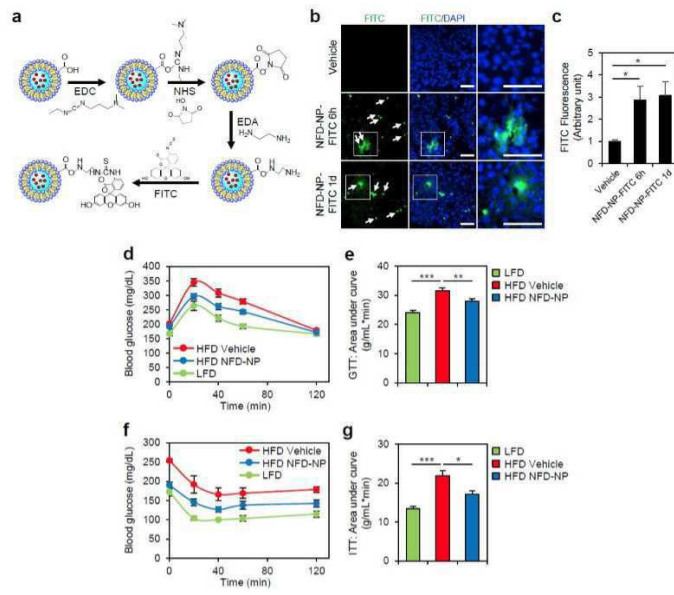
도면3



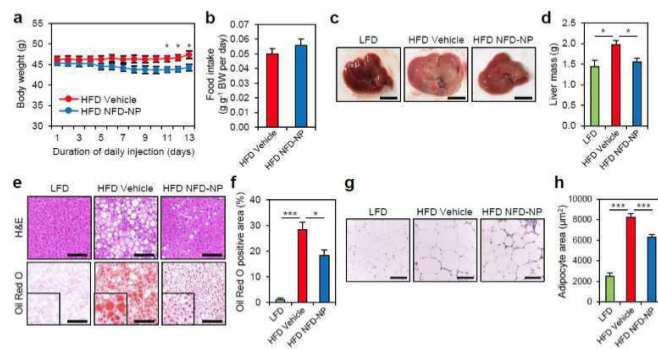
도면4



도면5



도면6



도면7

