(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0134319
(43) 공개일자 2024년09월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/107 (2006.01) *A61K 31/164* (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/107 (2013.01)
A61K 31/164 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7023563
(22) 출원일자(국제) 2022년12월12일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년07월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/081372
(87) 국제공개번호 WO 2023/114722
국제공개일자 2023년06월22일
(30) 우선권주장
63/265,314 2021년12월13일 미국(US)

(71) 출원인
더 리전트 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아
미국 94607-5200 캘리포니아주 오클랜드 플랭크린 스트리트 1111 12층
(72) 발명자
피오멜리 다니엘
미국 캘리포니아주 92697 어바인 스위트 100 5270 캘리포니아 애비뉴 유씨아이 비올 어플라이드 이노베이션 내
린 린
미국 캘리포니아주 92697 어바인 스위트 100 5270 캘리포니아 애비뉴 유씨아이 비올 어플라이드 이노베이션 내
(74) 대리인
특허법인아주

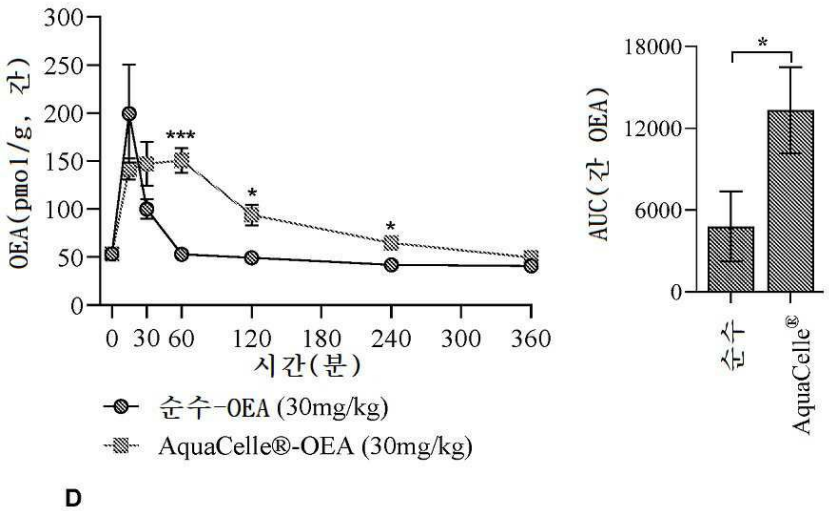
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **올레오일에탄올아마이드의 생체 이용 가능한 제형을 이용한 간지방증 치료 방법**

(57) 요 약

대상체의 간에서 지질 축적을 감소시키는 생체 이용 가능한 제형으로 올레오일에탄올아마이드(OEA)를 전달하기 위한 조성물 및 방법. 본 명세서에는 이 천연 지질 아마이드가 항지방증 효과를 발휘하는 간 실질로의 화합물 운반을 가능하게 하는 새로운 OEA 제형이 기술된다. 이 제형은 제형화되지 않은 OEA 또는 OEA의 상이한 제형(Levagen®-OEA)보다 유의하게 더 큰 경구 생체이용률을 제공한다. 더욱이, 새로운 OEA 제형의 경구 투여는 인간 대사 증후군의 마우스 모델에서 생성된 간 지방증을 약화시킨다. 본 조성물은 인간 비알코올성 간 지방증의 치료에 유용하다.

대 표 도 - 도7d



D

(52) CPC특허분류
A61P 1/16 (2018.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

5 내지 15 중량%의 올레오일에탄올아마이드(oleoylethanolamide: OEA) 및 85 내지 95%의 자가 유화 약물 전달 시스템(self-emulsifying drug delivery system: SEDDS)을 포함하는 조성물로서,

상기 SEDDS는 중간 사슬 트라이글리세라이드, 시트러스 오일 및 레시틴을 포함하는 담체 오일을 포함하고, 상기 조성물은 상기 OEA의 생체이용률의 적어도 2배 증가를 촉진하는, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 SEDDS가 AquaCelle®을 포함하는 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 조성물이 10 내지 12%의 OEA 및 88 내지 90%의 AquaCelle®을 포함하는 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 조성물이 11%의 OEA 및 89%의 AquaCelle®을 포함하는 조성물.

청구항 5

올레오일에탄올아마이드(OEA)를 이를 필요로 하는 대상체의 간으로 전달하는 방법으로서,

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물의 경구 투여를 포함하는, 방법.

청구항 6

대상체의 간 지방증을 감소시키는 방법으로서,

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물의 경구 투여를 포함하는, 방법.

청구항 7

대상체의 비알코올성 지방간 질환(NAFLD)을 치료하는 방법으로서,

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물의 경구 투여를 포함하는, 방법.

청구항 8

대상체의 비알코올성 지방간염(NASH)을 치료하는 방법으로서,

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물의 경구 투여를 포함하는, 방법.

청구항 9

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 인간인, 방법.

청구항 10

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물이 장용 코팅 캡슐로 투여되는, 방법.

청구항 11

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 4주 내지 24주 동안 1일 1회 투여되는, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 조성물이 4주 내지 24주 동안 1일 2회 투여되는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2021년 12월 13일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/263,314호의 이익을 주장하며, 이의 전체 내용은 본 출원에 참조에 의해 원용된다.

배 경 기 술

[0002] 비알코올성 지방간 질환(NAFLD)은 서구 세계에서 만성 간 질환의 가장 흔한 원인이다. 이는 C형 간염 대신 간 이식의 주된 적응증이 될 것으로 예상된다. NAFLD는 비만과 연관이 있으며 비알코올성 지방간염(NASH) 및 말기 간 질환으로 진행될 수 있다. NAFLD 또는 NASH에 대해 승인된 약물 치료는 없다. 동물 및 인간 연구는 올레오일에탄올아마이드(oleoylethanolamide: OEA)가 NAFLD 치료에 적용될 수 있지만, 이 자연 발생 분자의 임상적 사용이 바람직하지 않은 물리화학적 특성과 빠른 효소 매개 분해의 조합으로 인한 그의 불량한 생체이용률에 의해 크게 제한된다는 것을 시사한다.

[0003] 식사 후, 상부 소장의 흡수성 상피는 식이성 지질의 가수분해로부터 유래된 올레산의 분획을 OEA 생산쪽으로 우회시킨다(Schwartz et al., 2008, DiPatrizio and Piomelli, 2015). 장 내에서 국소 전달자 역할을 하면서 OEA는 말초 감각 구심성 신경의 모집(Rodriguez de Fonseca et al., 2001) 및 신경전달물질로서 옥시토신 및 히스타민을 활용하는 중추 경로의 활성화(Gaetani et al., 2010, Provensi et al., 2014)를 수반하는 메커니즘을 통해 음식 섭취를 감소시킨다. 여러 증거에 따르면 OEA는 리간드에 의해 작동되는 전사 인자인 퍼옥시솜 증식인자-활성화 수용체-α(*PPAR*-α)를 체결시켜 이 반응을 개시하는 것이 시사된다. 첫째, OEA는 현재까지 식별된 가장 강력한 자연 발생 *PPAR*-α 작동제(agonist) 중 하나이다(친화도 상수, KD, ≈40nM; 중앙 유효 농도, EC50, ≈120nM)(Fu et al., 2003, Astarita et al., 2006a). 둘째, OEA의 포만감 유도 효과는 *PPAR*-α 결실에 의해 폐기되고 합성 *PPAR*-α 작동제에 의해 모방되며, 장 점막에서 *PPAR*-α 조절 전사 증가와 연관이 있다(Fu et al., 2003). 셋째, 래트 공장에서 바이러스 매개의 OEA 생산 향상은 음식 섭취를 감소시키고 동시에 *PPAR*-α 표적 유전자의 국소 발현을 증가시킨다(Fu et al., 2008). 마지막으로, 어류, 뱀, 및 설치류를 포함한 다양한 척추동물 종의 소장 내 OEA 수준은 *PPAR*-α 활성화와 일치하는 농도 범위(Fu et al., 2003, Astarita et al., 2006a)인 금식(즉, 공복) 상태의 50nM 이하에서부터 섭식 후 250nM 이상으로 상승한다(Astarita et al., 2006b, Fu et al., 2007, Tinoco et al., 2014, Igarashi et al., 2017). 요약하자면, 이용 가능한 데이터는 OEA가 포만감 제어에 참여하는 소장 *PPAR*-α에 대한 생리학적으로 관련된 내인성 작동제임을 나타낸다(DiPatrizio and Piomelli, 2015).

[0004] 섭식은 간에서도 OEA 생산을 조절하지만, 장에서 관찰되는 것과 반대 방향이다: 간 OEA 수준은 금식 상태에서 상승하고 섭식 후에는 떨어진다(Fu et al., 2007, Izzo et al., 2010). 이러한 변화의 분자적 토대 및 생리학적 유의성은 자세히 조사되었다. 연구에 따르면 금식은 간외 비만 세포를 자극하여 히스타민을 분비하게 하며, 히스타민은 문맥 순환을 통해 간에 들어가고 G 단백질-커플링된 H1 수용체를 활성화하며 국소 OEA 생합성을 촉발하는 것으로 밝혀져 있다(Misto et al., 2018). 이 과정을 방해하는 유전자적 또는 약리학적 조작은 지방분해에 영향을 미치지 않지만, 금식으로 인한 케톤생성을 현저하게 약화시켜 전신 지질 항상성에서 비만 세포 유래 히스타민 및 간 OEA 생산에 대한 이전에 예상하지 못했던 조절 역할을 드러낸다(Misto et al., 2018). 이러한 역할과 일관되게, OEA의 아만성(subchronic) 복강내 투여는 비만 Zucker 래트(Fu et al., 2005) 및 비알코올성 지방간 질환의 래트 모델(Li et al., 2015)에서 간 지방증을 약화시킨다. 더욱이, 복강내 OEA 투여는 단리된 래트 간세포에서 지방산 산화를 자극하고 살아있는 래트의 케톤체 생성(케톤생성)을 향상시킨다(Guzman et al., 2004). 마지막으로, 아만성 복강내 OEA 투여는 식이 유도 비만 마우스의 간에서 지질 축적, 염증 반응 및 섬유증을 감소시킨다(Lin et al., 2022; PMID: 35691287).

[0005] 복강내 OEA 투여는 간 지방증의 설치류 모델에서 명백히 유익하지만, NAFLD에 대한 경구 치료로서 OEA의 임상적 적용은 2가지 주요 요인에 의해 저해된다: (1) 경구 투여 후, OEA는 지방산 아마이드 가수분해효소 및 다른 지질 아미다제에 의해 촉매되는 급속한 생체내 분해를 겪고(Piomelli, 2013; PMID: 23567058); 그리고 (2) OEA는 약물 유사 특성이 제한적인 친지성 분자이다.

[0006] OEA를 생체 이용 가능하게 하는 방식, 특히 간에서 효과적이고 이용 가능하게 하는 방식으로 이를 전달하는 수

단은 여전히 필요하다.

발명의 내용

[0007] 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법은 대상체의 간에서 지질 축적을 감소시키는 생체 이용 가능한 제형으로 OEA를 전달하는 수단을 제공한다. 본 명세서에는 이 천연 지질 아마이드가 이의 항지방증 효과를 발휘하는 간 실질로의 화합물 운반을 허용하는 새로운 OEA 제형이 기술된다. 이 제형은 제형화되지 않은('순수(neat)') OEA 또는 상이한 OEA 제형(Levagen®-OEA)보다 유의하게 더 큰 경구 생체이용률을 제공한다. 더욱이, 새로운 OEA 제형의 경구 투여는 인간 대사 증후군의 마우스 모델에서 생성된 간 지방증을 약화시킨다. 본 명세서에 기재된 데이터는 NASH를 포함하는 인간 NAFLD의 치료에 조성물의 사용을 뒷받침한다.

[0008] 본 명세서에는 5 내지 15 중량%의 OEA 및 85 내지 95%의 자가 유화 약물 전달 시스템(self-emulsifying drug delivery system: SEDDS)을 포함하는 조성물이 기술된다. 일부 실시형태에서, SEDDS는 중간 사슬 트라이글리세라이드, 시트러스 오일 및 레시틴을 포함하는 담체 오일을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 OEA의 생체이용률의 적어도 2배 증가를 촉진한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 OEA의 생체이용률의 적어도 3배 증가를 촉진한다. 일부 실시형태에서, SEDDS는 AquaCelle®을 포함한다.

[0009] AquaCelle®로 시판되는 SEDDS는 2019년 12월 12일자로 공개된 미국 특허 공개 제20190374494호에 기술되어 있다. 또한, 문헌[Bremmell, K.E.; *et al*, A self-emulsifying Omega-3 ethyl ester formulation (AquaCelle) significantly improves eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid bioavailability in healthy adults. *Eur. J. Nutr.* 2019, *59*, 2729-2737]을 참조한다. 기능 음식을 전달하는 방법에 대한 추가 정보는 문헌[Subramanian, P. Lipid-Based Nanocarrier System for the Effective Delivery of Nutraceuticals. *Molecules* 2021, *26*, 5510 https://doi.org/10.3390/molecules26185510]에서 찾아볼 수 있다.

[0010] 일부 실시형태에서, 조성물은 10 내지 12%의 OEA 및 88 내지 90%의 AquaCelle®을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 11%의 OEA 및 89%의 AquaCelle®을 포함한다. 일부 실시형태에서, 담체 오일은 최대 약 11 중량%로 포함되고, 시트러스 오일은 최대 약 10 중량%로 포함되며, 레시틴은 최대 약 11 중량%로 포함된다.

[0011] 일부 실시형태에서, SEDDS의 조성물 백분율은 수성 환경에 분산된 경우, 조성물이 약 1 내지 20 마이크로미터의 평균 직경을 갖는 미셀 집단을 형성하도록 하는 정도이다. 일부 실시형태에서, 조성물은 평균 직경이 약 5 내지 15 마이크로미터인 미셀 집단을 형성한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 평균 직경이 약 12 내지 13 마이크로미터인 미셀 집단을 형성한다.

