



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년12월07일

(11) 등록번호 10-2186932

(24) 등록일자 2020년11월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/20 (2006.01) A23D 7/01 (2006.01)
A23D 9/013 (2006.01) A23K 20/158 (2016.01)
A23K 50/30 (2016.01) A23L 29/00 (2016.01)
A23L 33/115 (2016.01) A61J 15/00 (2006.01)
A61K 31/202 (2006.01) A61K 38/46 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/20 (2013.01)
A23D 7/011 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7002723(분할)

(22) 출원일자(국제) 2013년02월14일

심사청구일자 2020년01월29일

(85) 번역문제출일자 2020년01월29일

(65) 공개번호 10-2020-0015801

(43) 공개일자 2020년02월12일

(62) 원출원 특허 10-2014-7025505

원출원일자(국제) 2013년02월14일

심사청구일자 2018년02월12일

(86) 국제출원번호 PCT/US2013/026063

(87) 국제공개번호 WO 2013/123139

국제공개일자 2013년08월22일

(30) 우선권주장

61/600,207 2012년02월17일 미국(US)

61/719,173 2012년10월26일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2011092299 A1

US20110150944 A1

(73) 특허권자

알크레스타, 인크.

미국 02462 매사추세츠주 뉴턴 스위트 202 원 뉴턴 이그제큐티브 파크

(72) 발명자

마콜린, 알렉시, 엘.

미국 02459 매사추세츠주 뉴턴 발페이트 힐 로드 177

갈로토, 로버트

미국 02462 매사추세츠주 뉴턴 스위트 100 원 뉴턴 이그제큐티브 파크

셰노이, 바미

미국 01560 매사추세츠주 사우쓰 그래프턴 프래트 스트리트 11

(74) 대리인

양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 45 항

심사관 : 박수진

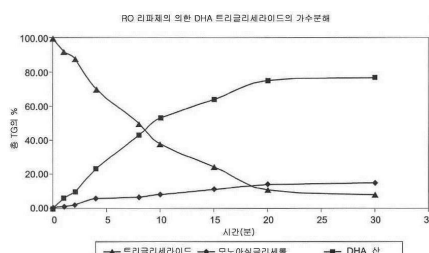
(54) 발명의 명칭 식이 지방산 수요를 공급하기 위한 방법들, 조성물들 및 디바이스들

(57) 요약

영양학적 제제를 제조하고/하거나 투여하기 위한 방법들 및 디바이스들과 함께 장쇄 다중불포화 지방산(LC-PUFA)을 포함하는 영양학적 제제들이 제공된다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제 중의 임의의 백분율의 LC-PUFA는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 첨가된 리파제

(뒷면에 계속)

대표도



를 포함하지 않는다. 또한, 영양제를 피험체에게 제공하는 방법들, 지방 흡수를 개선하는 방법들, 인지 능력을 개선하는 방법들, 만성 폐 질환을 예방하는 방법들 및 환자가 비경구 영양제를 요하는 총 시간을 감소시키는 방법들이 제공된다.

(52) CPC특허분류

A23D 7/013 (2013.01)

A23D 9/013 (2013.01)

A23K 20/158 (2016.05)

A23K 50/30 (2016.05)

A61J 15/0003 (2013.01)

A61J 15/0092 (2013.01)

A61K 31/202 (2013.01)

A61K 38/465 (2013.01)

A61K 9/0029 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

영양학적 조성물을 공급받기 위한 내부를 규정하는 용기;

용기의 내부와 유체 연통하는 구조; 및

영양학적 조성물이 용기 내에 공급되었을 때 영양학적 조성물이 리파제에 노출되도록, 구조에 부동화된 리파제를 포함하며,

상기 리파제는 영양학적 조성물 내의 장쇄 다중불포화 지방산(LC-PUFA) 트리글리세라이드를 가수분해하도록 구성되며,

상기 리파제는, 영양학적 조성물이 용기를 빠져나갈 때 리파제는 용기에 남아있도록 용기 내에 부동화되는 것인 디바이스.

청구항 2

제1항에 있어서, 영양학적 조성물이 용기로 들어가는 것을 가능하게 하는 제1 개구를 용기에 추가로 포함하는 디바이스.

청구항 3

제2항에 있어서, 용기는, 영양학적 조성물이 용기를 빠져나가는 것을 가능하게 하는 제2 개구를 용기에 추가로 포함하는 것인 디바이스.

청구항 4

제3항에 있어서, 제1 개구 및 제2 개구 중 1종 이상이 공급관에 대한 연결을 위해 구성된 것인 디바이스.

청구항 5

제4항에 있어서, 용기에 부착된 공급관을 추가로 포함하는 디바이스.

청구항 6

제1항에 있어서, 디바이스가 공급 기전(mechanism)인 디바이스.

청구항 7

제1항에 있어서, 디바이스가 병(bottle)인 디바이스.

청구항 8

제1항에 있어서, 구조가 용기 내에 입자를 포함하는 것인 디바이스.

청구항 9

제8항에 있어서, 입자가 불 또는 비드를 포함하는 것인 디바이스.

청구항 10

제1항에 있어서, 구조가 용기의 내면을 포함하는 것인 디바이스.

청구항 11

제1항에 있어서, 구조가 용기의 벽을 포함하고, 1종 이상의 리파제가 용기의 벽 상에 부동화되거나 용기의 벽 내에 포함되는 것인 디바이스.

청구항 12

제1항에 있어서, 리파제가 흡착, 이온 결합, 공유 결합, 가교 결합, 캡슐화 또는 포획 중 하나 이상에 의해 부동화된 것인 디바이스.

청구항 13

제1항에 있어서, 구조가 용기 내에 돌출부를 포함하는 것인 디바이스.

청구항 14

제1항에 있어서, 리파제가, 지방산에 투과성이지만 리파제에는 불투과성인 재료 내에 캡슐화된 것인 디바이스.

청구항 15

제1항에 있어서, 밸브를 추가로 포함하는 디바이스.

청구항 16

제1항에 있어서, 리파제가 크로모박테리움 비스코숨(*Chromobacterium viscosum*) 리파제, 슈도모나스 플루오레스센스(*Pseudomonas fluorescens*) 리파제 및 리조푸스 오리자에(*Rhizopus oryzae*) 리파제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 디바이스.

청구항 17

제16항에 있어서, 리파제가 영양학적 조성물을 갖는 디바이스를 빠져나가는 것을 막는 스크린 또는 필터로서 작용하는 재료를 추가로 포함하는 것인 디바이스.

청구항 18

제1항에 있어서, 흐름 경로 내에 함유된 리파제에 대한 영양학적 조성물의 노출을 연장시키기 위해 구성된 구불 구불한 흐름 경로를 추가로 포함하는 디바이스.

청구항 19

제1항에 있어서, 용기가, 영양학적 조성물에 투과성이지만 리파제에는 불투과성인 벽을 갖는 것인 디바이스.

청구항 20

원단부, 근단부, 및 하나 이상의 벽에 의해 적어도 부분적으로 규정되는 내부 영역을 갖고, 영양학적 조성물을 공급받기 위해 구성된 용기; 및

영양학적 조성물이 용기 내에 공급되었을 때 영양학적 조성물이 리파제에 노출되도록, 구조에 부동화된 리파제를 포함하고,

상기 리파제는 영양학적 조성물 내의 장쇄 다중불포화 지방산(LC-PUFA) 트리글리세라이드를 가수분해하도록 구성되며,

리파제에 대한 영양학적 조성물의 노출 동안, 리파제의 부동화는 영양학적 조성물 내로 공급되는 리파제의 양을, 리파제에 노출되는 LC-PUFA 1 mg당 리파제 0.1 mg 이하로 제한하는 것인 디바이스.

청구항 21

제20항에 있어서, 구조가 입자를 포함하는 것인 디바이스.

청구항 22

제21항에 있어서, 입자가 볼 또는 비드를 포함하는 것인 디바이스.

청구항 23

제20항에 있어서, 리파제가 흡착, 이온 결합, 공유 결합, 가교 결합, 캡슐화 또는 포획 중 하나 이상에 의해 부

동화된 것인 디바이스.

청구항 24

시험체에 의한 섭취 전에 모노글리세라이드 및 유리 지방산 형태의 LC-PUFA를 포함하는 영양학적 제제를 제조하는 방법이며, LC-PUFA 트리글리세라이드, LC-PUFA 에스터, 또는 둘 다를 포함하는 액체 영양학적 조성물을 부동화된 리파제에 노출시켜 LC-PUFA 트리글리세라이드, LC-PUFA 에스터, 또는 둘 다를 가수분해하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 리파제가 크로모박테리움 비스코숨 리파제, 슈도모나스 플루오레센스 리파제, 또는 리조푸스 오리자에 리파제로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인 방법.

청구항 26

제24항에 있어서, 리파제의 부동화는 영양학적 조성물이 리파제에 노출될 때 영양학적 조성물 내로 들어가는 리파제의 양을 제한하는 것인 방법.

청구항 27

제24항에 있어서, 액체 영양학적 조성물을 노출시키는 단계가 액체 영양학적 조성물을 고체 지지체에 부동화된 리파제를 포함하는 용기를 통해 통과시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 28

제24항에 있어서, 액체 영양학적 조성물을 노출시키는 단계가 액체 영양학적 조성물을 용기를 통해 통과시키는 것을 포함하며, 리파제가 상기 용기 내에 포함된 복수개의 입자에 부동화된 것인 방법.

청구항 29

제24항에 있어서, 액체 영양학적 조성물을 노출시키는 단계가, 액체 영양학적 조성물을 부동화된 리파제가 고체 지지체에 결합된 장내 공급 디바이스를 통해 통과시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 30

추후 공급관을 통해 시험체에 투여되는 것인 제24항의 방법에 의해 제조된 영양학적 제제.

청구항 31

제30항에 있어서, 시험체가 단장 증후군 또는 낭포성 섬유증 중 하나 이상을 진단받은 유아(infant)인 것인 영양학적 제제.

청구항 32

제24항에 있어서, 액체 영양학적 조성물이 리파제에 노출된 후, 영양학적 제제가 모노글리세라이드보다 더 많은 유리 지방산을 포함하는 것인 방법.

청구항 33

제24항에 있어서, 액체 영양학적 조성물은 시험체의 섭취 전 적어도 1분 동안 리파제에 노출되는 것인 방법.

청구항 34

제24항에 있어서, 액체 영양학적 조성물은 시험체의 섭취 전 적어도 30초 동안 리파제에 노출되는 것인 방법.

청구항 35

제24항에 있어서, 액체 영양학적 조성물은 시험체의 섭취 전 1분 이하 동안 리파제에 노출되는 것인 방법.

청구항 36

제24항에 있어서, 액체 영양학적 조성물은 피험체의 섭취 전 5분 이하 동안 리파제에 노출되는 것인 방법.

청구항 37

제24항에 있어서, 액체 영양학적 조성물은 피험체의 섭취 전 60분 이하 동안 리파제에 노출되는 것인 방법.

청구항 38

제24항에 있어서, LC-PUFA는 DHA, ARA 및 EPA로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 것인 방법.

청구항 39

제24항의 방법에 의해 제조된 유리 지방산 및 모노글리세라이드 형태의 LC-PUFA를 포함하는 영양학적 제제.

청구항 40

제39항에 있어서, LC-PUFA는 DHA, ARA, 및 EPA로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 LC-PUFA를 포함하는 것인 영양학적 제제.

청구항 41

제39항에 있어서, 영양학적 제제가 LC-PUFA 1 mg 당 0.1 mg 이하의 리파제를 포함하는 것인 영양학적 제제.

청구항 42

제39항에 있어서, 영양학적 제제는 첨가된 리파제를 포함하지 않는 것인 영양학적 제제.

청구항 43

제39항에 있어서, 영양학적 제제는 모노글리세라이드보다 유리 지방산을 더 포함하는 것인 영양학적 제제.

청구항 44

제39항에 있어서, 장내 제제인 영양학적 제제.

청구항 45

단장 증후군 또는 낭포성 섬유증 중 하나 이상을 가진 피험체에 영양을 제공하는데 사용하기 위한 제39항의 영양학적 제제를 포함하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은 35 U.S.C. § 119 하에 2012년 2월 17일자에 출원된 미국 가출원 제61/600,207호 및 2012년 10월 26일자에 출원된 가출원 제61/719,173호에 대한 우선권을 주장한다.

[0002] 장쇄 지방산은 인간 건강 및 발육에 중요하다. 식이에서 소모되는 장쇄 지방산은 주로 트리글리세라이드(TG) 형태이고, 여기서 3개의 장쇄 지방산이 에스터 결합을 통해 글라이세롤 분자에 결합한다. 장쇄 트리글리세라이드의 흡수는 우선 가수분해를 통해 트리글리세라이드를 분해시키고, 이를 모노글리세라이드 및 추가로 유리 지방산으로 분해하는 리파제들(예를 들면 췌장 리파제)의 효소 작용을 요한다. 이용 가능한 경우, 이들 모노글리세라이드 및 유리 지방산은 소장에서 내피 세포들에 의해 흡수되고, 여기서 이는 재에스터화를 겪은 후, 다양한 생리학적 목적을 위해 간 및 결국에는 신체의 조직들로 수송된다. D. Kasper 등, *Harrison's Principles of Internal Medicine* 16th Ed. (2004). 중간 사슬 트리글리세라이드는 장관 관강에 걸쳐 흡수될 수 있고, 장쇄 트리글리세라이드는 그럴 수 없어서, 췌장 리파제는 적절한 장쇄 지방산 가수분해 및 흡수에 필수적이다. C. Jensen 등, *Am. J. Clin. Nutr.* 43:745-751 (1986). 그러나, 손상된 췌장 배출, 흡수불량 또는 췌장 부전증을 앓는 환자와 같은 몇몇 사람은 장쇄 트리글리세라이드를 적절히 분해할 수 없고, 그 결과, 건강을 유지하는데 부적절한 지방산의 흡수로 고생할 수 있다.

- [0003] 상업적으로 구입 가능한 리파제 보충물은 장쇄 트리글리세라이드의 가수분해를 향상시키기 위해 식이에 첨가될 수 있다. 그러나, 다수의 이유로, 리파제 보충물은 장쇄 트리글리세라이드를 분해하는 능력 감소로 고생하거나 그렇지 않으면 기본 지방산을 투여받는 것을 필요로 하는 모든 사람에서 빈약한 지방산 흡수의 문제점을 반드시 해결하는 것은 아니다. 예를 들면, 대부분의 상업적인 리파제 보충물은 pH 7 미만에서 안정성이 상당히 감소하는 것으로 알려진 동물 췌장 리파제로부터 제조된다. 예를 들면, US2010/0239559; 문헌[D. Kasper 등, *Harrison's Principles of Internal Medicine* 16th Ed. (2004)]을 참조한다. 이러한 리파제가 위를 통과할 때까지는, 상당량이 불활성되었을 가능성이 있다. 추가로, 모든 리파제들이 제공된 장쇄 지방산의 가수분해에 동일한 정도로 작용하는 것은 아닌 데, 이는 리파제 특이성이 중요한 고려사항이라는 것을 나타낸다. R. Jensen 등, *Lipids* 18(3):239-252 (1983). 그리고, 췌장 부전증을 앓는 몇몇 집단들에서, 영양학적 제제는 예컨대 조산아들 또는 집중 관리 시설에 있는 환자들에서 엄격히 조절된다. 이러한 제어된 집단들의 경우, 이미 승인된 제제들에 추가의 성분을 보충하는 것이 바람직하거나 실행 가능하지 않을 수 있다. 더구나, 많은 지방산 보충 제제들이 중쇄 트리글리세라이드를 포함할 수 있지만, 장쇄 지방산의 식이 섭취에 대한 명확한 의학적 이익이 존재한다. 따라서, 장쇄 트리글리세라이드의 가수분해를 증대시키는 개선된 방법들에 대한 수요가 존재한다.
- [0004] 장쇄 다중불포화 트리글리세라이드(TG-LCPUFA)의 적절한 가수분해는 몇몇 이유들로 특히 중요하다. 장쇄 다중불포화 지방산(LC-PUFA)은 신경 및 망막 발육에 중요하다. 더구나, 몇몇은 "필수 지방산"인 것으로 생각되고, 이는 인간들이 이를 합성할 수 없고 식이 공급원들로부터 이를 얻어야 한다는 것을 의미한다. n-3 LC-PUFA 도코사헥사엔산(DHA) 및 에이코사펜타엔산(EPA)에 대한 주요 식이 공급원은 필수 지방산인 알파-리놀렌산(ALA)인 이들의 전구체이다. 그러나, 내생 효소는 ALA를 DHA 및 EPA로 전환하는 데 매우 비효율적이다. 국제 지방산 및 지질학 협회(International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids: ISSFAL)의 공식 성명에 따르면, ALA의 DHA로의 전환은 유아들에서는 약 1%이고 성인들에서는 상당히 더 낮다. Brenna 등, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 80(2-3):85-91 (2009). 따라서, DHA 및 EPA가 특히 필수 지방산은 아니지만, DHA 및 EPA의 식이 공급원은 중요하다. n-6 LC-PUFA 아라키돈산(ARA 또는 AA)에 대한 주요 식이 공급원은 필수 지방산인 리놀렌산(LA)이다.
- [0005] 본 발명의 실시양태는 (i) 특정한 장쇄 트리글리세라이드 및 에스터들, 예컨대 장쇄 다중불포화 트리글리세라이드 및 에스터들 등을 가수분해하는 것 다른 것들보다 놀랍게도 더 효과적인 리파제를 제공하는 것, (ii) LC-PUFA 트리글리세라이드, LC-PUFA 지방산 에스터들 및/또는 다른 장쇄 트리글리세라이드 또는 장쇄 지방산 에스터들의 예비 가수분해된 성분들(즉, 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산)을 포함하는 영양학적 제제, 예컨대 의학 영양학적 제제 또는 유아용 제제 등을 제공하는 것, (iii) LC-PUFA 트리글리세라이드, LC-PUFA 지방산 에스터들 및/또는 다른 장쇄 트리글리세라이드 또는 장쇄 지방산 에스터를 포함하는 제제가 리파제에 일시적으로 노출되는 방법을 포함하여, 이러한 영양학적 제제를 제조하는 방법을 제공하는 것 및 (iv) 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산, 예를 들면, LC-PUFA 트리글리세라이드 및/또는 LC-PUFA 지방산 에스터를 포함하는 영양학적 제제를 제공하도록 설계된 디바이스를 제공하는 것에 의해 이들 다양한 문제점을 해결한다. 제제가 리파제에 일시적으로 노출되고 리파제가 섭취 전에 제제로부터 제거되거나 분리되는 실시양태들에서, 본 발명은 외인성 리파제의 섭취를 필요로 하지 않고 LC-PUFA 트리글리세라이드, LC-PUFA 지방산 에스터들 및/또는 다른 장쇄 트리글리세라이드 또는 장쇄 지방산 에스터들의 분해를 보장하는 이점을 제공한다.
- [0006] 따라서, 본 발명의 몇몇 실시양태는 영양학적 제제를 제공한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 LC-PUFA를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 전체 LC-PUFA의 2% 초과는 모노글리세라이드 및 유리 지방산 형태이고, 즉 전체 LC-PUFA의 98% 미만은 트리글리세라이드 또는 에스터 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, LC-PUFA 모노글리세라이드 및 유리 지방산은 영양학적 제제 중에 2.5% 초과, 3% 초과, 4% 초과, 5% 초과, 6% 초과, 7% 초과, 8% 초과, 10% 초과, 12% 초과, 15% 초과, 20% 초과, 25% 초과, 30% 초과, 40% 초과, 50% 초과 또는 75% 초과 전체 LC-PUFA를 포함한다. 특정한 실시양태들에서, LC-PUFA 모노글리세라이드 및 유리 지방산 대 트리글리세라이드 및 에스터들의 비율은 적어도 0.08:1, 적어도 0.09:1, 적어도 0.1:1, 적어도 0.25:1, 적어도 0.5:1, 적어도 1:1, 적어도 2:1, 적어도 3:1, 적어도 4:1, 적어도 5:1, 적어도 8:1, 적어도 10:1, 또는 적어도 20:1이다.
- [0007] 특정한 실시양태들에서, 영양학적 제제는 조숙아들에 대한 투여를 위해 제제화된다. 본 발명에 의해 고려되는 다른 영양학적 제제는 LC-PUFA 트리글리세라이드, LC-PUFA 지방산 에스터들 및/또는 다른 장쇄 트리글리세라이드 또는 장쇄 지방산 에스터를 가수분해하는 능력이러한 감소하거나, 단순히 추가의 기본 식이 LC-PUFA 및/또는 다른 장쇄 지방산을 필요로 하는 유아들, 토들러들, 아이들, 또는 성인을 위해 제제화된다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 영양학적 제제는 1세 미만인 피험체를 위한 것이다. 몇몇 실시양태들에서, 피험체는 1세 내지 4