[0012] 일부 실시형태에서, 조성물은 항산화제를 추가로 포함한다. 대표적인 항산화제로는 레시틴, 아스코르빌 팔미테이트, d-알파-토코페롤, dl-알파-토코페롤, d-알파-토코페릴 아세테이트, dl-알파-토코페릴 아세테이트, d-알파-토코페릴산 숙시네이트, dl-알파-토코페릴산 숙시네이트, 비타민 E 및 이의 유도체, 올리브 폴리페놀, 조류(Algal) 폴리페놀 및 이들의 혼합물을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 항산화제는 0 내지 0.5 중량%의 농도로 존재한다. 일부 실시형태에서, 항산화제는 약 0.01 중량%의 농도로 존재한다. 일부 실시형태에서, 항산화제는 약 0.02 중량%의 농도로 존재한다. 일부 실시형태에서, 항산화제는 약 0.1 중량%의 농도로 존재한다. 일부 실시형태에서, 항산화제는 약 0.5 중량%의 농도로 존재한다.

[0013] 일부 실시형태에서, 조성물은 부형제를 추가로 포함한다. 대표적인 부형제로는 콜로이드 실리카, 옥수수 전분, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스(HPMC), 말토덱스트린, 스테아르산 마그네슘, 수산화 마그네슘, 미세결정성 셀룰로오스, 덱스트린, 소르비톨, 만니톨 및 트레할로스를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 부형제는 약 30 중량% 내지 약 90 중량%의 농도로 존재한다. 일부 실시형태에서, 부형제는 약 30 중량% 내지 약 90 중량%의 농도로 존재한다.

[0014] 또한, 본 명세서에는 올레오일에탄올아마이드(OEA)를 이를 필요로 하는 대상체의 간으로 전달하는 방법이 기술된다. 일부 실시형태에서, 방법은 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물의 경구 투여를 포함한다. 또한, 대상체의 간 지방증을 감소시키는 방법, 뿐만 아니라 대상체의 비알코올성 지방간 질환(NAFLD)을 치료하는 방법, 및 대상체의 비알코올성 지방간염(NASH)을 치료하는 방법도 기술된다. 일부 실시형태에서, 이들 방법 각각은 본 명세서에 기재된 조성물의 경구 투여를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0015] **도 1**. 문맥 순환 및 간에서 금식으로 인한 히스타민 신호전달에 미치는 HFD 노출의 효과. (A, B) 문맥 혈장에서

히스타민 식별. (A) 문맥 혈장에서 인증된 [$^{2}H_4$]-히스타민 및 천연 히스타민의 용출을 보여주는 대표적인 LC/MS-MS 추적. (B) 문맥 혈장에서 진단 이온 $[M-NH_3]^+$(*m/z* = 95.1 및 *m/z* = 99.1)의 존재를 보여주는 천연 및 [$^{2}H_4$]-히스타민의 질량 스펙트럼. (C-E) 음식 공급(빈 기호) 및 HFD 공급(채워진 기호) 마우스에서 자유 섭식(원), 먹이 부족(사각형) 및 먹이 부족/재섭식(삼각형)의 효과. (C) 문맥 혈장의 히스타민 농도. (D) 간에서의 히스타민 H_1 수용체(*H1r*) 전사. (E) 간에서의 히스타민 H_2 수용체(*H2r*) 전사. (F) 간에서 히스타민 H_4 수용체(*H4r*) 전사. 데이터는 평균 ± SEM(*n* = 4-6)으로 표현되며, 이원 ANOVA에 이어 Sidak의 다중 비교 검정을 사용하여 분석했다. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$.

도 2. 간 조직에서 금식 유도 OEA 신호 전달에 미치는 HFD 노출의 효과. (A) 간에서 OEA 및 이의 레지오널(regional) 이성질체 VEA의 존재를 보여주는 대표적인 LC/MS-MS 추적. (B-F) 음식 공급(빈 기호) 및 HFD 공급(채워진 기호) 마우스에서 자유 섭식(원), 먹이 부족(사각형) 및 먹이 부족/재섭식(삼각형)의 효과. (B) 간에서의 OEA 함량 (C) 간에서의 AEA 함량. (D) 간에서의 PEA 함량. (E) 간에서의 NAPE-PLD(*Napepld*) 전사. (F) 간에서의 FAAH(*Faah*) 전사. 데이터는 평균 ± SEM(n = 4-9)으로 표현되며 이원 ANOVA에 이어 Sidak의 다중 비교 검정을 사용하여 분석했다. * 또는 $^{\#}p < 0.05$, ** 또는 $^{\#\#}p < 0.01$, *** 또는 $^{\#\#\#}p < 0.001$. VEA, 바세노일에탄올아마이드.

도 3: HFD 공급 마우스의 간에 미치는 VEH 또는 OEA 투여 효과. (A) Oil Red O(왼쪽에서 2번째), BODIPY(왼쪽에서 3번째) 및 PSR(오른쪽)로 염색된 동일계내 간(왼쪽) 및 간 절편의 대표적인 이미지. (B) HFD에 노출된 VEH 처리(빈 기호) 또는 OEA 처리(채워진 기호) 마우스로부터의 간 내 BODIPY 형광의 정량화. (C) HFD에 노출된 VEH 처리(빈 기호) 또는 OEA 처리(채워진 기호) 마우스로부터의 간 내 PSR 형광의 정량화. (D) HFD에 노출된 VEH 처리(빈 기호) 또는 OEA 처리(채워진 기호) 마우스로부터의 간 내 총 트라이글리세라이드 함량. (E) 인터루킨 IL6 단백질. (F 내지 M) *Il1b*(F), *Ccl2*(G), *Col1a1*(H), *Hmox1*(I), *Nrf1*(J), *Tnfa*(K), *Tgfb1*(L) 및 *Nqo1*(M)의 간 전사. (B-G) 데이터는 평균 ± SEM(n = 4-6)으로 표현되며 독립표본 양측 스튜던트 *t* 검정을 사용하여 분석했다. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$. VEH, 비히클.

도 4. HFD에 노출된 수컷 C57Bl/6J 마우스는 비만, 고혈당증 및 간 지방증을 발생시킨다. (A) 정규 음식(빈 기호) 또는 HFD(채워진 기호)에 노출된 마우스의 체중 증가의 시간 경과. (B) 음식 공급 또는 HFD 공급 마우스로부터의 심장 혈장 내 공복 혈당(또는 글루코스) 농도. (C) 음식 공급 또는 HFD 공급 마우스의 간 내 총 트라이글리세라이드 함량. (D) Oil Red O로 염색된 음식 공급(왼쪽) 또는 HFD 공급(오른쪽) 마우스의 간 조직 절편에 대한 대표적인 이미지. 데이터는 평균 ± S.E.M(A, n = 20-26; B-C, n = 4-7)으로 표현되고, 이원 ANOVA에 이어 Sidak의 다중 비교 검정(A) 또는 독립표본 양측 스튜던트 *t* 검정(B,C)을 사용하여 분석했다. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

도 5. HFD 공급 마우스의 체중 증가에 미치는 OEA 투여의 효과. (A) OEA 처리 시작 전(A) 및 후(B)의 체중 궤적. 데이터는 평균 ± S.E.M으로 표현되며 이원 ANOVA에 이어 Sidak의 다중 비교 검정을 사용하여 분석했다. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

도 6. 식이 유도 비만 마우스의 간 조직학에 미치는 비히클(VEH) 또는 OEA의 효과를 보여주는 간 절편의 H&E 염색.

도 7A 내지 도 7D. 마우스에서 제형화되지 않은 OEA(순수-OEA), Levagen®-OEA 및 Aquacelle®-OEA의 약동학(PK) 프로파일. 투여량은 30 mg/kg 유리 OEA에 상응했다. 삽입도는 곡선 아래 면적(AUC) 값을 보여준다. (7A, 7B) (7A) 혈장 및 (7B) 간에서의 순수-OEA 대 Levagen®-OEA의 비교 PK 프로파일. (7C, 7D) (7C) 혈장 및 (7D) 간에서의 순수-OEA 대 Aquacelle®-OEA의 비교 PK 프로파일. 데이터는 평균 ± SEM(n = 9-11)으로 표현되며 이원 ANOVA에 이어 Sidak의 다중 비교 검정 또는 독립표본 *t* 검정을 사용하여 분석했다. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

도 8. (A) 연구 설계를 요약하는 계획도. (B) 3주간의 고지방 식이(HFD) 노출 후 및 대조군(AquaCelle® 단독, 원) 및 OEA 처리(AquaCelle®-OEA, 삼각형) 그룹으로 무작위 배분하기 전에 연구에 포함된 모든 동물 대상체의 체중. (C) AquaCelle® 단독 및 AquaCelle®-OEA로 처리하는 동안 마우스의 체중 증가. 데이터는 평균 ±

SEM(n = 9/그룹)으로 표현되며 독립표본 *t* 검정 또는 이원 ANOVA에 이어 Sidak의 다중 비교 검정을 사용하여 분석했다. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

도 9A 내지 도 9D. 간 지방증이 있는 식이 유도 비만 마우스에 AquaCelle® 단독 또는 AquaCelle®-OEA 경구 투여의 효과. (9A) 절제된 간(왼쪽), BODIPY로 염색된 간 절편(중간), 및 Oil Red O로 염색된 간 절편(오른쪽)의 대표적인 이미지. (9B) AquaCelle® 단독(원) 또는 AquaCelle®-OEA(삼각형)로 처리한 마우스(n=8/9)의 평균 간 중량. (9C) AquaCelle® 단독 또는 AquaCelle®-OEA로 처리한 마우스(n=4/그룹)의 간 내 BODIPY 형광의 정량화. (9D) AquaCelle® 단독 또는 AquaCelle®-OEA로 처리된 마우스로부터의 간 절편 내 액적 크기 분포. 데이터는 평균 ± SEM으로 표현되고 독립표본 양측 스튜던트 *t* 검정을 사용하여 분석했다. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

도 10A 내지 도 10I. AquaCelle® 단독 또는 AquaCelle®-OEA로 처리된 간 지방증이 있는 식이 유도 비만 마우스의 혈장 혈액 프로파일. (10A) 트라이글리세라이드(TAG), (10B) AST, 아스파테이트 트랜스아미나제, (10C) ALT, 알라닌 트랜스아미나제, (10D) 콜레스테롤, (10E) 글루코스, (10F) 알부민, (10G) 글로불린, (10H) 아밀라제, (10I) CPK, 크레아틴 키나제. Veh, AquaCelle® 단독; OEA, AquaCelle®-OEA, 데이터는 평균 ± SEM(n = 6/7)으로 표현되며 독립표본 양측 스튜던트 *t* 검정을 사용하여 분석했다. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법은 이 천연 지질 아마이드가 이의 항지방증 효과를 발휘하는 간 실질로 화합물의 운반을 가능하게 하는 새로운 OEA 제형을 제공한다. 이 제형은 제형화되지 않은 OEA 또는 Levagen®-OEA보다 유의하게 더 큰 경구 생체이용률을 제공한다. 더욱이, 새로운 OEA 제형의 경구 투여는 인간 대사 증후군의 마우스 모델에서 생성된 간 지방증을 약화시킨다. 본 명세서에 기술된 데이터는 인간 비알코올성 간 지방증의 치료에 조성물의 사용을 뒷받침한다.

[0017] 정의

[0018] 본 출원에 사용된 모든 과학 및 기술 용어는 달리 명시되지 않는 한 관련 기술분야에서 일반적으로 사용되는 의미를 갖는다. 본 출원에 사용된 바와 같이, 다음 단어 또는 어구는 특정된 의미를 갖는다.

[0019] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "대조군" 또는 "참조" 샘플은 정상적이고 건강한 대조군 대상체로부터 수득될 수 있는 것과 같은 각 마커의 정상적인 측정값을 대표하는 샘플, 또는 비교를 위해 사용되는 마커의 기준선 양을 의미한다. 전형적으로, 기준선은 동일한 대상체 또는 환자로부터 취한 측정일 것이다. 샘플은 테스트에 사용된 실제 샘플, 또는 상응하는 마커의 알려진 정상적인 측정에 기초한 참조 수준 또는 범위일 수 있다.

[0020] 본 명세서에 사용된 "유의한 차이"는 통계적으로 유의한 차이, 또는 상황 하에서 적정한 수준의 신뢰도로 검출될 수 있는 충분한 크기가 있는 차이와 같은 관련 기술분야의 기술자에 의해 신뢰할 수 있는 것으로 간주되는 방식으로 검출될 수 있는 차이이다. 한 예에서, 참조 샘플에 비해 10%의 증가 또는 감소는 유의한 차이이다. 다른 예에서, 참조 샘플에 비해 20%, 30%, 40% 또는 50%의 증가 또는 감소는 유의한 차이로 간주된다. 또 다른 예에서, 참조 샘플에 비해 2배의 증가는 유의한 것으로 간주된다.

[0021] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "약제학적으로 허용되는 담체" 또는 "부형제"는 활성 성분과 조합될 때 성분이 생물학적 활성을 유지하도록 허용하고 대상체의 면역 체계와 비반응성인 임의의 물질을 포함한다. 이러한 담체를 포함하는 조성물은 잘 알려진 통상적인 방법에 의해 제형화된다(예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990 참조).

[0022] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 인간 또는 비인간 동물을 포함한다. "비인간 동물"이라는 용어는 모든 척추동물, 예를 들어 포유동물 및 비포유동물, 예컨대 비인간 영장류, 말, 양, 개, 소, 돼지, 닭 및 다른 수의학적 대상체를 포함한다. 전형적인 실시형태에서, 대상체는 인간이다.

[0023] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 영어의 관사("a" 또는 "an")에 수반되는 단수 표현은 달리 명확하게 표시되지 않는 한, 적어도 하나를 의미한다.

[0024] 조성물

[0025] 본 명세서에는 5 내지 15 중량%의 OEA 및 85 내지 95%의 자가 유화 약물 전달 시스템(SEDDS)을 포함하는 조성물이 기술된다. 일부 실시형태에서, SEDDS는 중간 사슬 트라이글리세라이드, 시트러스 오일 및 레시틴을 포함하는

담체 오일을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 대상체에게 투여될 때 순수 OEA의 투여에 비해 OEA의 생체이용률의 적어도 2배 증가를 촉진한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 OEA의 생체이용률의 적어도 3배 증가를 촉진한다. 일부 실시형태에서, SEDDS는 AquaCelle®을 포함한다.