세이다. 몇몇 실시양태들에서, 피험체는 1세 내지 6세이다.

- [0008] 특정한 실시양태들에서, 본 발명의 영양학적 제제는 의학 영양학적 제제, 즉 의학 관리 하에 소모되거나 경구로 또는 장내로 투여되도록 제제화된 제제, 예컨대 처방 중인 병원들 또는 약국을 통해 유통되는 제제이다. 통상적으로, 의학 영양학적 제제는 독특한 영양학적 필요요건이 존재하는, 특정한 의학 질환, 질병 또는 비정상 병증의 식이 관리를 위해 제제화된다. 의학 영양학적 제제는 "일반적으로 안정하다고 볼 수 있는(Generally Recognized As Safe)" 상태이어야 하고, 라벨링, 제품 클레임 및 제조에 속하는 FDA 규제를 준수해야 한다.
- [0009] 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 첨가된 리파제를 포함하지 않는다. 다른 실시양태들에서, 영양학적 제제는 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 크로모박테리움 비스코숨(*Chromobacterium viscosum*), 슈도모나스 플루오레스센스(*Pseudomonas fluorescens*), 부르콜데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*), 및 리조푸스 오리자(*Rhizopus oryzae*) 리파제들로부터 선택된다.
- [0010] 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 EPA, DHA, ARA, LA 및/또는 ALA를 포함한다.
- [0011] 유리 다중불포화 지방산이 안정하지 않고 신속히 분해되므로, 본 발명은 또한 피험체에 의한 섭취 직전에 본 발명의 영양학적 제제를 제조하기 위한 편리하고 효과적인 방법을 제공한다. 특정한 실시양태들에서, 상기 방법은 추가의 식이 LC-PUFA 및/또는 다른 장쇄 지방산을 필요로 하는 사람에 의한 섭취 전에 LC-PUFA 트리글리세라이드, LC-PUFA 지방산 에스터들 및/또는 장쇄 지방산의 다른 장쇄 트리글리세라이드 및/또는 에스터를 포함하는 액체 영양학적 조성물을 리파제에 노출시키는 단계를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 섭취 전에 적어도 1분, 적어도 2분, 적어도 3분, 적어도 5분, 적어도 8분, 적어도 10분, 적어도 15분, 적어도 30분, 적어도 45분, 또는 적어도 60분 동안 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 섭취 전에 1분 이하, 2분 이하, 3분 이하, 5분 이하, 8분 이하, 10분 이하, 15분 이하, 30분 이하, 45분 이하 또는 60분 이하 동안 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 24시간 이하 동안 리파제에 노출된다. 특정한 실시양태들에서, 리파제는 크로모박테리움 비스코숨, 슈도모나스 플루오레스센스, 부르콜데리아 세파시아, 및 리조푸스 오리자 리파제들로부터 선택된다. 특정한 실시양태들에서, 리파제는 섭취 전에 영양학적 제제로부터 제거될 수 있다. 다른 실시양태들에서, LC-PUFA 트리글리세라이드, LC-PUFA 지방산 에스터들 및/또는 다른 장쇄 트리글리세라이드 및/또는 에스터를 포함하는 액체 영양학적 조성물은 섭취 전에 고체 지지체에 부동화된 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 공유 결합, 이온 결합, 또는 가교결합에 의해 고체 지지체에 부동화된다. 특정한 실시양태들에서, 부동화 리파제는 투과성 막 내에 캡슐화되거나 이에 부착된다.
- [0012] 본 발명의 다른 양태는 본 발명의 제제를 투여함으로써 식이 LC-PUFA 및/또는 다른 장쇄 지방산을 필요로 하는 피험체, 예컨대 장관에서 장쇄 트리글리세라이드 또는 장쇄 지방산 에스터를 분해하는 능력 감소를 겪는 사람, 췌장 부전증을 겪는 사람, 영양불량을 겪는 사람 및 전체 비경구 영양제를 투여받는 사람에게 영양제를 제공하는 방법이다. 몇몇 실시양태들에서, 피험체는 조숙아이다. 다른 실시양태들에서, 피험체는 만삭아 또는 토들러이다. 특정한 실시양태들에서, 피험체는 50세 초과, 60세 초과 또는 70세 초과이다. 몇몇 실시양태들에서, 피험체는 췌장 부전증을 앓는다. 다른 실시양태들에서, 제제를 공급관을 통해 투여한다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 영양학적 제제를 임의의 연령의 사람에서 인지 능력을 개선하기 위해, 조산아에서 만성 폐 질환을 방지하기 위해, 조산아의 신경학적 발육을 증대시키기 위해, 또는 장쇄 지방산, 예컨대 EPA, DHA, ARA, LA, 및 ALA 등의 섭취 증가로부터의 개선과 관련된 여러 다른 병증을 치료하거나 방지하기 위해 투여한다. 이러한 병증은 알츠하이머병, 양극성 질환, 우울증, 패혈증, 급성 호흡 스트레스, 상처 치유, 암, 심혈관 질환, 뇌졸중, 파킨슨병, 정신분열증, 당뇨병, 다발성 경화증, 영양불량, 손상된 GI 작용 및 만성 염증성 질환들, 예컨대 류마티스성 관절염, 전신성 홍반성 낭창, 및 염증성 장 질환을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0013] 본 발명의 다른 실시양태는 본 발명의 영양학적 제제를 투여함으로써 환자가 전체 비경구 영양제를 필요로 하는 시간을 감소시키는 방법을 제공한다. 그 결과, 이러한 환자는 장관 위축 및 연장된(24시간 초과) 전체 비경구 영양제와 관련된 다른 합병증들의 감소된 위험에 노출된다. 이러한 방법은 수술, 화학요법 또는 방사선요법 전에 또는 후에 손상된 GI 작용, 예컨대 흡수불량, 단장 증상, IBD, 췌장 부전증, 영양불량 등 또는 영양불량, 암, 상처 및 욕창의 다른 원인을 갖는 환자들의 회복 시간을 단축하도록 이용될 수 있다. 이러한 환자는 비위관을 통해 본 발명의 영양학적 제제를 투여받을 수 있다. 이 공급 방법은 환자가 변경된 장 이동도, 전신 염증성 반응 증상으로 인해 손상된 췌장 효소 분비, 또는 LC-PUFA 트리글리세라이드, LC-PUFA 지방산 에스터들 및/또는 장쇄 지방산의 다른 장쇄 트리글리세라이드 또는 에스터들의 손상된 개열 및 흡수를 발생시키는 다른 병증을 앓는 상황에서 유리할 수 있다. 위를 우회하는 것이 유리한 대안적인 실시양태에서, 본 발명의 영양학적 제제를

비공장관에 의해 투여할 수 있다. 본 발명의 제제를 전달하기 위해 다른 유형의 공급 장치를 또한 사용할 수 있다.

[0014] 건강한 피험체는 또한 예를 들면 심혈관 질환의 위험을 감소시킴으로써 LC-PUFA의 흡수 증가로부터 이익을 얻을 수 있다. 따라서, 몇몇 실시양태들에서, 본 발명은 본 발명의 영양학적 제제를 피험체에게 공급하는 단계를 포함하는 건강한 피험체에서 지방 흡수를 개선하는 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명은 본 발명의 영양학적 제제를 제조하기 위한 디바이스를 추가로 제공한다. 몇몇 실시양태들에서, 디바이스는 적어도 1종의 리파제를 포함하는 챔버를 포함하고, 챔버는 액체 영양학적 조성물을 보유할 수 있어서 이것은 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 용기에서의 리파제는 용기의 내면에 부동화된다. 다른 실시양태들에서, 리파제는 챔버 내의 지지체에 부동화된다. 몇몇 실시양태들에서, 디바이스는 투과성 막으로 이루어진 챔버 및 챔버 내의 부동화 리파제를 포함하여서, 액체 영양학적 조성물은 투과성 막을 통해 흐르고 리파제와 접촉할 수 있지만, 리파제는 투과성 막을 통해 통과할 수 없다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 디바이스의 챔버 내에 포함된 리파제는 미생물 리파제이다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 박테리아 리파제들로부터 선택된다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 크로모박테리움 비스코숨 리파제, 슈도모나스 플루오레센스 리파제, 부르콜데리아 세파시아 리파제 및 리조푸스 오리자에 리파제로부터 선택된다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 크로모박테리움 비스코숨 리파제, 슈도모나스 플루오레센스 리파제 및 리조푸스 오리자에 리파제로부터 선택된다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 리조푸스 오리자에 리파제이다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 특정한 실시양태들에 따라 유아에 대해 영양제를 제공하는 디바이스 및 방법을 예시한 것이다.

도 2a는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 2b는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 2c는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 3a는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 3b는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 3c는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 4a는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 4b는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 5a는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 5b는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 6a는 중합체 비드에 부동화된 리조푸스 오리자에 리파제의 바이알의 사진이다.

도 6b는 특정한 실시양태들에 따라 영양학적 제제를 처리하고 투여하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 6c는 특정한 실시양태들에 따라 영양학적 제제를 처리하고 투여하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 6d는 도 6c에 도시된 디바이스의 확대를 예시한다.

도 7은 리조푸스 오리자에(R0) 리파제에 의한 DHA 트리글리세라이드의 가수분해를 도시한다.

도 8은 리조푸스 오리자에 리파제에 의한 ARA 트리글리세라이드의 가수분해를 도시한다.

도 9a는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 9b는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 9c는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 10a는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 10b는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 10c는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 11a는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 11b는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 11c는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 12는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 13a는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 13b는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 14는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 15는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 16은 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 17a는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 17b는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스의 부분 절개도를 예시한다.

도 18은 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스를 예시한다.

도 19는 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스의 부분 절개도를 예시한다.

도 20은 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스의 부분 절개도를 예시한다.

도 21은 특정한 실시양태들에 따라 제제를 처리하기 위한 디바이스의 부분 절개도를 예시한다.

도 22a는 조절 주(돼지들이 TG-LCPUFA 강화 유아용 제제를 공급받는 동안의 "조절 주") 대 치료 주(돼지들이 비가수분해("CONT")되거나, 크로모박테리움 비스코숨 리파제("CV")로 예비 가수분해되거나 리조푸스 오리자에 리파제("RO")로 예비 가수분해된 동일한 강화 제제를 공급받는 동안의 "치료 주") 동안의 EPI 돼지들에서의 대변 중량을 나타낸다. 도 22b는 돼지들의 동일한 3개의 그룹들에서의 치료주의 마지막 3일 동안에 걸친 전체 대변 지방 함량을 나타내고, 도 22c는 지방 흡수 계수(CFA(%))를 나타낸다.

도 23은 비가수분해된 제제("CONT"), CV 리파제로 예비 가수분해된 제제("CV") 또는 RO 리파제로 예비 가수분해된 제제("RO")가 공급된 EPI 돼지들의 대변에서의 ARA(A), EPA(B), 및 DHA(C)의 수치를 나타낸다. 별표는 $p < 0.001$ 을 나타낸다.

도 24는 비가수분해된 제제("CONT"), CV 리파제로 예비 가수분해된 제제("CV") 또는 RO 리파제로 예비 가수분해된 제제("RO")를 공급한 7일 후 EPI 돼지들의 혈장에서의 ARA(A) 및 DHA(B)의 수치를 나타낸다. 별표는 $p < 0.05$ 를 나타낸다.

도 25는 비가수분해된 제제("CONT"), CV 리파제로 예비 가수분해된 제제("CV") 또는 RO 리파제로 예비 가수분해된 제제("RO")를 공급한 7일 후 EPI 돼지들의 망막(A) 및 지방 조직(B)에서의 ARA 및 DHA의 수치를 나타낸다. 별표는 $p < 0.05$ 를 나타낸다.

도 26은 비가수분해된 제제("CONT"), CV 리파제로 예비 가수분해된 제제("CV") 또는 RO 리파제로 예비 가수분해된 제제("RO")를 공급한 7일 후 EPI 돼지들의 심장(A) 및 신장 조직(B)에서의 ARA 및 DHA의 수치를 나타낸다. 별표는 $p < 0.05$ 를 나타낸다.

도 27은 100mg(A), 500mg(B), 1000mg(C), 또는 2000mg(D)의 부동화 RO 리파제에 의한 엔팔락(Enfalac) 제제에서의 DHA 및 ARA의 가수분해(%)를 나타낸다.

도 28은 RO 리파제 또는 판크레아틴에 의한 DHA(A) 및 ARA(B)의 가수분해(%)를 나타낸다.

도 29는 실시예 10에 기재된 6주간의 돼지 연구에 대한 연구 설계를 도시한다.

도 30은 TG-LCPUFA 강화 유아용 제제를 공급받은 건강한 돼지들("건강한"), TG-LCPUFA 강화 유아용 제제를 공급받은 수술로 유도된 외분비 췌장 부전증을 갖는 돼지들("EPI"), 및 부동화 RO 리파제에 의해 예비 가수분해된 TG-LCPUFA 강화 유아용 제제를 공급받은 수술로 유도된 외분비 췌장 부전증을 갖는 돼지들("EPI+iRO")로부터 수