[0026] AquaCelle®로 시판되는 SEDDS는 2019년 12월 12일자로 공개된 미국 특허 공개 제20190374494호에 기술되어 있다. 또한, 문헌[Bremmell, K.E.; *et al*, A self-emulsifying Omega-3 ethyl ester formulation (AquaCelle®) significantly improves eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid bioavailability in healthy adults. *Eur. J. Nutr.* 2019, *59*, 2729-2737]을 참조한다. 기능 음식을 전달하는 방법에 대한 추가 정보는 문헌[Subramanian, P. Lipid-Based Nanocarrier System for the Effective Delivery of Nutraceuticals. *Molecules* 2021, *26*, 5510 https://doi.org/10.3390/molecules26185510]에서 찾아볼 수 있다.

[0027] 일부 실시형태에서, 조성물은 10 내지 12%의 OEA 및 88 내지 90%의 AquaCelle®을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 11%의 OEA 및 89%의 AquaCelle®을 포함한다. 일부 실시형태에서, 담체 오일은 최대 약 11 중량%로 포함되고, 시트러스 오일은 최대 약 10 중량%로 포함되며, 레시틴은 최대 약 11 중량%로 포함된다.

[0028] 일부 실시형태에서, SEDDS의 조성물 백분율은 수성 환경에 분산된 경우, 조성물이 약 1 내지 20 마이크로미터의 평균 직경을 갖는 미셀 집단을 형성하도록 하는 정도이다. 일부 실시형태에서, 조성물은 평균 직경이 약 5 내지 15 마이크로미터인 미셀 집단을 형성한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 평균 직경이 약 12 내지 13 마이크로미터인 미셀 집단을 형성한다.

[0029] 일부 실시형태에서, 조성물은 예를 들어 장용 코팅 캡슐과 같은 장용 코팅에서 전달용으로 제형화된다. 장용 코팅 캡슐은 위에서 본래 상태로 남아 있고, 그 다음 장에서 활성 물질을 방출하도록 설계된다. 장용 코팅은 과립, 펠릿, 캡슐 또는 정제와 같은 고체 투여 형태에 적용되어 산 또는 위 효소 불안정성 약물의 분해를 방지하여 약물 생체이용률을 개선시킬 수 있다.

[0030] 일부 실시형태에서, 조성물은 항산화제를 추가로 포함한다. 대표적인 항산화제로는 레시틴, 아스코르빌 팔미테이트, d-알파-토코페롤, dl-알파-토코페롤, d-알파-토코페릴 아세테이트, dl-알파-토코페릴 아세테이트, d-알파-토코페릴산 숙시네이트, dl-알파-토코페릴산 숙시네이트, 비타민 E 및 이의 유도체, 올리브 폴리페놀, 조류 폴리페놀 및 이들의 혼합물을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 항산화제는 0 내지 0.5 중량%의 농도로 존재한다. 일부 실시형태에서, 항산화제는 약 0.01 중량%의 농도로 존재한다. 일부 실시형태에서, 항산화제는 약 0.02 중량%의 농도로 존재한다. 일부 실시형태에서, 항산화제는 약 0.1 중량%의 농도로 존재한다. 일부 실시형태에서, 항산화제는 약 0.5 중량%의 농도로 존재한다.

[0031] 일부 실시형태에서, 조성물은 부형제를 추가로 포함한다. 대표적인 부형제로는 콜로이드 실리카, 옥수수 전분, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스(HPMC), 말토덱스트린, 스테아르산 마그네슘, 수산화 마그네슘, 미세결정성 셀룰로오스, 덱스트린, 소르비톨, 만니톨 및 트레할로스를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시형태에서, 부형제는 약 30 중량% 내지 약 90 중량%의 농도로 존재한다. 일부 실시형태에서, 부형제는 약 30 중량% 내지 약 90 중량%의 농도로 존재한다.

[0032] 방법

[0033] OEA를 필요로 하는 대상체의 간으로 이를 전달하는 방법이 제공된다. 일부 실시형태에서, 방법은 본 명세서에 기술된 바와 같은 조성물의 경구 투여를 포함한다. 또한, 대상체에서 간 지방증을 감소시키는 방법뿐만 아니라, 대상체에서 NAFLD를 치료하는 방법 및 대상체에서 NASH를 치료하는 방법이 기술된다. 일부 실시형태에서, 이들 방법 각각은 본 명세서에 기재된 조성물의 경구 투여를 포함한다. 아래 실시예에서 입증된 바와 같이, 조성물의 투여는 간에서 지질 축적의 감소, 순환 트라이글리세라이드의 감소 및 간 효소인 AST 및 ALT 수준의 감소를 초래한다.

[0034] 일부 실시형태에서, 투여량은 투여당 30 내지 90mg이다. 일부 실시형태에서, 투여량은 90 내지 300mg이다. 또 다른 실시형태에서, 투여량은 300 내지 600mg이다. 투여는 경구, 협측, 직장 또는 위내 투여 경로를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 관련 기술분야에 공지된 경로를 통해 대상체에게 조성물을 제공하는 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 조성물을 투여하는 경구 경로가 바람직하다. 조성물은 단독으로 또는 음식 또는 음료와 조합하여 전달될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 장용 코팅 캡슐과 같은 장용 코팅으로 투여된다.

[0035] 일부 실시형태에서, 조성물은 매일 투여된다. 일부 실시형태에서, 투여는 1일 2회이다. 일부 실시형태에서, 조성물은 4주 내지 6주 동안 투여된다. 일부 실시형태에서, 조성물은 5주 동안 투여된다. 일부 실시형태에서, 조

성물은 4-24주 동안 투여된다.

[0036] 실시예

[0037] 다음 실시예는 본 발명을 예시하고 이를 제조하고 사용하는 데 있어서 관련 기술분야의 기술자를 돕기 위해 제시된다. 실시예는 어떤 방식으로든 본 발명의 영역를 달리 제한하는 것으로 의도된 것은 아니다.

[0038] 실시예 1: 식이 유도 비만은 마우스 간에서 히스타민 의존성 올레오일에탄올아마이드 신호 전달을 방해한다

[0039] 본 실시예는 아만성 OEA 투여가 HFD에 노출된 마우스의 간에서 지질 축적 및 염증 촉진성 및 섬유화 촉진 유전자의 전사를 감소시킨다는 것을 입증한다. 여기에 보고된 데이터는 간에서 히스타민 의존성 OEA 신호 전달의 방해가 비만 연관 비알코올성 지방간 질환의 병리에 기여할 수 있음을 보여준다.

[0040] 올레오일에탄올아마이드(OEA)는 에너지 평형의 중요한 지질 유래 조절자이다[1]. 기능이 광범위하게 연구되어 있는 소장에서 OEA는 식이 유래 올레산으로부터 식후에 생성되며[2] 포만감을 촉진하는 국소 전달자 역할을 한다[3 내지 5]. 이 효과는 OEA에 높은 친화도로 결합하는 리간드 작동 전사 인자인 퍼옥시좀 증식인자 활성화 수용체-α(PPAR-α)에 의해 매개된다[6,7]. 음식 섭취는 간에서도 OEA 동원을 조절하지만 소장에서 관찰되는 것과 반대 방향이다: 즉, 간의 OEA 함량은 금식 상태에서 증가하고 섭식 후에는 감소한다[8,9]. 이러한 변화의 생리학적 유의성은 최근 연구에서 조사되었다[10]. 그 결과는 금식이 간외 비만 세포를 자극하여 히스타민을 방출하게 하고, 히스타민이 문맥 순환을 통해 간에 들어가고 H1 유형 수용체를 활성화하여 국소 OEA 생산을 향상시킨다는 것을 시사한다. 이 신호 전달 과정을 방해하는 개입은 금식 유도의 케톤 생성을 대략 50% 감소시킨다[10]. 이 효과는 케톤생성 제어에서 PPAR-α가 수행하는 중요한 역할[11], 뿐만 아니라 OEA가 PPAR-α와 체결하여 지방분해를 자극하고 지방산 산화를 향상시키고, 비만 래트 및 마우스에서 체중 증가 및 간 트라이아실글리세롤 함량을 낮추는 것[12 내지 15]을 나타내는 데이터와도 일관된다. 위에 요약된 연구 결과는 금식으로 인한 비만 세포에서 문맥 순환으로의 히스타민 방출, 간에서 OEA 형성 자극, 및 OEA에 의한 PPAR-α-매개 케톤생성 강화를 수반하는 주변분비 신호 전달 과정을 상세하게 설명한다. 여기서, 본 발명자들은 소장에서 섭식에 의존적인 OEA 생산을 방해하는 것으로 알려진 식이 유도 비만[16]이 이러한 과정에 영향을 미칠 수 있는지 여부를 물었다.

[0041] 재료 및 방법

[0042] 화학물질

[0043] 본 발명자들은 Cayman Chemicals(미시간주 앤아버)로부터 OEA, 팔미토일에탄올아마이드(PEA), 아난다마이드 및 이들의 중수소 함유 유사체를 구입했다. 바세노일에탄올아마이드(VEA, 18:1 Δ^{11})는 기술된 바와 같이 제조했다[16]. 히스타민 및 [$^{2}H_4$]-히스타민은 Toronto Research Chemicals Canada(캐나다 토론토)에서, 에탄올아민 및 Oil Red O는 Sigma Aldrich(미국 미주리주 세인트루이스)에서 구입했고, DAPI(4',6-다이아미디노-2-페닐인돌)가 포함된 BODIPY 및 ProLong™ Gold 퇴색 방지 마운턴트(mountant)는 Thermo Fisher Scientific(미국 매사추세츠주 월섬)에서 구입했다. 모든 용매 및 시약은 이용 가능한 최고 등급이었다.

[0044] 동물

[0045] 수컷 C57Bl/6J 마우스(17주)는 Charles River(매사추세츠주 윌밍턴)에서 구입했다. 달리 명시되지 않는 한, 이들은 먹이와 물에 자유롭게 접근할 수 있는 통풍이 잘되는 케이지에서 그룹별로 수용되었다(4-5/케이지). 이들은 제어된 온도(22 ± 1℃)와 상대습도(55 ± 10%)에서 12시간 명암 주기(오전 6시 30분에 조명 켜짐)로 유지되었고 실험 전 1주 동안 조종되었다. 주거, 동물 유지 관리 및 모든 절차는 실험실 동물의 관리 및 사용에 대한 국립 보건원 지침에 따라 수행되었고 어바인에 소재하는 캘리포니아 대학교 기관 동물 관리 및 사용 위원회의 승인을 받았다.

[0046] 식이 유도 비만

[0047] 18주령의 마우스는 무작위로 두 그룹으로 배분했다; 한 그룹은 표준 음식(6.5% kcal 지방, Envigo 2020X, 캘리포니아주 리버모어)을 공급받았고 다른 그룹은 고지방 식이(HFD, 60% kcal 지방, D12492, Research Diets, 뉴저지주 뉴브룬스윅)을 공급받았다. 둘 다 11주 동안 자유롭게 이용할 수 있었다. 체중 및 음식 섭취량은 주당 3회 기록했다. 두 그룹의 동물은 다음 3개의 코호트로 무작위로 배분되었다: a) 자유 섭식, b) 금식(오후 6시부터 다음 날 오후 12시까지) 및 c) 금식/재섭식(금식 후 2시간 동안 먹이에 접근). 금식 및 금식/재섭식 그룹에 배정된 마우스는 식분증을 방지하기 위해 바닥에 철망이 있는 케이지에 수용되었다.

[0048] OEA 제조

[0049] 실험 직전에 OEA를 95% 식염수/5% Tween80(v/v)의 비히클에 용해시켰다. 이는 10mL/kg의 부피에 5 mg/kg으로 복강내(i.p.) 주사로 투여되었다.

[0050] 조직 수집

[0051] 문맥 혈액은 마취된 마우스로부터 칼륨-EDTA(K_2-EDTA)가 코팅된 23G×1 바늘(0.6mm×25mm)이 장착된 1mL 주사기를 사용하여 수집했다. 샘플은 K_2-EDTA로 코팅된 0.5mL 폴리프로필렌 튜브로 옮기고 얼음 위에 두었다. 튜브를 490×*g* 및 4℃에서 15분 동안 원심분리하고, 혈장 층을 수집하여 추가 처리를 위해 -80℃에 저장했다. 동물의 목을 잘라 안락사시킨 후, 간을 제거하고 드라이아이스에 급속 냉동시킨 후, 분석 전까지 -80℃에 저장했다.

[0052] 간 트라이글리세라이드 측정

[0053] 간 트라이글리세라이드는 비색 검정 키트(Cayman Chemicals)를 사용하여 정량화했다. 간략하게, ~30mg의 우측 간엽을 0.2 mL의 검정 완충액과 혼합하고 제조업체의 지침에 따라 처리했다.

[0054] 혈당 측정

[0055] 음식 공급 마우스 및 HFD 마우스의 그룹(n = 7-8)을 바닥에 철망이 있는 케이지로 옮기고 밤새 금식시켰다. Accu-Chek Aviva 측정기 및 테스트 스트립(Roche Diabetes Care, 인디애나주 인디애나폴리스)을 사용하여 꼬리 혈당을 측정했다.

[0056] 기타 생화학적 분석

[0057] Antech Diagnostics(캘리포니아주 어바인)에서 포괄적인 혈액 화학 패널을 수행했다.

[0058] 조직학적 분석

[0059] Oil Red O 염색: 본 발명자들은 간 샘플을 주형에 끼워넣고 저온 유지 장치를 사용하여 이를 7㎛ 두께 절편으로 자르고 4% 파라포름알데하이드(PFA)로 15분 동안 고정시켰다. 고정 후, 본 발명자들은 절편을 인산염 완충 식염수(PBS)에 2분 동안 침지시키고 아이소프로판올(60%)에 2분 동안 둔 다음, Oil Red O(아이소프로판올 중 60%)와 함께 30분 동안 인큐베이션했다. 마지막으로, 본 발명자들은 절편을 60% 아이소프로판올, 40% 물에 담그고 50% 글리세롤을 사용하여 유리 슬라이드에 올려놓았다. 이미지는 20× 배율로 촬영했다.

[0060] BODIPY 염색: 간 절편(두께 7㎛)은 PBS에 5분간 침지시키고 4% PFA로 15분간 고정시킨 후, PBS로 세척했다. 각 샘플을 소수성 펜으로 동그라미를 그리고 BODIPY(보론 디피로메텐; 1/1000 희석)로 30분 동안 염색했다. 샘플을 PBS에 담그고 DAPI(CAT: P36931)가 포함된 퇴색방지 마운턴트를 사용하여 올려놓았다. 이미지는 20× 배율로 포착했다.

[0061] 지질 분석

[0062] 분석물 추출

[0063] 냉동 간 샘플(~30-40mg)을 2mL Precellys® 연조직 바이알에 옮기고 내부 표준물질([$^2H_4$]-OEA, [$^2H_4$]-PEA 및 [$^2H_4$]-아난다마이드, 각각 100nM)을 함유하는 빙냉 아세톤(1mL)으로 희석했다. 샘플은 Bertin 균질화기를 사용하여 4℃에서 15 초/주기로 2주기 동안 1분 동안 균질화했고, 주기 사이에는 20초의 휴지 시간을 가졌다. 균질액을 4℃에서 490×*g*로 15분 동안 원심분리하고 상청액을 8mL 유리 바이알에 옮기고 N_2 하에 건조시켰다. 각 샘플을 클로로포름/메탄올/물(2mL/1mL/1mL, vol)로 희석하고 와류시킨 후 4℃에서 15분 동안 490×*g*로 원심분리했다. 유기 상을 수집하고 N_2 하에 건조시켰다. 펠릿을 아세토나이트릴(100㎕)에 재구성하고 비활성화된 유리 인서트로 옮기고 액체 크로마토그래피 질량 분광측정(LC/MS-MS) 분석을 위해 호박색 유리 바이알 내에 두었다. 히스타민 추출을 위해, 문맥 혈장 샘플(50㎕)을 1.5mL 플라스틱 바이알로 옮기고 [$^2H_4$]-히스타민(50㎕; 0.5 ㎍/ml)을 함유한 빙냉 아세토나이트릴(0.4mL)을 첨가하여 단백질을 침전시켰다. [$^2H_4$]-히스타민은 유리 결합을 방지하기 위해 증류수와 EDTA 용액에 제조되었다[17]. 샘플을 30초 동안 와류시키고 490×*g* 및 4℃에서 10분 동안 원심분리했다. 상청액을 비활성화된 유리 인서트로 옮기고 LC/MS-MS 분석을 위해 호박색 유리 바이알

내에 두었다.

[0064] LC/MS-MS 분석

[0065] OEA 정량화: 지방 아실 에탄올아마이드를 1260 시리즈 LC 시스템(Agilent Technologies, 캘리포니아주 산타클라라)을 사용하여 분획화했다. 단계 구배 분리는 Poroshell 120 칼럼(1.9㎛, 2.1×100mm, Agilent Technologies, 델라웨어주 윌밍턴)에서 용매 A로서 물 중의 0.1% 포름산과 용매 B로서 아세토나이트릴 중의 0.1% 포름산으로 이루어진 이동상을 사용하여 수행했다. 선형 구배가 사용되었다: 0.0 내지 9.5분 80% B; 9.51 내지 11.0분 95% B; 55% B에서 11.1 내지 15.50분 동안 유지. 칼럼 온도는 40℃, 오토샘플러 온도는 9℃로 유지되었다. 주입량은 2㎕, 유속은 0.3mL/min, 총 분석 시간은 15.5분이었다. 물/메탄올/아이소프로판올/아세토나이트릴(1:1:1:1, vol) 중 10% 아세톤으로 이루어진 세척 용액을 사용하여 각 주입 전에 오토샘플러 포트에서 20초 동안 주입 바늘을 세척했다. 질량 분석기는 양성 전기분무 이온화 모드로 작동되었다. 표 1에 제시된 획득 매개변수를 사용하여 다중 반응 모니터링을 통해 분석물을 정량화했다. 모세관 및 노즐 전압은 각각 3500 V 및 300 내지 500 V였다. 건조 가스 온도는 10 L/min의 유량으로 300℃였다. 차단 가스 온도는 10 L/hr의 유량으로 300℃였다. 분무기 압력은 40 psi로 설정되었다. 본 발명자들은 장비 제어, 데이터 획득 및 분석을 위해 MassHunter 소프트웨어(Agilent Technologies)를 사용했다.

표 1

질량 분석 획득 매개변수

[0066]

분석물	전구체 이온 (*m/z*)	생성 이온 (*m/z*)	조각화 전압 (V)	충돌 에너지 (V)
아난다마이드	348.3	62.2	132	14
[^{2}H]-아난다마이드	352.3	66.2	127	14
히스타민	112	95	112	13
[^{2}H]-히스타민	116	99	108	13
OEA	326.3	62.2	148	14
[^{2}H]-OEA	330.3	66.2	143	14
VEA	326.3	62.2	148	14
PEA	300.3	62.2	132	14
[^{2}H]-PEA	304.3	66.2	127	13

[0067] 히스타민 정량화: 본 발명자들은 BEH 아마이드 칼럼(1.7㎛, 2.1×50mm, Waters Corporation, 매사추세츠주 밀포드)을 사용했다. 이동상은 40mM 포름산 암모늄으로 이루어졌고, pH는 용매 A로서 포름산 및 용매 B로서 아세토나이트릴 중 0.1% 포름산을 사용하여 3.0으로 조정했다. 선형 구배는 다음과 같이 사용되었다: 0.0 내지 1.5분 75% B 1.51 내지 2.5분 65% B; 75% B에서 2.51 내지 5.50분 유지됨. 유속은 0.5mL/분이었다. 칼럼 온도는 40℃, 오토샘플러 온도는 9℃로 유지되었다. 주입량은 2㎕였다. 질량 분석기는 포지티브 모드로 작동되었다. 정량화는 표 1에 보고된 MRM 전이를 사용하여 수행했다. 모세관 전압은 2.8 kV였다. 소스 매개변수는 다음과 같다: 건조 가스 온도는 230℃, 유량은 9 L/분이었고; 분무기 압력은 30 psi로 설정되었고; 차단 가스 온도는 300℃였고 유량은 12 L/분이었으며; 모세관 전압은 2000V로 설정되었다.

[0068] 실시간 PCR

[0069] 본 발명자들은 간으로부터의 총 RNA를 TRIzol™ 시약(Thermo Fisher Scientific, 매사추세츠주 월섬)을 사용하여 추출했고 공급자의 지시에 따라 PureLink™ RNA Mini Kit(Invitrogen, 매사추세츠주 월섬)을 사용하여 정제했다. 정제에 앞서, 샘플은 gDNA Eliminator 스핀 칼럼(Qiagen, 캘리포니아주 저만타운)을 통해 통과시켰다. 본 발명자들은 NanoDrop 2000/2000-c 분광광도계(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 RNA를 정량화했다. cDNA는 제조업체의 지침에 따라 RNase 저해제(Applied BioSystems, 캘리포니아주 포스터 시트)가 포함된 High-Capacity cDNA RT 키트를 사용하여 2mg의 총 RNA로부터 합성했다. 제1 가닥 cDNA는 TaqMan™ Universal PCR

Master Mixture(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 증폭시켰다. 실시간 PCR 반응은 CFX96™ 실시간 시스템(Bio-Rad, 캘리포니아주 허큘레스)을 사용하여 96웰 플레이트에서 수행했다. 가열 주기 조건은 다음과 같다: 10분간 95℃로 설정된 초기 변성, 그 다음 45 주기, 여기서 각 주기는 95℃에서 30초, 이어서 55℃에서 60초 동안 수행되었다. ΔCt 값은 3가지 서로 다른 하우스키핑 유전자의 기하 평균을 사용하여 계산했고, 대조군(음식 자유 섭식) 대비 상대적 배수 변화는 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법으로 계산했다[18]. 실시간 PCR 프라이머 및 형광원성 프로브는 Applied Biosystems(TaqMan(R) Gene Expression Assays, 캘리포니아주 포스터 시티)에서 구입했다. 본 발명자들은 마우스 *Actb*(Mm00607939_s1), *Hprt*(Mm00446968_m1), *Gapdh*(Mm99999915_g1), *Tnfa*(Mm00443258_m1), *Il1b*(Mm00434228_m1), *Tgfb1*(Mm_01178820_m1), *Ccl2*(Mm_00441242_m1) *Hmox1*(Mm_00516005_m1), *Col1a1*(Mm_00801666_g1), *Nqo1*(Mm_01135606_m1), *Nrf1*(Mm01135606_m1), *Faah*(Mm_00515684_m1) 및 *Napepld*(Mm_00724596_m1)(Applied Biosystems, 캘리포니아주 포스터 시티)에 대해 TaqMan 유전자 발현 검정을 사용했다.

[0070] 통계 분석

[0071] Windows용 Graphpad Prism 버전 8.0(GraphPad Software, 캘리포니아주 샌디에고)을 사용하여 데이터를 분석했다. 통계적 유의성은 적절한 경우 다중 비교를 위한 Bonferroni 사후 테스트와 함께 양측 스튜던트 *t*-테스트, 일원 또는 이원 분산 분석(ANOVA)을 사용하여 결정했다. 그룹 간의 차이는 $p < 0.05$ 값에서 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. 결과는 평균 ± SEM으로 표현된다.

[0072] 결과

[0073] 고지방 식이는 간문맥계로의 금식 유도 히스타민 방출을 방해한다

[0074] 금식은 내장 비만 세포를 자극하여 히스타민을 문맥 순환으로 방출한다[10]. 식이 유도 비만이 이 반응에 영향을 미치는지를 결정하기 위해, 본 발명자들은 12주 동안 마우스를 HFD 또는 정규 음식에 노출시켰고(도 4), 특별히 개발된 LC-MS/MS 검정을 사용하여 문맥 혈장의 히스타민 농도를 측정했다(도 1a, b). 이전 결과를 확인한 결과[10], 음식 공급 마우스에서 먹이 부족은 문맥 히스타민 농도의 실질적인 증가를 유발했고, 이는 자유 섭식 마우스보다 금식 상태에서 4배 더 높았고 2시간 재섭식 후 기준선으로 돌아왔다(도 1c). HFD 공급 동물에서는 이러한 증가가 발생하지 않았는데, 이 동물의 자유 섭식 히스타민 수준은 음식 공급 대조군보다 대략 3배 더 높았고, 금식에 대한 반응의 변화는 없었다(도 1c). 본 발명자들은 또한 먹이 부족이 음식 공급 마우스 및 HFD 공급 마우스의 간에서 H_1 및 H_2 히스타민 수용체의 전사에 미치는 영향을 조사했다. 도 1d 및 1e에 예시된 바와 같이, 금식은 음식 공급 대조군에서 H_1 및 H_2 수용체 mRNA 수준을 2배 상승시켰지만, HFD 공급 마우스에서는 어떠한 효과도 없었다. 결과는 HFD에 대한 노출이 마우스 간에서 히스타민 수용체의 금식 유도 발현뿐만 아니라 문맥계로의 금식 유도 히스타민 방출을 병해한다는 것을 시사한다.

[0075] 고지방 식이는 간에서 금식 유도 OEA 생성을 방해한다

[0076] 비만 세포 유도 히스타민은 H1 수용체의 활성화를 통해 간에서 OEA 생합성을 자극한다[10]. 이 반응에 대한 식이 유도 비만의 영향을 평가하기 위해, 본 발명자들은 OEA 정량화를 방해할 수 있는[16, 19] 레지오널 이성질체인 바세노일에탄올아마이드(VEA, 18:1Δ^{11})로부터 OEA(18:1 Δ^{9})의 분리를 허용하는 LC-MS/MS 검정을 사용하여 음식 공급 마우스와 HFD 공급 마우스의 간에서 OEA 함량을 측정했다(도 2a). 이전에 보고된 바와 같이[8,11], 음식 공급 마우스에서 금식은 간 OEA 함량의 유의한 증가를 유발했고, 이는 재섭식 후 기준선으로 돌아왔다(도 2b). HFD 공급 마우스에서는 그러한 반응이 관찰되지 않았다(도 3b). 마찬가지로, 금식은 음식 공급 마우스에서 엔도카나비노이드인 아난다미드의 간 수준을 증가시켰지만 HFD 공급 마우스에서는 그렇지 않았다(도 2b). 제3의 생물활성 지질 아마이드인 PEA의 함량은 먹이 부족에 영향을 받지 않았고 HFD 노출에 의해 약간 감소했다(도 2d). RT-PCR 분석에 따르면, OEA 형성을 촉매하는 NAPE-PLD(마우스에서 *Napepld* 유전자에 의해 암호화됨)의 전사[20]는 HFD에 의해 약간 증가한 반면, OEA 분해를 촉매하는 FAAH(*Faah*)의 전사[20]는 변경되지 않은 채 유지되는 것으로 드러났다(도 2e, f). 종합하면, 연구 결과는 HFD 노출이 마우스 간에서 금식 유도 OEA 생성을 무력하게 한다는 것을 나타낸다.

[0077] 외인성 OEA는 비만 마우스의 간에서 지질 축적을 교정한다.