집한 적혈구들에서의 ARA 및 DHA의 수치를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 장쇄 다중불포화 지방산
- [0018] 장쇄 다중불포화 지방산(LC-PUFA)은 2개 이상의 이중 결합을 포함하는 탄화수소 사슬들이다. 메틸 말단에 대한 제1 이중 결합의 위치에 따라, LC-PUFA는 오메가-3($n-3$) 또는 오메가-6($n-6$) 지방산으로 분류될 수 있다. ALA 및 LA는 각각 $n-3$ 및 $n-6$ PUFA 패밀리들의 모 지방산이다. 이는 "필수 지방산"으로 생각되고, 이는 인간들이 이를 합성할 수 없고, 오히려 식이를 통해 이를 얻어야 한다는 것을 의미한다. 이는 포유동물들이 9개와 10개의 탄소를 넘는 지방산에서의 이중 결합을 도입하는 능력이 부족하기 때문이다. Blosover 등 *Cell Biology: A Short Course*, John Wiley & Sons, Inc. at 39 (2011). 그러나, 인간은 ALA 및 LA로 시작하여 추가의 장쇄 PUFA를 만들 수 있다.
- [0019] ALA 및 LA 둘 다는 일련의 탈포화 및 신장 단계를 통해 다른 장쇄 PUFA를 생성하도록 대사된다. 예를 들면, ALA는 EPA 및 궁극적으로 DHA로 대사된다. LA는 $n-6$ 지방산인 ARA로 대사된다. 그러나, DHA 및 EPA로의 ALA의 전환 및 ARA로의 LA의 전환은 비교적 비효율적이다. L. Arterburn 등, *Am. J. Clin. Nutr.* 83(suppl):1467S-1476S (2006). 연구는 인간들에서 DHA로의 ALA의 전환이 5% 미만이라고 추정하였다. B. Anderson and D. Ma, *Lipids Health Dis.* 8:33 (2009). 간은 ALA를 DHA로 전환하고 LA를 ARA로 전환하기 위한 대부분의 활성 조직을 포함하고, 따라서 DHA 및 ARA를 덜 활성인 조직들 또는 장기들, 예컨대 뇌에 제공하는 데 중요한 역할을 한다. M. Martinez 등, *J. Pediatr.* 120:S129-S138 (1992). 대안적으로, 이들 LC-PUFA는 식이로부터 직접 소비될 수 있다. DHA 및 EPA는 어류, 호두 및 아마씨유에서 발견되는 한편, ARA는 동물 지방원, 옥수수유, 대두유 및 해바라기씨유로부터 이용 가능하다.
- [0020] $n-3$ 지방산
- [0021] $n-3$ 지방산 DHA는 신경 및 망막 발육 및 작용에 중요하다. 이는 신경 막에서 주요 장쇄 PUFA이고 뇌 작용, 뇌 회로의 구축 및 신경 충격 전달에 필수적이다. 내재 막 성분으로서, DHA는 시냅스 구조, 신경전달 및 시냅스 가소성을 유지시키는 데 중요한 막 유동성에 기여한다. G. Jicha 등, *Clin. Interv. Aging* 5:45-61 (2010). DHA는 또한 뉴런 분화 및 생존에 필수적인 신호전달 사건들에 영향을 미치고, 신경전달물질 및 에이코사노이드의 수치 및 대사에 효과를 갖는다. 뇌에서의 대부분의 DHA 축적은 임신 후기에 시작하여 두 살 내내 발생한다. 설치류 및 영장류들에서, 이 기간 동안의 $n-3$ PUFA의 부적절한 공급은 손상된 학습 능력 및 신경전달을 야기시키는 것으로 나타났다. M. Martinez 등, *J. Pediatr.* 120:S129-S138 (1992). DHA 결핍 식이로 사전에 제한된 쥐들에서의 DHA의 보충은 기억 및 학습 업무들에 성능을 구제한다. W. Chung 등, *J. Nutr.* 138(6):1165-1171 (2008). 그리고, 건강한 청소년기 소년들의 연구에서, 8주간의 DHA 보충은 위약과 비교하여 활동 업무의 수행 동안 전전두피질에서의 기능적 활동을 유의적으로 증가시켰다. R. McNamara 등, *Am. J. Nutr.* 91:1060-7 (2010). 따라서, DHA는 발육에서만뿐만 아니라 뉴런 작용의 유지에도 중요한 것으로 생각된다.
- [0022] DHA는 또한 망막에서 매우 농축되고 시각 색소 로돕신의 광수용체 분화 및 활성화에 중요한 효과를 갖는다. H. Lauritzen 등, *Prog. Lipid Res.* 40:1-94 (2001); M. Clandinin 등, *J. Pediatr.* 125:S25-32 (1994). 영장류들 및 설치류들의 발육에서 초기 DHA의 부적절한 공급은 비정상 망막 생리학을 발생시키고 시력을 감소시킨다. M. Reisbick 등, *Dev. Psychol.* 33:387-395 (1997); J. McCann 등, *Am. J. Clin. Nutr.* 82:281-295 (2005). 유사하게, 인간들에서, 출생 처음 12개월 동안 DHA가 없는 제제를 공급받은 유아는 DHA 보충 제제를 공급받은 유아들보다 시력이 더 낮은 것으로 나타났다. E. Birch 등, *Am. J. Clin. Nutr.* 91(4):848-859 (2010). DHA 결핍증은 또한 태아 알코올 증후군, 주의력 결핍 과잉행동 장애, 낭포성 섬유증, 페닐케토노증, 단극성 우울증, 공격적인 적개심, 및 부신백질이영양증과 관련된다. A. Horrocks 등, *Pharmacological Res.* 40(3):211-225 (1999).
- [0023] DHA 및 다른 $n-3$ 지방산의 섭취 증가의 이익은 예를 들면, 알츠하이머병(AD), 양극성 질환(BP), 주요 우울 장애(MDD) 및 출산후 우울증을 포함하는 우울증, 폐혈증, 급성 호흡 스트레스, 상처 치유, 암, 심혈관 질환, 뇌졸중, 파킨슨병, 정신분열증, 당뇨병, 다발성 경화증, 및 만성 염증성 질환들, 예컨대 류마티스관절염, 전신성 홍반성 낭창, 및 염증성 장 질환을 포함하는 다양한 질환들에 기재되어 있다.
- [0024] 예를 들면, AD 환자들에 의한 임상 실험은 DHA가 치료학적 이익을 제공한다는 것을 나타낸다. AD에서의 DHA의 효과를 평가하는 연구들의 검토를 위해, 문헌[G. Jicha and W. Markesbery, *Clin. Interv. Aging* 5:45-61 (2010)]을 참조한다. AD의 실험실내 검정들, 세포 배양 시스템들, 및 쥐와 모델들로부터의 데이터는 뇌에서의

아밀로이드 프로세싱에서의 n-3 PUFA에 대한 직접적인 역할을 지지한다. 그리고, AD의 아밀로이드 생성 형질전환 모델들에서, DHA에 의한 보충은 $\alpha\beta$ 의 수치를 낮춘다. M. Oksman 등, *Neurobiol. Dis.* 23(3):563-572 (2006). AD를 앓는 환자들에서의 파지티브 임상 실험 데이터 이외에, 경증의 기억 불평을 갖는 건강한 노인에서의 대규모 연구는 DHA를 투여받은 피험체들이 위약을 투여받은 피험체들과 비교하여 6개월 후 학습 및 기억 시험들에서 더 잘 수행한다는 것을 나타낸다. (Martek Press Release, May 4, 2010). 따라서, DHA는 또한 AD를 예방하는 데 있어서 유리한 역할을 할 수 있다.

[0025] DHA의 치료학적 용도는 또한 BP 및 MDD를 앓는 환자들에서 조사되었다. BP에서 DHA에 대한 검토를 위해, 문헌[V. Balencia-Martinez 등, *Expert. Rev. Neurother.* 11(7):1029-1047 (2011)]을 참조한다. 인간 환자들로부터 뇌 조직에서의 DHA 수치를 평가하는 데 있어서의 어려움으로 인해, 혈액 샘플들로부터의 적혈구 막들에서의 지방산 조성물은 평가되었고 건강한 대조군들에서보다 BP 및 MDD를 앓는 환자들에서 유의적으로 더 적은 DHA를 포함하는 것으로 밝혀졌다. R. McNamara 등, *J. Affect. Disord.* 126(1-2):303-311 (2010). 사후 연구에서, 안와 전두피질의 지방산 조성물은 정상 대조군들과 비교하여 BP 환자들에서 유의적으로 더 낮은 수치의 DHA를 가졌다. R. McNamara 등, *Psychiatry Res.* 160(3):285-299 (2008). 그리고, 4개월, 이중 맹검, 위약 대조 연구에서, n-3 지방산을 투여받은 BP 환자는 위약 그룹보다 유의적으로 더 긴 관해 기간을 가졌다. A. Stoll 등, *Arch. Gen. Psychiatry* 56(5):407-412 (1999). 이들 연구는 DHA가 특히 이의 기분 안정 효과로 인해 BD 및 MDD에서 치료학적으로 유리하다고 보여준다.

[0026] DHA는 또한 다른 형태의 우울증을 앓는 환자들에게 이익을 주는 것으로 나타났다. 검토를 위해, 문헌[A. Logan 등, *Lipids Health Dis.* 3:25-32 (2004)]을 참조한다. 다수의 연구는 우울증을 앓는 환자들의 혈액에서 n-3 수치 감소를 발견하였다. 유사하게, 혈장 DHA 증가는 여성들에서 보고되는 출산후 우울증의 증상의 감소와 관련된다. 일부 위약 대조 연구는 n-3 치료가 우울증 시스템을 개선한다는 것을 발견하였다. n-3 수치와 우울증 사이의 관계에 대한 검토를 위해, 문헌[A. Logan 등, *Lipids Health Dis.* 3:25-32 (2004)]을 참조한다.

[0027] 패혈증에서, EPA, γ -리놀렌산 및 항산화제들이 풍부한 경장 식이가 병원 결과를 개선하고 중증 패혈증 또는 기계적 인공호흡을 필요로 하는 패혈증 쇼크를 앓는 환자들에서 사망률을 감소시켰다. A. Pontes-Arruda 등, *Crit. Care Med.* 34(9):2325-2333 (2006). 인공호흡 처치 무 일자, ICU 처치 무 일자에서의 유사한 이익은 새로운 장기 이상을 감소시키고, 사망률 감소는 장쇄 PUFA 및 항산화제들이 풍부한 식이를 공급받은 급성 호흡 스트레스를 앓는 환자들에서 보고되었다. J. Gadek 등 *Crit. Care Med.* 27(8):1409-1420 (1999).

[0028] N-3 지방산은 또한 상처 치유에서 유리한 효과를 갖는 것으로 보고되었다. 지질 미세환경의 변경을 통해, n-3 지방산은 상피 세포들의 재구성을 증대시키고 또한 염증 감소에 도움을 줄 수 있다. D. Ruthig and K. Meckling-Gill, *J. Nutr.* 129:1791-1798 (1999); J. McDaniel 등 *Wound Repair Regen.* 19(2):189-200 (2011).

[0029] EPA 및 DHA는 전립선암 및 유방암과 같은 암들에서 보호 효과를 나타냈다. 유리한 효과는 항염증성 특성, 및 예컨대 NF- κ B의 하향조절을 통한 증식을 감소시키고 아포토시스를 증대시키는 기전으로 인할 수 있다. 암에서의 n-3 지방산에 대한 논의를 위해, 문헌[B. Anderson and D. Ma, *Lipids Health Dis.* 8:33 (2009)]을 검토한다.