[0078] 식이 유도 비만은 간 지방증 및 섬유증의 발생과 연관이 있다[21]. 본 발명자들은 내인성 OEA 생산에 결함이 있는 HFD 공급 마우스에서 OEA 보충이 이러한 변경을 교정할 수 있는지 여부를 물었다. 본 발명자들은 마우스를

HFD에 5주 동안 노출시켰고, 무작위로 두 그룹으로 배분하고, HFD 노출 추가 6주 동안 OEA(5 mg/kg, 1일 1회) 또는 비히클로 처리했다. 예상된 바와 같이[2, 12, 22 내지 26], OEA 투여는 체중 증가를 감소시켰고 순환 총 콜레스테롤 및 간 트랜스아미나제 수준을 저하시켰다(표 2, 도 5). 이러한 효과는 간 지질 프로파일의 개선을 동반했다(도 3). 간 절편의 Oil Red O 및 BODIPY 염색은 대조군에 비해 OEA 처리 마우스에서 지질 함량이 감소된 것을 보여주었다(도 3a, b). 이러한 결과와 일관되게, 간 트라이글리세라이드 함량은 대조군 마우스보다 OEA 처리 마우스에서 더 낮았다 (도 3c). 또한 OEA의 보호 작용을 가리키는 것으로 본 발명자들은 C-C 모티프 케모카인 리간드 2(*Ccl2*)[27], 인터루킨 1β(*Il1b*)[28] 및 콜라겐 유형 Ⅰα1(*Col1a1*)[29]을 포함하는 간 염증 및 섬유증에 수반되는 유전자의 전사가 대조군에 비해 OEA 처리 마우스에서 약화되었지만(도 3d 내지 f), 반면 보호 인자인 헴 옥시게나제 1(*Hmox1*)의 전사는 향상되었음을 발견했다(도 3g). 다른 관련 유전자(Nrf1, Tnfa, Tgf1b, Nqo1)의 전사는 영향을 받지 않았다(도 3h 내지 j).

표 2

HFD 공급 마우스의 체중 증가 및 혈액 화학에 대한 비히클(VEH) 또는 OEA 투여의 효과. 약어: AST: 아스파테이트 트랜스아미나제; ALT: 알라닌 트랜스아미나제; SGOT: 혈청 글루탐산 옥살로아세트산 트랜스아미나제; SGPT: 혈청 글루탐산 피루브산 트랜스아미나제. 데이터는 평균 ± S.E.M으로 표현되며 독립표본 양측 스튜던트 *t* 검정을 사용하여 분석했다. * $P < 0.05$.

	비히클(n = 8)	OEA(n = 7)
Δ 체중(g)	4.26 ± 0.59	2.27 ± 0.5*
AST(SGOT)(IU/L)	129.8 ± 11.6	86.1 ± 9.9*
ALT(SPGT)(IU/L)	71.6 ± 7.5	45.4 ± 6.9*
콜레스테롤 (mg/dL)	201.4 ± 5.9	173.6 ± 7.6*
트라이글리세라이드(mg/dL)	89.6 ± 6.1	81.0 ± 4.9
글루코스(mg/dL)	249.7 ± 12.1	250.5 ± 19.1

[0079]

[0080] 논의

[0081] 금식한 마우스에서 내장 비만 세포로부터 문맥계로 분비된 히스타민은 간에서 G_q-커플링된 H_1 수용체를 활성화하여 국소 OEA 생합성을 자극한다[10]. 비만 세포의 제거, H_1 수용체 차단 및 히스타민- 또는 OEA-생성 효소의 결실을 포함하는, 이 과정을 무력하게 하는 유전자적 또는 약리학적 조작은 금식 유도 케톤생성을 대략 50% 감소시킨다. 이러한 발견은 히스타민 의존성 OEA 신호전달이 마우스 간에서 케톤생성에 유의한 기여인자임을 식별시켜 준다[10]. 여기서, 본 발명자들은 식이 유도 비만이 이 주변분비 신호전달 메커니즘을 방해하여 금식이 더 이상 히스타민 방출을 유발하지 않고, 간 OEA 생합성을 촉발할 수 없음을 보고한다. 또한, 본 발명자들은 OEA 투여가 비만 설치류의 간 지방증을 완화한다는 것을 확인시켜 주는 새로운 증거를 제공한다[13, 14, 22 내지 24]. 인간에서도 유사한 결과가 보고되었다[25, 26]. 종합하면, 본 연구 결과는 히스타민 방출 및 간 OEA 동원에서 HFD 유발 결핍이 전 세계 성인의 거의 25%에 영향을 미치는 상태인 비알코올성 지방간 질환(NAFLD)의 발병에 기여할 수 있음을 시사한다[30].

[0082] 본 결과는 마우스에서 비만이 문맥 히스타민의 2가지 주목할 만한 변화를 동반한다는 것을 보여준다(도 1c). 첫째, 자유 섭식 조건 하에서, 음식 공급 동물보다 HFD 공급 동물의 문맥 혈액에서 히스타민 수준이 더 높았다. 둘째, 미주신경 입력에 의해 매개될 수 있는 과정[31, 32]인 금식 유도 히스타민 분비가 HFD 노출 동물에서 억제되었다. 이러한 변화의 기본 메커니즘은 알려져 있지 않지만, HFD에 대한 노출로 인해 장에서 생성된 염증유발 환경이 수반될 가능성이 높다. 림프 누공 래트 모델을 사용한 연구에서는 지방 식사의 장 흡수가 점막 비만 세포의 활성화 및 그에 따른 히스타민 및 프로스타글란딘 D_2의 방출을 동반한다는 것을 입증했다[33-35]. 장 비

만 세포 탈과립화는 또한 식이 유도 비만 마우스에서도 상세히 기록되었다[36]. 따라서, 비만 자유 섭식 마우스의 문맥 혈액 내 상승된 히스타민 방출은 염증이 있는 점막 조직의 비정상적인 비만 세포 활성으로 인해 발생한다는 것은 타당성이 있지만, 아직 결정되지 않았다. 비만 세포 기능의 염증 관련 변경은 또한 세포가 금식에 적절하게 반응하지 못하는 것을 설명할 수도 있다.

[0083] 비만 세포로부터의 히스타민 방출을 억제하는 것 외에도, HFD는 또한 간에서 H_1 및 H_2 수용체의 금식 유도 전사를 둔화시켰고(도 1d, e), 이는 OEA를 생성하는 기관의 능력을 추가로 손상시킬 수 있다. 기니 피그 및 래트의 간세포는 H_1 및 H_2 수용체를 발현하며, 시험관내에서 이들의 활성화는 글리코겐분해, 글루코스신생 및 요소생성을 향상시킨다 [37, 38]. 이러한 데이터와 일관되게, 연구에 따르면 H_1 수용체 길항제로의 장기간 치료 및 H_2 수용체의 유전자 결실이 마우스의 간 지방증을 악화시킨다는 것이 밝혀져 있다[39, 40].

[0084] 이전 연구[13, 14]를 확인시켜 주듯이, 본 발명자들은 OEA를 이용한 아만성 치료가 간 지방증을 완화한다는 것을 발견했다. 인간의 경우 비만은 비알코올성 지방간염(NASH) 및 간경변과 같은 병리로 진행될 수 있는 NAFLD 발병의 주요 위험 인자이다[41]. 비만을 줄이는 개입은 이러한 진행을 늦추지만[42], 현재 NAFLD 또는 NASH에 대해 승인된 약리학적 치료법은 없다[43]. 이전 연구에 따르면, OEA 보충이 지방 분해를 향상시키기 위해 지방 기관 및 간에서 PPAR-α를 활성화하고[12, 44], 아마도 지방산 산화 및 케톤 생성을 향상시키고[12, 44], 국소 염증을 완화시킴[45 내지 47]으로써 NAFLD가 있는 사람의 예후를 개선할 수 있는 것[24, 25]으로 시사되었다. 현재의 결과는 그 제안과 일관되며 간에서 가능한 병원성 메커니즘 및 치료 작용의 표적으로서 히스타민 의존성 OEA 신호전달을 추가로 식별해준다.

[0085] 참고문헌

DiPatrizio NV, Piomelli D. J Clin Invest. 2015;125(3):891-8.

Schwartz GJ, et al. Cell Metab. 2008;8(4):281-8.

Gaetani S, Oveisi F, Piomelli D. Neuropsychopharmacology. 2003;28(7):1311-6.

Proulx K, et al. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005;289(3):R729-37.

Rodriguez de Fonseca F, et al. Nature. 2001;414(6860):209-12.

Fu J, et al. Nature. 2003;425(6953):90-3.

Astarita G, et al. J Pharmacol Exp Ther. 2006;318(2):563-70.

Fu J, et al. J Biol Chem. 2007;282(2):1518-28.

Izzo AA, et al. Obesity (Silver Spring). 2010;18(1):55-62.

Misto A, et al. Cell Metab. 2019;29(1):91-102 e5.

Montagner A, et al. Gut. 2016;65(7):1202-14.

Guzman M, et al. J Biol Chem. 2004;279(27):27849-54.

Fu J, et al. Neuropharmacology. 2005;48(8):1147-53.

Li L, et al. J Pharmacol Sci. 2015;127(3):244-50.

Romano A, et al. Nutrients. 2021;13(2).

Igarashi M, et al. Biochim Biophys Acta. 2015;1851(9):1218-26.

Verburg KM, et al. Agents Actions. 1984;14(5-6):633-6.

Livak KJ, et al. Methods. 2001;25(4):402-8.

[0086]

Rohrig W, et al. Anal Bioanal Chem. 2016;408(22):6141-51.

Piomelli D. Trends Endocrinol Metab. 2013;24(7):332-41.

Wang CY, Liao JK. Methods Mol Biol. 2012;821:421-33.

Giudetti AM, et al. Antioxidants (Basel). 2021;10(8).

Romano A, et al. Nutrients. 2021;13(2).

Hu J, et al. Front Pharmacol. 2020;11:605065.

Tutunchi H, et al. Health Promot Perspect. 2020;10(4):373-82.

Tutunchi H, et al. J Cell Physiol. 2021;236(1):417-26.

Roh YS, et al. Adv Exp Med Biol. 2018;1061:45-53.

An SY, et al. Front Pharmacol. 2021;12:645703.

Ortiz C, et al. Curr Tissue Microenviron Rep. 2021:1-12.

Sayiner M, et al. Clin Liver Dis. 2016;20(2):205-14.

Stead RH, et al. Auton Neurosci. 2006;125(1-2):53-61.

Gottwald TP, et al. Neuroreport. 1995;7(1):313-7.

Zhou A, et al. Front Physiol. 2020;11:4.

Ji Y, et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2012;302(11):G1292-300.

Ji Y, et al. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2011;14(4):315-21.

Gu Y, et al. Int Arch Allergy Immunol. 2021:1-13.

[0087] Garcia-Sainz JA, et al. Mol Pharmacol. 1987;31(3):253-8.

Garcia-Sainz JA, et al. Eur J Pharmacol. 1992;227(3):325-31.

Raveendran VV, et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2014;307(2):G219-28.

Yamada S, et al. Pathol Int. 2016;66(12):661-71.

Sheka AC, et al. JAMA. 2020;323(12):1175-83.

Vilar-Gomez E, et al. Gastroenterology. 2015;149(2):367-78 e5; quiz e14-5.

Thiagarajan P, Aithal GP. J Clin Exp Hepatol. 2019;9(4):515-21.

Suarez J, et al. Dis Model Mech. 2014;7(1):129-41.

Montecucco F, et al. Thromb Haemost. 2015;113(4):838-50.

Payahoo L, et al. Adv Pharm Bull. 2018;8(3):479-87.

Lama A, et al. Biomed Pharmacother. 2020;129:110368.

[0088]

[0089] 실시예 2: AquaCelle®-OEA는 Levagen®-OEA보다 경구 생체이용률이 더 크다

[0090] 본 실시예는 지질의 생체이용률을 증가시키도록 설계된 모든 제형이 상호교환적으로 사용될 수는 없음을 입증한다. 이 실시예에서 볼 수 있듯이 AquaCelle®-OEA는 제형화되지 않은('순수') OEA 또는 상이한 OEA 제형(Levagen®-OEA)보다 유의하게 더 큰 경구 생체이용률을 갖는다.

[0091] 재료 및 방법

[0092] 화학물질

[0093] 인증된 올레오일에탄올아마이드(OEA) 및 이의 중수소 함유 유사체 [2H4]-OEA는 Cayman Chemicals(미시간주 앤아버)에서 구입했다. 3가지 OEA 제형이 테스트되었다: (1) 제형화되지 않은 OEA('순수-OEA'); (2) Levogen-Plus® 기술로 제형화된 OEA('Levogen-OEA'); (3) AquaCelle® 기술로 제형화된 OEA('AquaCelle-OEA'). 모든 제형은 실험 직전에 멸균 식염수/Tween-80(95%/5%, vol/vol)에 현탁되었고 총 부피 10mL/kg으로 위관 영양법으로 투여했다. 에탄올아민 및 Oil Red O는 Sigma Aldrich(미주리주 세인트루이스)에서 구입했고, DAPI(4',6-다이

아미디노-2-페닐인돌)가 포함된 BODIPY 및 ProLongTM Gold 퇴색 방지 마운턴트는 Thermo Fisher Scientific(매사추세츠주 월섬)에서 구입했다. 다른 모든 시약 및 분석 용매는 사용 가능한 최고 등급이었다.

[0094] 동물

[0095] 수컷 C57Bl/6J 마우스(13주령)는 Charles River(매사추세츠주 윌밍턴)에서 구입했다. 이들은 통풍이 잘되는 케이지에서 그룹별로 수용했고(케이지당 4 내지 5마리), 달리 명시되지 않는 한, 음식(표준 음식, 6.5% kcal 지방, Envigo 2020X, 캘리포니아주 리버모어)과 물에 자유롭게 접근하게 했다. 이들은 제어된 온도(22 ± 1℃)와 상대습도(55 ± 10%)에서 12시간 명암 주기(오전 6시 30분에 조명 켜짐)로 유지되었고 실험 전 1주 동안 조종되었다. 주거, 동물 유지 관리 및 모든 다른 절차는 실험실 동물의 관리 및 사용에 대한 국립 보건원 지침에 따라 수행되었고 어바인에 소재하는 캘리포니아 대학교 기관 동물 관리 및 사용 위원회의 승인을 받았다.

[0096] 조직 수집

[0097] 혈액은 심장 천자에 의해 에틸렌디아민 델타-테트라-아세트산(EDTA)-세정된 주사기 내로 수집하고 스프레이 코팅된 칼륨-EDTA(K2-EDTA)가 들어 있는 1mL 폴리프로필렌 튜브로 옮겼다. 혈장은 1450×g, 4oC에서 15분간 원심분리하여 제조한 후 폴리프로필렌 튜브로 옮겨 즉시 냉동하여 -80oC에 저장했다. 동물은 목을 베어 안락사시켰고, 간을 신속하게 수거했으며, 각 간의 우엽을 다른 엽과 분리하여 드라이아이스에 냉동시킨 후 분석할 때까지 -80oC에 저장했다.

[0098] OEA 제형의 약동학

[0099] 본 발명자들은 18주령 마우스에 순수-OEA, Levagen-OEA 또는 AquaCelle-OEA를 위관 영양법으로 30 mg/kg의 용량으로 투여했다. 본 발명자들은 투여 후 다양한 시점(분 단위 = 0, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360; n = 시점마다 9 내지 11마리의 마우스)에서 아이소플루란으로 동물을 마취하고 위에서 설명한 대로 혈액과 간을 처리했다.

[0100] 혈액 화학

[0101] Antech Diagnostics(캘리포니아주 어바인)에서 포괄적인 혈액 화학 패널을 수행했다.

[0102] 조직학적 분석

[0103] Oil Red O 염색: 본 발명자들은 간 샘플(우엽)을 주형에 끼워넣고 저온 유지 장치를 사용하여 이를 7μm 두께 절편으로 자르고 절편을 4% 파라포름알데하이드(PFA)로 15분 동안 고정시켰다. 고정 후, 본 발명자들은 절편을 인산염 완충 식염수(PBS)에 2분 동안 침지시키고 아이소프로판올(60%)에 2분 동안 둔 다음, Oil Red O(아이소프로판올 중 60%)와 함께 30분 동안 인큐베이션했다. 마지막으로, 본 발명자들은 절편을 60% 아이소프로판올, 40% 물에 담그고 50% 글리세롤을 사용하여 유리 슬라이드에 올려놓았다. 이미지는 20× 배율로 촬영했다[Lin et al, 2022].

[0104] BODIPY 염색: 간 절편(두께 7μm)은 PBS에 5분간 침지시키고 4% PFA로 15분간 고정시킨 후, PBS로 세척했다. 각 샘플을 소수성 펜으로 동그라미를 그리고 BODIPY(1/1000 희석, vol/vol)로 30분 동안 염색했다. 샘플을 PBS에 담그고 DAPI(CAT: P36931)가 포함된 퇴색방지 마운턴트를 사용하여 올려놓았다. 이미지는 20× 배율로 포착했다[Lin et al, 2022].

[0105] 지질 추출

[0106] 냉동 간 샘플(~30 내지 40mg)을 2mL Precellys® 연조직 바이알 내로 옮기고 내부 표준물질([2H4]-OEA, 100nM)을 함유하는 빙냉 아세톤(1mL)으로 희석했다. 샘플은 Bertin 균질화기를 사용하여 4℃에서 15초/주기로 2주기 동안 1분 동안 균질화했고, 주기 사이에는 20초의 휴지 시간을 가졌다. 균질액을 4℃에서 490×g로 15분 동안 원심분리하고 상청액을 8mL 유리 바이알에 옮기고 N2 하에 건조시켰다. 각 샘플을 클로로포름/메탄올/물(2mL/1mL/1mL, vol/vol)로 희석하고 와류시킨 후 4℃에서 15분 동안 490×g로 원심분리했다. 유기 상을 수집하고 N2 하에 건조시켰다. 펠릿을 아세토나이트릴(100μL)에 재구성하고 비활성화된 유리 인서트로 옮기고 액체 크로마토그래피 질량 분광측정(LC/MS-MS) 분석을 위해 호박색 유리 바이알 내에 두었다.

[0107] OEA 정량화

[0108] 크로마토그래피 분리는 JetStream 전자분무 이온화(ESI) 인터페이스에 의해 6460C 삼중 사중극자 질량 분광측정 검출기에 커플링된 바이너리 펌프, 탈기 장치, 온도 제어식 오토샘플러 및 칼럼 구획으로 구성된 1260 시리즈

LC 시스템(Agilent Technologies, 캘리포니아주 산타 클라라)을 사용하여 수행했다. 단계 구배 분리는 Poroshell 120 칼럼(1.9μm, 2.1×100mm, Agilent Technologies, 델라웨어주 윌밍턴)에서 용매 A로서 물 중의 0.1% 포름산과 용매 B로서 아세토나이트릴 중의 0.1% 포름산으로 이루어진 이동상을 사용하여 수행했다. 선형 구배가 사용되었다: 0.0 내지 9.5분 80% B; 9.51 내지 11.0분 95% B; 55% B에서 11.1 내지 15.50분 동안 유지. 칼럼 온도는 40℃, 오토샘플러 온도는 9℃로 유지되었다. 주입량은 2μl, 유속은 0.3mL/min, 총 분석 시간은 15.5분이었다. 물/메탄올/아이소프로판올/아세토나이트릴(1:1:1:1, vol) 중 10% 아세톤으로 이루어진 세척 용액을 사용하여 각 주입 전에 오토샘플러 포트에서 20초 동안 주입 바늘을 세척했다. 질량 분석기는 양성 전기분무 이온화 모드로 작동되었고, 다음 MRM 전이(m/z)를 모니터링했다: OEA, 326.3 > 62.0; [2H4]-OEA, 330.3 > 66.0. OEA 조각화 및 충돌 시, 전압은 각각 148 및 14로 설정했고, [2H4]-OEA의 경우, 이들은 각각 143 및 14이었다. 모세관 및 노즐 전압은 각각 3500 V 및 500 V였다. 건조 가스 온도는 10 L/min의 유량으로 300℃였다. 차단 가스 온도는 10 L/hr의 유량으로 300℃였다. 분무기 압력은 40 psi로 설정했다. 정량화의 하한은 0.6 ng/mL(3.7 fmol/주입 2.0μL)였다. 본 발명자들은 장비 제어, 데이터 획득 및 분석을 위해 MassHunter 소프트웨어(Agilent Technologies, 캘리포니아주 산타 클라라)를 사용했다.

[0109] 통계 분석

[0110] Windows용 Graphpad Prism 버전 8.0(GraphPad Software, 캘리포니아주 샌디에고)을 사용하여 데이터를 분석했다. 통계적 유의성은 적절한 경우 다중 비교를 위한 Bonferroni 사후 테스트와 함께 양측 스튜던트 t 검정, 일원 또는 이원 분산 분석(ANOVA)을 사용하여 결정했다. 그룹 간의 차이는 $p < 0.05$ 값에서 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. 결과는 평균 ± SEM으로 표현된다.

[0111] 결과

[0112] AquaCelle®-OEA의 약동학적 프로파일

[0113] 본 발명자들은 수컷 C57B16 마우스(그룹당 n = X)에서 단일 경구(위관 영양법) 투여(유리 OEA kg당 30mg에 상당함) 후 3가지 다른 OEA 제제 - 제형화되지 않은('순수') OEA, Levogen®-OEA 및 AquaCelle®-OEA의 약동학적 특성을 비교했다. 혈장 OEA 프로파일은 순수 OEA 및 Levogen®-OEA를 제공한 동물에서 유사했다(도 7A; 삽입도는 곡선 아래 면적, AUC를 보여줌). 본 발명자들은 간 OEA 함량의 작은 차이를 관찰했고, 이는 제형화되지 않은 화합물을 제공한 마우스와 비교하여 Levogen®-OEA를 투여한 마우스에서 60분 시점($P < 0.05$)에서 유의하게 더 높았다(도 7B). 그럼에도 불구하고, AUC 값은 두 그룹에서 유사했다(도 7B). 대조적으로 순수 OEA와 AquaCelle®-OEA 사이에는 유의한 차이가 주목되었고, 후자는 혈장(도 7C)과 간(도 7D) 모두에서 유의하게 더 큰 OEA 수준을 생성했다. 실제로, OEA에 대한 전체 간 노출(AUC)은 제형화되지 않은 화합물로 처리한 마우스보다 AquaCelle®-OEA로 처리한 마우스에서 대략 3배 더 높았다(도 7D). 결과는 AquaCelle® 제형화 기술이 경구 투여된 OEA를 간에 효과적으로 운반한다는 것을 나타낸다.

[0114] 실시예 3: 올레오일에탄올아마이드의 경구 생체 이용 가능한 제형을 이용한 간 지방증의 치료

[0115] 내인성 지질 유래 매개인자인 OEA의 전신 투여는 식이 유도 비만 래트(PMID: 15910890) 또는 지방산 결합 단백질인 L-FABP가 결여된 돌연변이 마우스(PMID: 22327204)에서 지질 지방증을 예방한다. OEA의 지방분해 특성은 식이 유도 비만 마우스 모델을 사용하여 실시예 1에 기술된 연구에서 확인되었다. 이러한 연구 결과를 치료적으로 적용하는 데 주된 장애물은 OEA의 극히 불량한 생체이용률이며, 이는 경구 약물로서 이의 사용을 거의 불가능하게 한다. Gencor Pacific(https://www.gencorpacific.com) 회사는 친지성 분자의 생체이용률을 최적화하도록 특별히 설계된 자가 유화 전달 시스템을 개발했다. 이 기술(AquaCelle®)은 미셀 형성을 최적화하고 오일-물 계면의 표면적을 증가시켜 증가된 생체이용률을 달성한다. 이는 소화액에서 자발적으로 에멀젼을 형성하여 장 상피를 통한 수송을 돕는 지질, 계면활성제, 보조계면활성제 및 공용매로 이루어진다.

[0116] 실시예 2와 함께 본 실시예는 AquaCelle®-OEA 제형(11%의 OEA 및 89%의 AquaCelle®로 이루어짐)이 OEA의 전체 경구 생체이용률을 증가시키고, 그렇게 함으로써 그의 치료 효과를 향상시킨다는 것을 입증한다. 결과는 AquaCelle®-OEA의 반복된 경구 투여가 식이 유도 비만 마우스 모델에서 간 지질 축적을 유의하게 약화시킨다는 것을 보여준다. 연구 결과는 AquaCelle®-OEA가 인간 비알코올성 간 지방증 치료에 임상적 적용성이 있음을 시사한다.

[0117] 식이 유도 비만

[0118] 본 발명자들은 마우스(18주령)를 고지방 식이(HFD, 60% kcal 지방, D12492, Research Diets, 뉴저지주 뉴 브런스윅)에 3주 동안 노출시켰다. 본 발명자들은 동물을 두 그룹으로 무작위로 배분하고 고지방 식이의 노출을 계

속하면서 5주 동안 매일 2회 AquaCelle OEA(90 mg/kg) 또는 이의 부형제(OEA가 없는 AquaCelle)를 위관 영양법으로 투여했다. 개체의 체중 증가 및 케이지 먹이 섭취량은 주당 3회 기록했다.

[0119] 마우스 간에서 지질 축적에 대한 AquaCelle®-OEA의 효과

[0120] 연구 프로토콜의 개략적인 개요는 도 8A에 제시된다. 수컷 C57B16 마우스를 3주 동안 고지방 식이(HFD, 지방으로부터 60% kcal)에 노출시킨 후 대략 동일한 체중을 갖는 두 그룹(그룹당 n = 9)으로 무작위로 배분했다(도 8B). HFD 노출을 계속하면서 동물에게 AquaCelle®-OEA(1kg당 90mg의 유리 OEA에 상당함) 또는 AquaCelle® 단독(비히클)을 추가로 5주 동안 경구 위관 영양법으로 매일 2회 제공했다. 그런 다음, 마우스를 안락사시키고 이들의 간 및 심장 혈액을 분석을 위해 수집했다.