[0030] N-3 지방산은 심혈관 질환을 앓는 환자들에서의 유리한 효과 및 건강한 사람에서의 심혈관 질환의 위험 감소와 관련된다. 유사한 긍정적인 효과가 뇌졸중에서 보고되었다. 따라서, 미국 심장 협회, 및 다른 건강 기관은 식이에서 n-3 지방산 섭취 증가를 추천하였다. P. Kris-Etherton 등 *Circulation* 106:2747-2757 (2002). 심혈관 건강에 대한 n-3 지방산의 관찰된 효과에 대한 가능한 기전은 저중상지방혈증 효과, 저혈압 효과, 혈소판 응집 감소, 및 심근 그 자체의 안정화 효과를 포함한다.

[0031] 몇몇 병증들에서의 n-3 지방산의 이익은 광범위한 항염증성 효과에 기여할 수 있다. EPA 및 DHA는 염증 해결 및 면역조절 작용을 갖는 항염증성 매개체들인 레슬빈를 생성시킨다. 예를 들면, EPA 및 DHA는 백혈구 주화성에 억제 효과를 나타내고, 면역 세포들에서 NF- κ B의 활성화 감소를 통해 염증성 사이토카인들의 생성을 변경한다. P. Calder, *Int. Rev. Immunol.* 28:506-534 (2009). 일반적으로, n-3 PUFA는 감소된 전염증성 T 세포 반응들과 관련된다. n-3 지방산이 동물 식이들에서 증가할 때, 지질 뗏목(raft)들에서의 T 세포 막 마이크로도메인 조성은 변경되어, NF- κ B 활성화, IL-2 제조, 및 세포 내 증식을 감소시킨다. 구체적으로, n-3 PUFA는 T 세포 활성화의 가장 초기의 신호전달 매개체들, 예컨대 단백질 키나제 C의 분포 및 분배에 영향을 미친다. Y. Fan 등, *J. Immunol.* 173:6151-6160 (2004). N-3 지방산은 또한 수지상 세포들에서 MHC 클래스 II 발현을 감소시켜, T 세포들에 대한 항원 제시를 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났고, n-6 지방산은 증가된 항원 제시 활성화와 관련된다. Sanderson 등, *J. Leukoc. Biol.* 62:771-777 (1997). 단핵구 세포주 및 복강내 마크로파지들에서, DHA 및 EPA는 G 단백질 커플링된 수용체 120(GPR120)를 통해 매개되는 항염증성 특성을 갖는다. 그 결과, 이들 지방

산은 마크로파지 유발 조직 염증의 억제를 통해 생체내 항당뇨병 효과를 나타낸다. D. Oh 등, *Cell* 142(5):687-698 (2010). n-3 PUFA의 다양한 면역조절 작용은 이들이 많은 인간 질환들에서 영향을 미칠 수 있다는 것을 나타낸다.

[0032] *n-6 지방산*

[0033] n-3 지방산과 같이, ARA와 같은 n-6 지방산은 신경 발육 및 뇌 작용에서 중요한 역할을 하고, 출산 전 및 출산 후 발육 동안 뇌에서 ARA 축적이 발생한다. B. Koletzko 등, *J. Perinat. Med.* 36(1):5-14 (2008). N-6 지방산은 일반적으로 정상 발육 및 면역에 중요하고, 또한 피부 및 모발 성장을 자극하고, 뼈 건강을 유지시키고, 대사를 조절하고, 생식계를 유지시킨다.

[0034] 장쇄 PUFA 보충물들

[0035] 10에 걸쳐, 건강 기관은 이들의 건강 이익들로 인해 식이에서 n-3 지방산의 소비를 추천하였다. DHA 및 EPA는 영양학적 보충물들 또는 처방 제품들(예를 들면, LOVAZA®, OMACOR® 및 Vascepa™)에서 트리글리세라이드로서 또는 에스터화 형태로서 상업적으로 구입 가능하다. DHA 보충물은 어유, 또는 식물성 공급원들, 예컨대 아마씨유 또는 조류로부터 유도될 수 있다. 보충물은 분말, 액체 음료수 또는 튜브 영양학적 제제일 수 있다.

[0036] 유아용 제제는 연방 식품, 의약품 화장품법(Federal Food, Drug, and Cosmetic Act)에 규제되고, 이 법은 유아용 제제를 "모유의 이의 자극 또는 모유에 대한 완전 또는 부분 대체물로서의 이의 적합성의 이유로 오로지 유아들에 대한 식품으로서만 특수 식이 용도인 것으로 칭하거나 이를 대표하는 식품"으로 정의한다. FDA는 유아를 12개월을 넘지 않는 사람으로 정의한다. 21 CFR 105.3(e). 모유에서의 주요 n-3 지방산은 DHA이고, (전체 지방산의 0.17% 내지 1.0% 범위의) 평균 7-8mg/dL이다. R. Yuhas 등, *Lipids* 41(9):851-858 (2006). 모유에서의 DHA의 양은 대부분 모체 DHA 흡수의 반영이다.

[0037] 상업적으로 구입 가능한 TG-LCPUFA 보충 유아용 제제는 엔파밀(Enfamil) 제제들, 예컨대 Enfamil LIPIL® 및 Enfamil PREMIUM®, Baboo, Earth's Best Organic, Nestle 제제, 예컨대 Nestle Gerber GOOD START® 및 Nestle NAN®, Nutricia 제제, 예컨대 NeoCATE® 및 APTAMIL®, Parent's Choice Organic, Pfizer의 SMA GOLD®, Similac 제제, 예컨대 Similac ADVANCE®, Similac EARLY SHIELD®, 및 ISOMIL®, 및 Ultra Bright Beginning를 포함한다. 다른 유아용 제제는 또한 TG-LCPUFA로 보충될 수 있다. TG-LCPUFA 보충 제제는 젖 기반 또는 대두 기반일 수 있고, 유기물일 수 있다. 미국에서, TG-LCPUFA 보충 유아용 제제는 제품 판매의 대략 90%를 차지한다(Mead Johnson Nutrition).

[0038] TG-LCPUFA를 또한 장쇄 지방산을 갖는 영양학적 지원 또는 식이 보충을 필요로 하는 토들러들, 노인 및 다른 사람에 대한 팔로우-온 제제들에 및 음료수들에 첨가할 수 있다. 이러한 제품의 예는 ENSURE®, PEDIASURE®, CARNATION®, BOOST®, CERELAC® 및 SOUVENAIID®를 포함한다. 또한, TG-LCPUFA 또는 LC-PUFA의 에스터들로 보충된 특수 제제는 튜브 영양을 요하는 환자들에서 본 발명의 방법들 및 디바이스들과 관련하여 사용될 수 있다. 예를 들면, 장관 제제는 흔히 신부전, 손상된 GI 작용, 장 절제, 지방 흡수불량, 영양불량, 궤양, 고혈당증/당뇨병, 간부전, 급성 및 만성 폐 질환, 또는 면역손상 상태를 발생시키는 위장관 질환들 또는 병증을 갖는 조산아들, 환자들에 사용된다. 상업적으로 구입 가능한 장관 제제의 검토를 위해, 문헌[A. Malone, *Pract. Gastr.* 29(6):44-74 (2005)]을 참조한다. 영양학적 제제는 환자의 질환 또는 병증에 따라 표준, 기초적, 또는 특수화될 수 있다. 흔히 사용되는 표준 제제는 예를 들면 ISOCAL®, NUTREN 1.0®, NUTREN 1.5®, NUTREN 2.0®, OSOMLITE 1.0®, OSMOLITE 1.2®, FIBERSOURCE 1.2®, JEVITY 1.2®, JEVITY 1.5®, PROBALANCE®, ISOSOURCE 1.5®, DELIVER 2.0®, NOVOSOURCE 2.0® 및 TWOCAL HN®을 포함한다. 기초 제제는 중합체 및 수소화 제제를 포함하는 다량영양소원을 포함할 수 있고, 섬유질 증대될 수 있다. 질환 특이적 제제는 예를 들면 신장 제제들, 예컨대 MAGNACAL RENAL®, NEPRO®, NOVASOURCE RENAL®, SUPLENA® 및 NUTRI-RENAL®을 포함한다.

[0039] 위장관(GI) 제제는 중증의 단백질 또는 지방 흡수불량, 광범위한 장 절제, 낭포성 섬유증, 뇌성마비, 단장 증후군, IBD, 궤양, 크론병, 설사, GI 누공, 셀리악병, 흡수불량 증상들, 외상/수술, 방사선 장염, 장 이상, 유미항을 갖는 환자를 포함하여 GI 작용이 손상된 환자들의 영양학적 관리에 사용될 수 있다. 이들 제제는 또한 초기 수술 후 급식, 영양 공급(trophic feeding), 전체 비경구 영양제(TPN) 대체품, 및 TPN에 의한 이중 급식에 사용된다. GI 제제는 예를 들면 지방 흡수불량에 대한 가능성을 감소시키는 70%의 중간 사슬 트리글리세라이드 및 30%의 장쇄 트리글리세라이드로 이루어진 PEPTAMEN®, VIVONEX PLUS® 및 VIVONEX PEDIATRIC®를 포함한다.

[0040] 불행하게도, 장쇄 지방산의 장쇄 트리글리세라이드 또는 에스터들의 가수분해하는 손상된 능력으로 고생하는 사람, 예컨대 손상된 췌장 배출을 갖는 사람 또는 췌장 부전증으로 고생하는 사람들의 경우, 심지어 DHA, EPA 및

다른 n-3 지방산을 갖는 이러한 제제를 보충하는 것이 이들 화합물들과 관련된 이익을 실현하는 데 충분하지 않을 수 있다. 장쇄 트리글리세라이드 또는 지방산 에스터는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산으로 대사되어 장에서 적절히 흡수되어야 한다. 본 발명은 상당히 더 높은 농도의 장쇄 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산을 포함하는 즉시 사용(ready to use) 제제를 제공하기 위해 기존의 상업적으로 구입 가능한 장쇄 PUFA 보충물들 또는 장쇄 PUFA로 보충된 새로 설계된 제제를 이용하는 방법을 제공한다. 몇몇 실시양태들에서, 상기 방법은 DHA, EPA 및 ARA 트리글리세라이드 또는 에스터화 DHA, EPA 및 ARA로부터 제조된 장쇄 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산을 제공하는 데 특히 효과적이어서 제제는 달리 이를 가수분해하고 흡수할 수 없는 사람들에게 이러한 중요한 지방산과 관련된 최대 이익을 제공한다.

[0041] 장쇄 트리글리세라이드 및 지방산 에스터를 가수분해하는 능력 감소

[0042] 췌장 부전증은 장쇄 트리글리세라이드를 가수분해하는 능력을 감소시키는 병증들 중 하나이다. 췌장 부전증은 췌장 리파제를 포함하는 외분비 췌장 효소들의 불충분한 생성을 특징으로 한다. 췌장 부전증은 인간 삶의 다양한 단계 동안 자연히 발생할 수 있다. 예를 들면, 췌장 리파제의 분비는 대략 30주 임신에서 낮은 수치로 시작하고 태어난 후 낮게 유지된다. 따라서, 유아들, 특히 조산아는 췌장 부전증을 경험할 수 있다. 그 결과, 이들이 모유 수유되지 않는 경우, 이들 유아는 빈약한 지방산 가수분해 및 흡수에 걸리기 쉽고, DHA, EPA 및 다른 LC-PUFA의 섭취와 관련된 이익들이 박탈된다.

[0043] 스펙트럼의 다른 말단에서, 달리 건강한 노인은 또한 췌장 부전증 또는 자연 노화 과정의 일부로서 발생하는 췌장 변화로 인해 LC-PUFA 트리글리세라이드 또는 에스터화 LC-PUFA를 가수분해하는 다른 능력 감소를 경험할 수 있다. 이들 변화는 췌장의 위축, 섬유증, 경화증, 또는 지방증을 포함할 수 있다. 그 결과, 노인은 외분비 췌장 효소 분비 감소로 인해 영양불량, 지방변, 설사, 복부 통증 및 체중 감소를 포함하는 소화불량의 증상을 경험할 수 있다. K. Herzig 등, *BMC Geriatrics* 11:4-8 (2011).

[0044] 췌장 부전증 또는 LC-PUFA 트리글리세라이드 또는 에스터화 LC-PUFA를 가수분해하는 다른 능력 감소는 또한 질환 또는 외상으로부터 생길 수 있다. 예를 들면, 췌장염은 췌장 부전증을 발생시키는 췌장에서의 염증의 병증이다. 췌장염은 급성 또는 만성일 수 있고, 알코올 중독에 의한 췌장염, 특발성 만성 췌장염, 유전성 췌장염, 외상성 췌장염, 급성 괴사성 췌장염, 및 자가면역 췌장염을 포함한다. 낭포성 섬유증은 또한 특히 아이들 및 청소년들에서 췌장 부전증을 야기한다. 십이지장내 pH 감소를 발생시키는 장애들, 예컨대 가스트린종(줄링거-엘리슨(Zollinger-Ellison) 증상)은 리파제를 불활성화시키고 췌장 부전증을 발생시킬 수 있다. 췌장 부전증은 또한 위 또는 췌장의 부분들이 제거되는 위장관 수술, 췌장암, 위장관 질환들 예컨대 위궤양, 셀리악병, 또는 크론병에 의해, 또는 자가면역 장애를 예컨대 전신성 홍반성 낭창(systemic lupus erythematosus: SLE) 또는 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease: IBD)에서 발생할 수 있다.

[0045] TG-LCPUFA, 에스터화 LC-PUFA 및/또는 다른 장쇄 트리글리세라이드 및 지방산 에스터를 소화하는 능력 감소의 다른 원인은 예를 들면 과민성 장 증상, 고중성지방혈증, 중증 단백질 칼로리 영양불량을 포함하는 영양불량, 췌장 및 십이지장 종양, 복부 방사선요법, 혈액색증, 원발성 경화성 담관염, 원발성 담즙성 간경변, 슈바치만 증후군, 트립시노겐 결핍증, 엔테로키나제 결핍증, 또는 리파제의 분리 결핍증을 포함한다. D. Kasper 등, *Harrison*의 *Principles of Internal Medicine* 16th Ed. (2004). 장쇄 트리글리세라이드 또는 에스터화 장쇄 PUFA를 소화시키는 능력 감소는 또한 장 절제, 낭포성 섬유증, 뇌성마비, 단장 증후군, IBD, 췌장염, 크론병, 설사, GI 누공, 셀리악병, 흡수불량 증상, 외상/수술, 특히 GI 외상 또는 수술, 방사선 장염, 장 이상, 유미홍, 암, 특히 췌장 또는 GI 암 및/또는 상처 치유로부터 생길 수 있다. 정확한 원인이 공지되어 있지 않지만, 주의력 결핍 과잉행동 장애(ADHD)를 갖는 아이는 또한 LC-PUFA의 수치가 감소한다. Burgess 등, *Am. J. Clin. Nutri.* 71(suppl):327S-30S (2000).

[0046] 낭포성 섬유증(CF) 환자는 예를 들면 LC-PUFA의 수치가 감소하는 것으로 나타났다. Peretti 등, *Nutrition & Metabolism* 2:11-28 (2005). 췌장 효소 대체 치료를 받는 CF 환자는 흔히 지방 흡수불량으로 계속해서 고생한다. Kalivianakis, *American Journal of Clinical Nutrition* 69:127-134 (1999). 몇몇 실시양태들에서, 본 발명은 CF 환자들에서 지방들, 예컨대 LC-PUFA 등의 흡수를 개선하기 위한 제제들 및 방법을 제공한다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명은 CF 환자들에서 체중 증가를 유도하기 위한 제제들 및 방법을 제공한다.

[0047] 악액질 및 체중 감소는 조직들의 이화 상태, 영양소들의 분화, 및 진전된 단계의 흡수불량으로 인해 많은 암들의 진전 단계에서 흔하지만, 췌장암(PC)은 체중 감소 및 흡수불량이 진단 시 환자들의 80%-90%에서 존재한다는 점에서 비특이적이다. 외분비 결핍증으로부터의 흡수불량은 주로 체중 감소에 원인이고 췌장 실질 소실, 효소들이 장에 도달하는 것을 막는 췌장 관의 봉쇄, 및 수술 절차로 인한다. 모든 이들 기전들의 흔한 최종 결과는 지

방변증 및 체중 감소이다. Damerla 등, *J of Support Oncology* 6:393-396 (2008). PC에서의 체중 안정화는 개선된 생존 및 삶의 질과 관련된다. Davidson 등, *Clinical Nutrition* 23, 239-247 (2004). 몇몇 실시양태들에서, 본 발명은 PC 환자들에서 지방들, 예컨대 LC-PUFA 등의 흡수를 개선하기 위한 제제들 및 방법을 제공한다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명은 PC 환자들에서 체중 증가를 유도하기 위한 제제들 및 방법을 제공한다.

[0048] 본 발명의 몇몇 실시양태는 TG-LCPUFA, 에스터화 LC-PUFA 및/또는 다른 장쇄 트리글리세라이드 및 지방산 에스터를 가수분해하는 능력을 감소시키는 췌장 부전증 및 다른 병증들에 대한 현재의 치료 옵션을 개선한다. TG-LCPUFA, 에스터화 LC-PUFA 및/또는 다른 장쇄 트리글리세라이드 및 지방산 에스터를 가수분해하는 능력에 이러한 감소된 환자에서, 가수분해를 개선함이 없이 단지 이들 영양소들의 소모를 증가시키는 것은 지방변, 복부 통증, 경련, 설사, 및 다른 위장관 합병증을 발생시킬 수 있다. 췌장 효소 대체 치료는 또한 합병증을 발생시킬 수 있다. 다량의 췌장 소화 효소들이 대장을 손상시켜 섬유화 결장질환을 발생시킬 수 있다는 것이 관찰되었다. D. Bansi 등, *Gut* 46:283-285 (2000); D. Borowitz 등 *J. Pediatr.* 127:681-684 (1995). 많은 상업용 리파제 보충물들이 동물원으로부터 유래하면서, 리파제 보충물들에 의해 부여되는 다른 중요한 위험은 알레르기 반응이다. 따라서, 첨가된 리파제와 같이 또는 이것 없이 예비 가수분해된 장쇄 트리글리세라이드 또는 장쇄 PUFA 에스터를 제공하는 본 발명의 실시양태는 췌장 부전증 또는 장쇄 트리글리세라이드 또는 에스터화 장쇄 PUFA를 소화시키는 다른 능력 감소를 치료하기 위한 더 우수하고 안전한 방법을 제공한다.