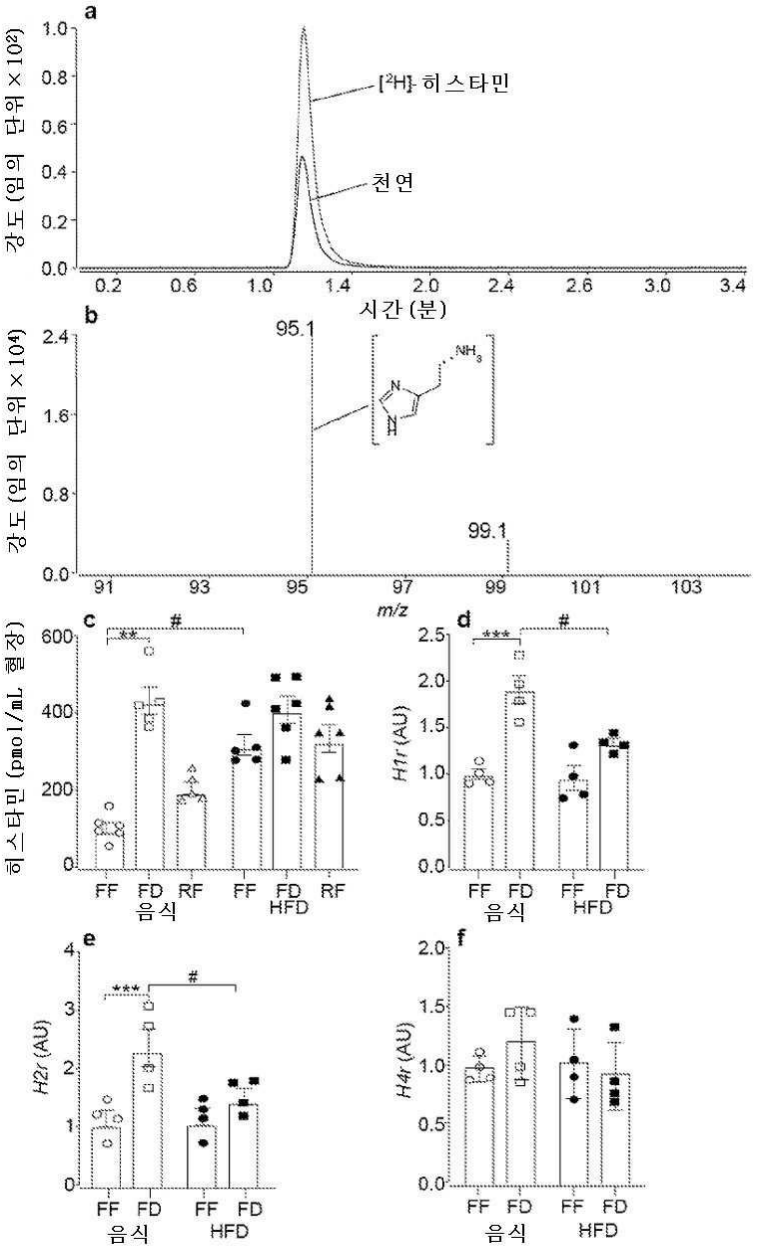
[0121] AquaCelle®-OEA의 투여는 체중 증가에 효과가 전혀 없었고, 이는 두 그룹에서 유사했다(도 8C). 그럼에도 불구하고, 평균 간 중량은 AquaCelle® 단독 처리된 마우스보다 AquaCelle®-OEA로 처리된 마우스에서 유의하게 더 낮았다($P < 0.05$; $n = 8=9$)(도 9B). 더욱이, 기관의 외부 표면은 후자 그룹에서 더 흰 외관을 보였다(도 9A, 왼쪽). 두 관찰은 모두 AquaCelle®-OEA의 항지방증 효과와 일관되므로, 본 발명자들은 집중 형광 친지성 형광단인 BODIPY®를 사용하여 간 실질 절편에서 지질 축적을 측정했다. 결과는 AquaCelle®-OEA 투여가 AquaCelle® 단독에 비해 간 절편에서 BODIPY® 형광을 유의하게($P < 0.05$; $n = 4$) 감소시켰음을 보여준다(도 9A, 중간; 도 9c). 도 9d에 예시된 빈도 분포 분석은 AquaCelle®-OEA로의 처리가 지질 액적의 평균 크기 및 이들의 수를 모두 감소시켰음을 추가로 보여준다. 친지성 염료인 red Oil O로의 염색은 이러한 결과를 확인시켜 준다(도 9C, 오른쪽). 종합적으로, 연구 결과는 AquaCelle®-OEA의 아만성 경구 투여가 체중 궤적의 변경 없이 식이 유도 비만 마우스의 간에 지질 축적을 방지한다는 것을 나타낸다. 간 지방증의 개선과 일관되게 AquaCelle®-OEA 치료는 트라이글리세라이드($P < 0.01$; $n = 7$)(도 10A) 및 간 효소인 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(AST) 및 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT)(도 10B, C)의 순환 농도를 저하시켰다. 본 발명자들은 순환성 총 콜레스테롤, 글루코스, 알부민, 글로불린, 아밀라제 및 크레아틴 포스포키나제(CPK)에 대한 통계적으로 검출 가능한 효과를 발견하지 못했다(도 10D 내지 I).

[0122] 본 출원 전반에 걸쳐 다양한 간행물이 참조된다. 본 발명이 속하는 기술분야의 상태를 보다 완전하게 설명하기 위해 이들 간행물의 개시내용 전체가 본 출원에 참조에 의해 원용된다.

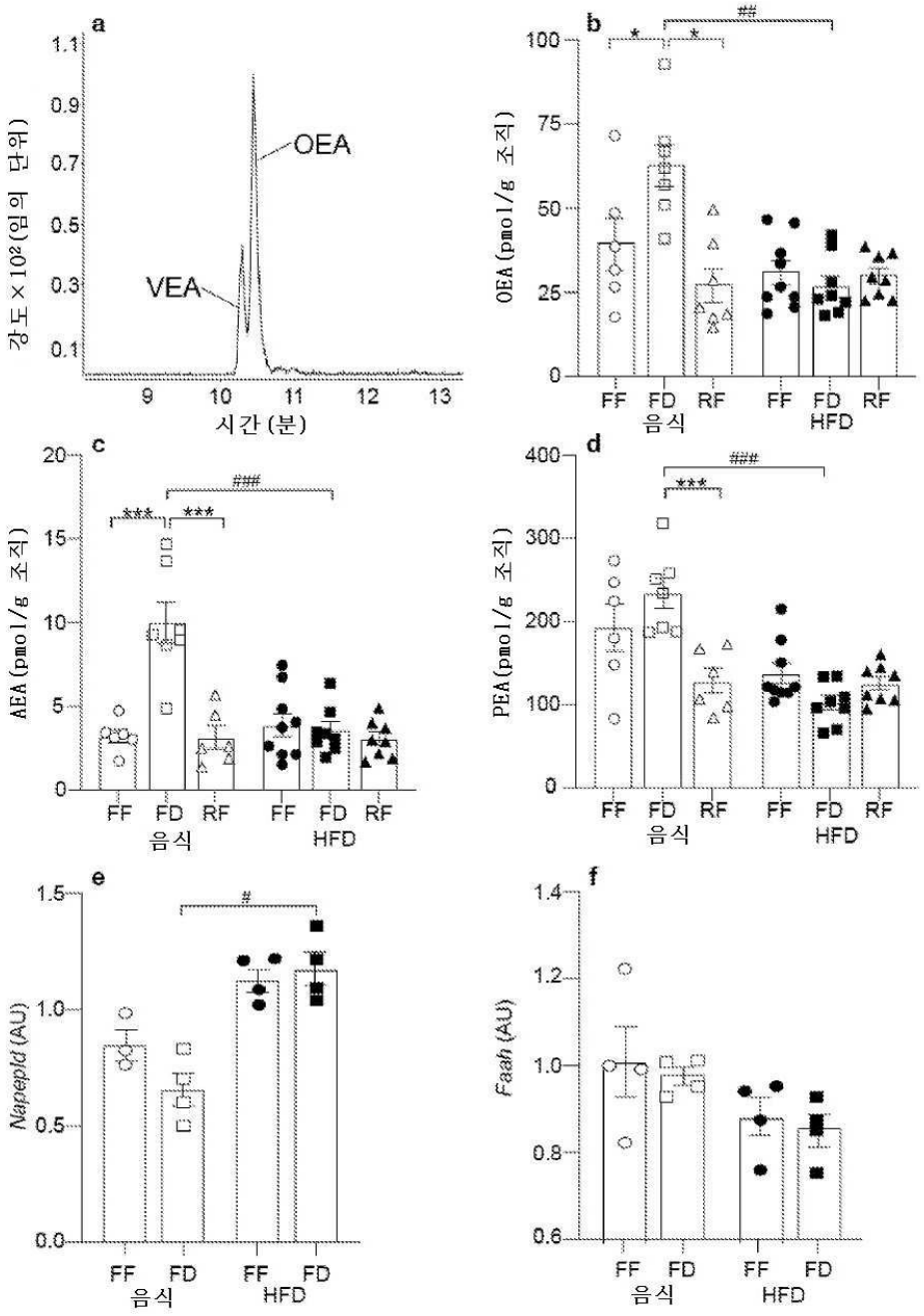
[0123] 관련 기술분야의 기술자는 전술한 설명에 개시된 개념 및 구체적인 실시형태가 본 발명의 동일한 목적을 수행하기 위한 다른 실시형태를 수정하거나 설계하기 위한 기초로서 용이하게 활용될 수 있음을 이해할 것이다. 관련 기술분야의 기술자는 또한 그러한 등가의 실시형태가 첨부된 청구범위에 제시된 본 발명의 사상 및 영역을 벗어나지 않는다는 것을 이해할 것이다.

도면

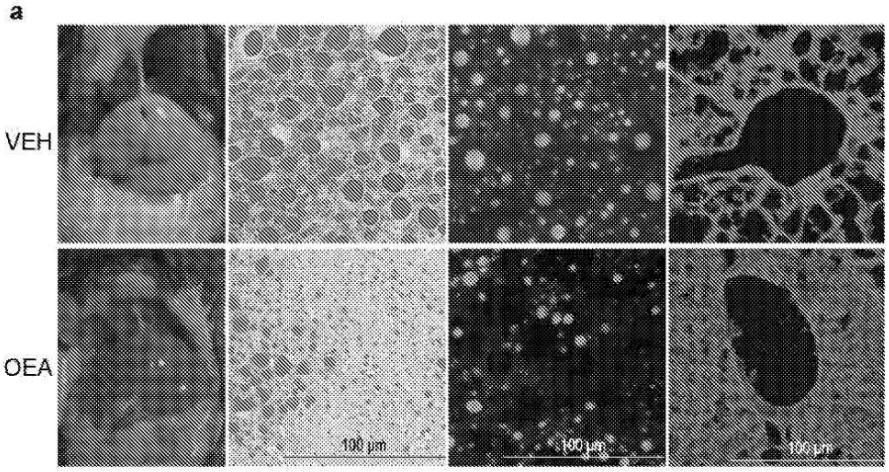
도면1


a
강도 (임의 단위 ×10²)
[²H]- 히스타민
천연
시간 (분)
b
강도 (임의 단위 ×10⁴)
95.1
99.1
m/z
c
히스타민 (pmol/mL 혈장)
음식
HFD
d
H1r (AU)
e
H2r (AU)
f
H4r (AU)

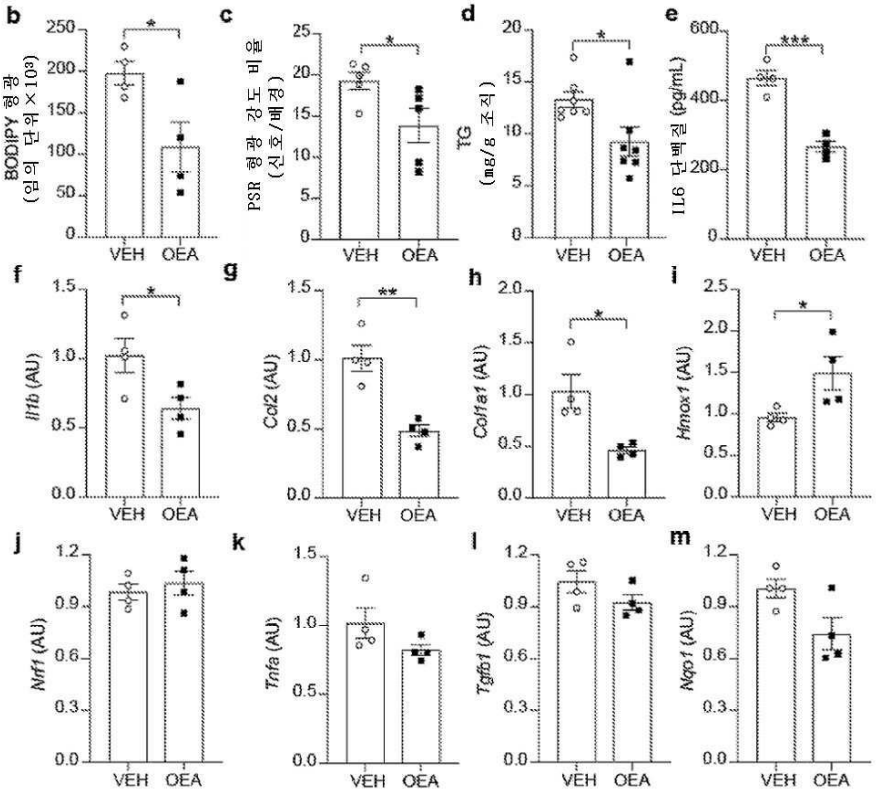
도면2


a
강도 × 10² (임의 단위)
OEA
VEA
시간 (분)
b
OEA (pmol/g 조직)
음식
HFD
c
AEA (pmol/g 조직)
d
PEA (pmol/g 조직)
e
Napepld (AU)
f
Faah (AU)
FF
FD
RF

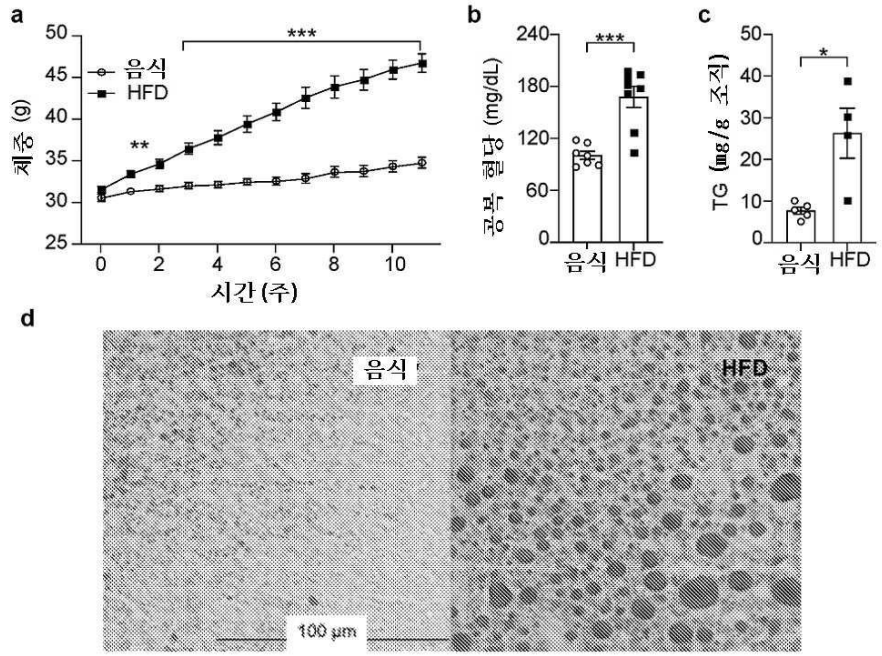
도면3a


a
VEH
OEA
100 μm
100 μm
100 μm

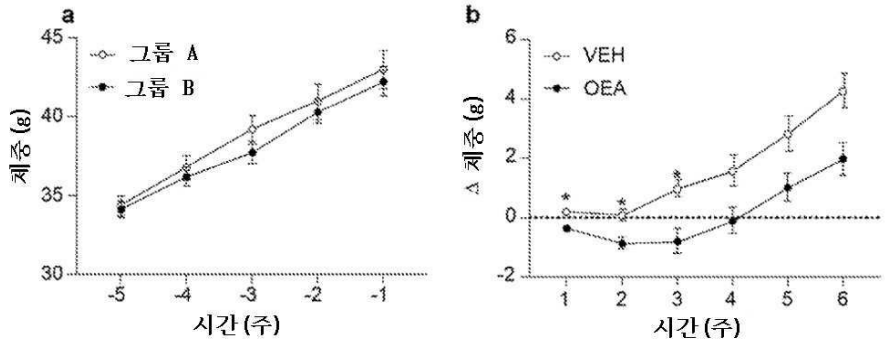
도면3bm


b
BODIPY 형광 (임의 단위 ×10³)
c
PSR 형광 강도 비율 (신호/배경)
d
TG (mg/g 조직)
e
IL6 단백질 (pg/mL)
f
Il1b (AU)
g
Ccl2 (AU)
h
Col1a1 (AU)
i
Hmox1 (AU)
j
Nrf1 (AU)
k
Tnfa (AU)
l
Tgfb1 (AU)
m
Nqo1 (AU)
VEH
OEA

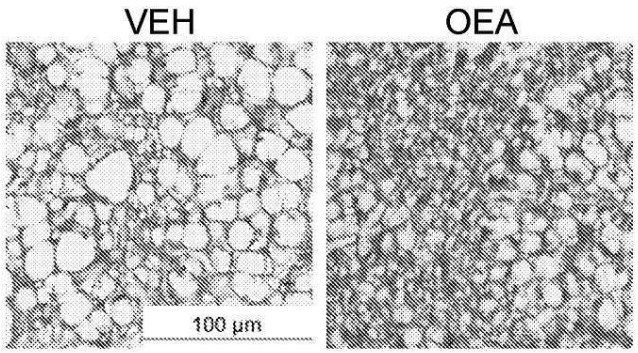
도면4


a
체중 (g)
음식
HFD
시간 (주)
b
공복 혈당 (mg/dL)
음식 HFD
c
TG (mg/g 조직)
음식 HFD
d
음식
HFD
100 μm

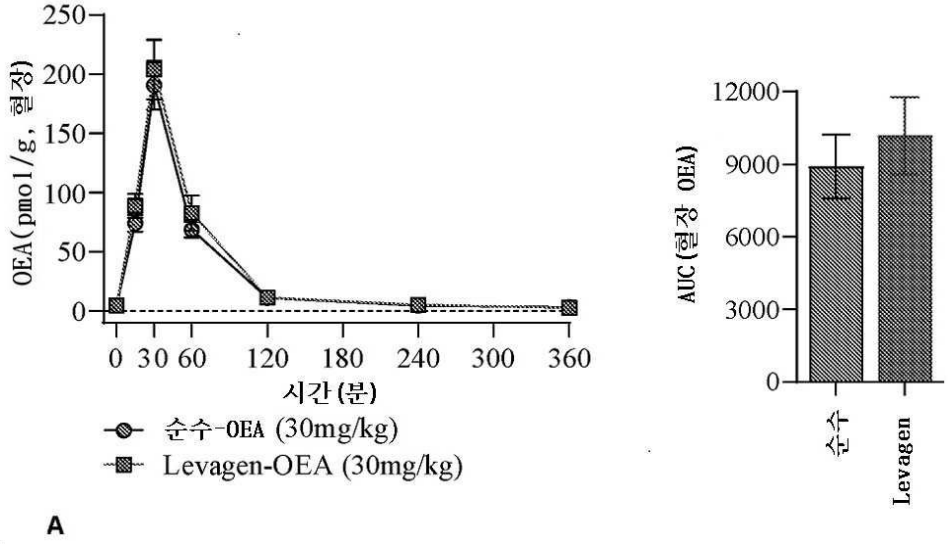
도면5


a
그룹 A
그룹 B
체중 (g)
시간 (주)
b
VEH
OEA
Δ 체중 (g)
시간 (주)

도면6

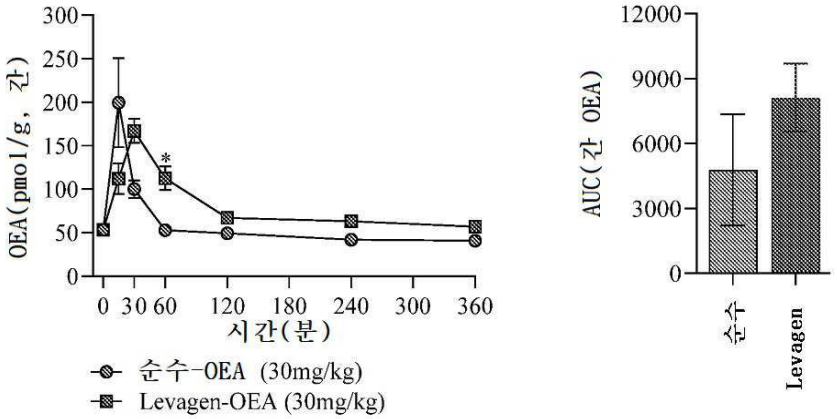

VEH
OEA
100 μm

도면7a



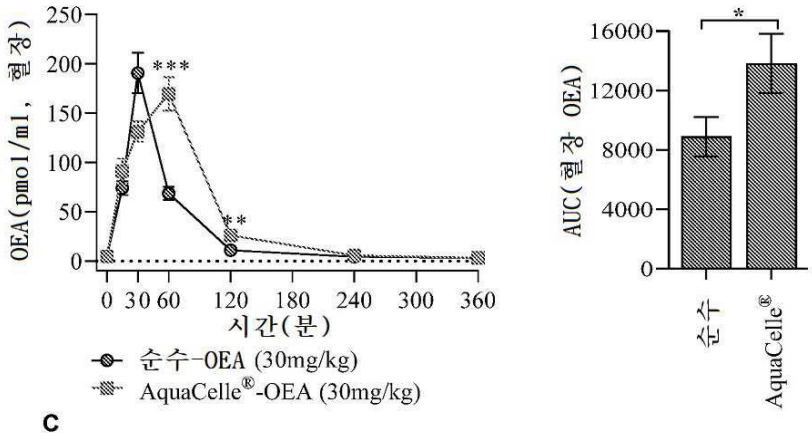
A

도면7b



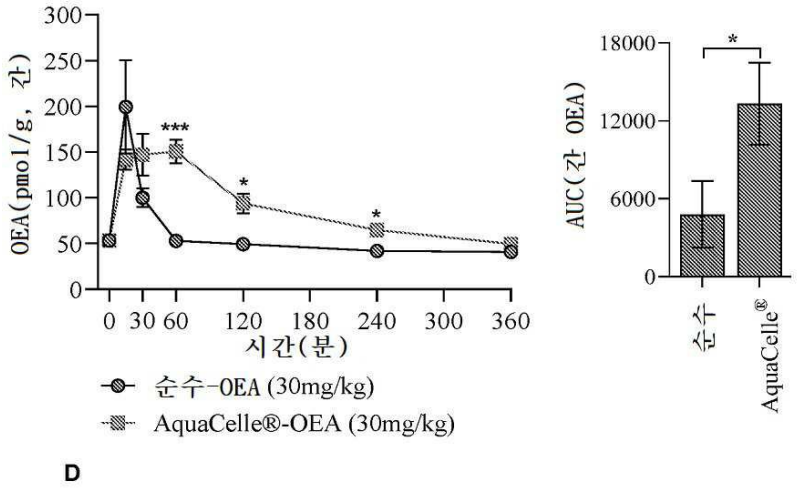
B

도면7c



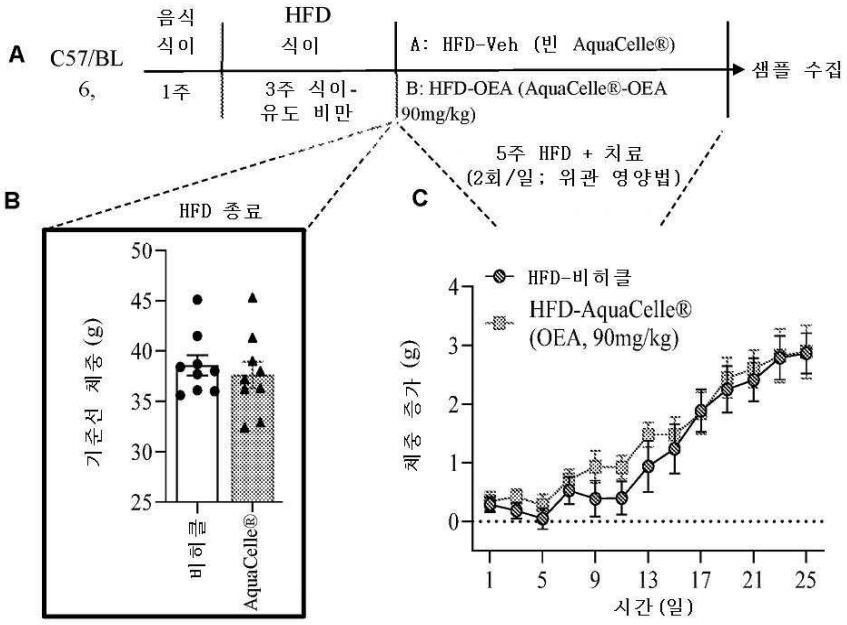
C

도면7d

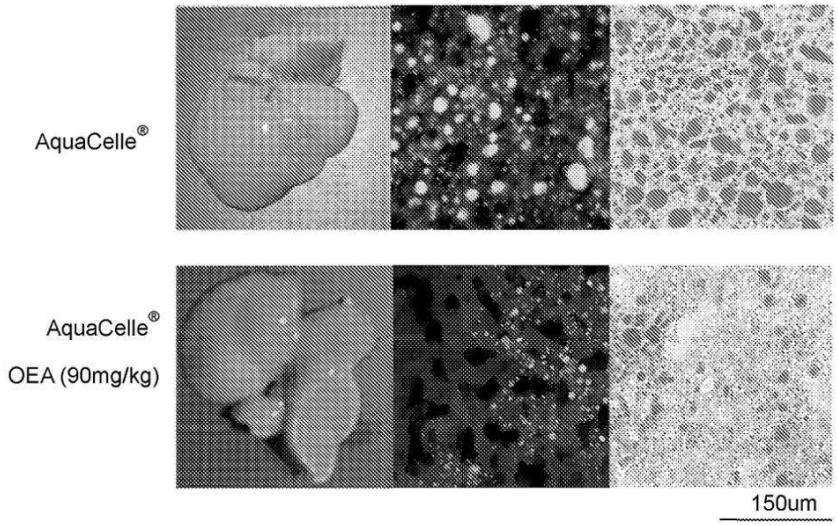

OEA(pmol/g, 간)
300
250
200
150
100
50
0
***
*
*
0 30 60 120 180 240 300 360
시간(분)
순수-OEA (30mg/kg)
AquaCelle®-OEA (30mg/kg)
AUC(간 OEA)
18000
12000
6000
0
*
순수
AquaCelle®

D

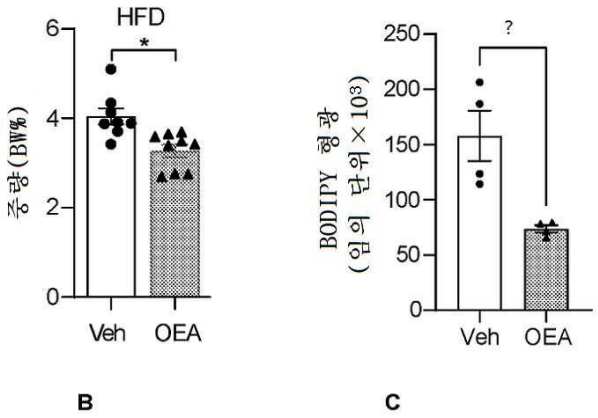
도면8


A
C57/BL
6,
음식
식이
1주
HFD
식이
3주 식이-
유도 비만
A: HFD-Veh (빈 AquaCelle®)
B: HFD-OEA (AquaCelle®-OEA
90mg/kg)
샘플 수집
5주 HFD + 치료
(2회/일; 위관 영양법)
B
HFD 종료
기준선 체중 (g)
50
45
40
35
30
25
비히클
AquaCelle®
C
HFD-비히클
HFD-AquaCelle®
(OEA, 90mg/kg)
체중 증가 (g)
4
3
2
1
0
1 5 9 13 17 21 25
시간 (일)

도면9ac



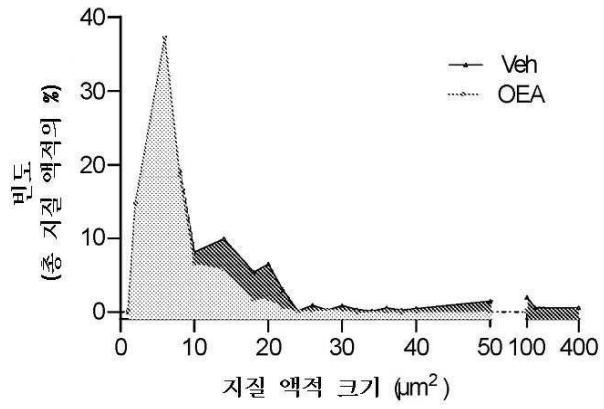
A



B

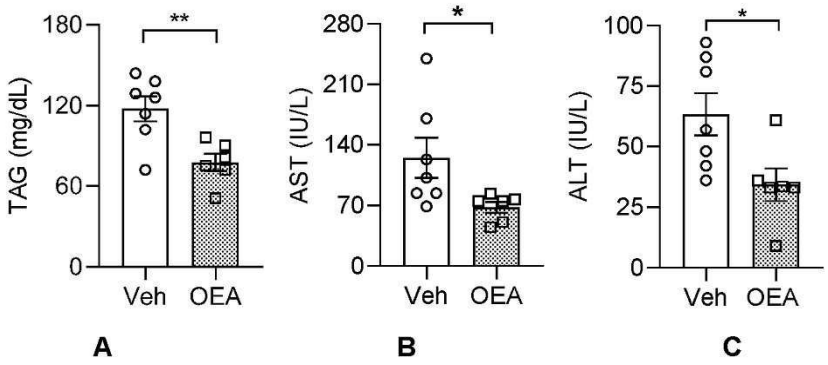
C

도면9d



D

도면10ac



도면10di