[0049] n-3 및 n-6 지방산 둘 다 발육 동안 중요하므로, n-3 지방산은 삶에서 n-6 지방산보다 더 중요한 것으로 생각된다. 몇몇 피험체들, 특히 몇몇 성인들에서, (DHA 및 EPA):ARA의 비를 증가시키는 것이 바람직할 수 있다. 특히, 낭포성 섬유증 환자는 이의 혈장에서 증가하는 (DHA 및 EPA):ARA의 비로 이익을 얻을 수 있다. 불행하게도, 현재 구입 가능한 성인용 제제는 일반적으로 낮은 비의 n-3:n-6 지방산을 갖는다. 더구나, TG-LCPUFA의 손상된 가수분해를 갖는 피험체들에서, n-3 TG-LCPUFA의 소모를 단순히 증가시키는 것은 피험체에서 (DHA 및 EPA):ARA 비를 크게 증가시키지 않을 것이고, 비소화된 TG-LCPUFA의 생성된 증가는 위장관 문제를 발생시킨다.

[0050] 따라서, 본 발명의 몇몇 실시양태는 피험체, 특히 성인 피험체에서 (DHA 및 EPA):ARA의 비를 증가시키기 위한 제제들 및 방법을 제공한다. 예를 들면, 몇몇 실시양태는 n-3 트리글리세라이드 및/또는 에스터를 포함하는 제제가 n-3 트리글리세라이드 및/또는 에스터를 가수분해하는 리파제에 노출되는 성인용 제제를 제조하기 위한 방법을 제공한다. 몇몇 실시양태들에서, 제조된 제제는 리파제 치료제가 없는 상응하는 제제보다 더 높은 비의 n-3:n-6 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산, 예를 들면 더 높은 비의 유리 DHA 및 EPA 대 유리 ARA를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 제제는 n-6 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산보다 더 많은 n-3 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산, 예를 들면, 유리 ARA보다 더 많은 유리 DHA 및 EPA를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, n-6 트리글리세라이드 및/또는 에스터들보다 n-3 트리글리세라이드 및/또는 에스터들에 대해 더 높은 활성을 갖는 리파제에 노출시켜 제제를 제조한다. 몇몇 실시양태들에서, 효소는 RO 효소이다. 본 발명은 또한 n-3:n-6 유리 지방산 및/또는 모노글리세라이드의 비가 피험체의 혈장에서 발견되는 n-3:n-6 지방산의 비보다 높은 제제, 예를 들면 유리 DHA 및 EPA 대 유리 ARA의 비가 피험체의 혈장에서보다 높은 제제를 제공한다. 본 발명은 또한 이러한 제제를 성인 피험체에게 투여하는 방법을 제공한다. 몇몇 실시양태들에서, 피험체는 낭포성 섬유증을 갖는다.

[0051] 조산아들에서 장쇄 지방산을 가수분해하는 능력 감소

[0052] 장쇄 PUFA는 정상 신경계 및 망막 발육에 대해 유아들에서 중요하고, 임신 30주에 시작하여 뇌 및 망막의 세포막들에서 높게 축적된다. C. Martin 등, *J. Pediatr.* 159(5):743-749 (2011); A. Lapillone 등, *Leukotrienes Ess. Fatty Acids* 81:143-150 (2009); J. McCann 등, *Am. J. Clin. Nutr.* 82:281-295 (2005); M. Martinez 등, *J. Pediatr.* 120:S129-S138 (1992). 보통, DHA, EPA 및 ARA를 포함하는 지방산뿐만 아니라 이들 지방산을 모노글리세라이드 및 유리 지방산으로 분해하는 데 필요한 리파제들이 태반을 통해 이후 태아로 모유를 통해 유아들에 제공된다. 조산아는 짧은 임신 시간과 뒤이은 탄생 후의 지방산에 대한 외부 공급원들에 대한 이들의 의존성으로 인해 지방산의 부적절한 공급에 대한 상당히 더 큰 위험이 있다. C. Martin 등, *J. Pediatr.* 159(5):743-749 (2011). 추가로, 조산아는 충분한 수치의 췌장 리파제를 제조하지 않으므로, 이는 결과적으로 이들의 제제에 제공된 임의의 장쇄 지방산을 가수분해하는 어려움을 갖는다.

[0053] 조산아들이 만삭아와 비교하여 뇌 및 망막 둘 다에서 더 적은 DHA 및 더 낮은 DHA/ARA 비를 갖는 것으로 나타났다. M. Martinez 등, *J. Pediatr.* 120:S129-S138 (1992). 추가로, 조산아들의 지방산 프로파일의 후향적 연구에서, 부적절한 수치의 장쇄 PUFA들은 아마도 조절 이상 면역 반응으로 인한 만성 폐 질환 및 패혈증의 증가와 관련되었다. C. Martin 등, *J. Pediatr.* 159(5):743-749 (2011). 이러한 연구 및 다른 연구는, DHA 및 다른 장

쇄 트리글리세라이드 또는 장쇄 지방산 에스터들이 보충된 제제들에 의해서도, 조산아들에서 적절한 수치의 장쇄 PUFA를 보장하는 것은 의미 심장하고 잠재적으로는 충족되지 않는 요구라는 것을 시사한다. 본 발명의 제제들, 방법들, 및 디바이스는 조산아들이 관련 의학적 이익을 인식하도록 충분한 양의 장쇄 지방산을 수용하도록 할 것이다.

[0054] 제제 공급 유아들에서의 장쇄 지방산을 가수분해하는 능력 감소

[0055] 지방산이 보충되지 않은 제제를 공급받은 유아는 또한 장쇄 PUFA들의 결핍을 경험할 수 있다. 장쇄 PUFA들의 수치는 모유를 공급받은 유아들과 비교하여 보충되지 않은 제제를 공급받은 유아들에서 감소하는 것으로 밝혀졌다. B. Koletzko 등, *J. Perinat. Med.* 36(1):5-14 (2008). 심지어 모유를 공급받은 유아도 모유에서의 DHA의 양이 변하고 모계 식이 흡수와 상관되므로 n-3 지방산의 결핍을 경험할 수 있다. 모유를 공급받은 유아들에서의 모유에서의 DHA의 양과 시각 및 언어 발달 사이의 양의 상관관계가 기재되어 있다. S. Innis, *J. Pediatr.* 143:S1-S8 (2003). 따라서, DHA를 포함하는 식이가 모유 수유를 하는 여성에게 추천된다. 제제를 공급받은 유아들의 경우, 모든 주요 제제 제조업자는 DHA 및 ARA를 포함하는 지방을 갖는 프리미엄 유아용 제제를 소개하였다. 그러나, 이들 DHA 및 ARA가 풍부한 제제들의 이익들에 대한 보고는 혼재되고 있었다. 몇몇 연구는 유아들이 장쇄 PUFA 함유 제제를 투여받을 때 인지 발달에서의 상당한 이점을 나타냄(하지만, 다른 유아는 그렇지 않음)을 보여주었다. B. Koletzko 등, *J. Perinat. Med.* 36(1):5-14 (2008); E. Sarkadi-Nagy 등, *J. Lipid Res.* 45:71-80 (2004). 최근에, 한 살 동안 DHA 및 ARA를 포함하는 Enfamil LIPIL®을 공급받은 유아는 지질들 없이 동일한 제제를 공급받은 유아들과 비교하여 개선된 호흡 건강을 포함하는 개선된 면역 결과를 경험하였다. E. Birch 등, *J. Pediatr.* 156(6):902-906 (2010). 전체적으로, 그러나, 현재까지 임상 전의 데이터는 유아 발육에 대한 현재의 장쇄 PUFA들 보충 제제들의 일치하는 이익을 나타내지 않는다.

[0056] 이들 연구들에서의 불일치하는 결과들에 대한 한가지 설명은 몇몇 유아들이 장쇄 트리글리세라이드 또는 장쇄 지방산 에스터들이 보충된 제제를 섭취할 때에도 장을 통해 필요한 양의 중요한 지방산을 흡수할 수 없다는 것이다. 지방산을 흡수하는 이러한 능력 부족은 유아들의 낮은 수치의 내생 췌장 리파제로 인할 수 있다. 리파제들이 통상적으로 모유를 통해 유아로 전달되므로, 제제를 공급받은 유아는 장에 의한 흡수를 위해 장쇄 PUFA 또는 PUFA 에스터를 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산으로 분배하는 충분한 수치의 리파제를 갖지 않을 수 있다. 그 결과, LC-PUFA 보충 제제를 공급받은 유아는 여전히 모유를 공급받은 유아들과 비교하여 LC-PUFA의 더 적은 흡수를 갖는다. 다시 한번, 단순히 지방산 보충물을 제공하지 않지만, 이들 지방산의 가수분해 및 흡수를 가능하게 하는 명확한 수요가 존재한다.

[0057] 정부 규제 유아용 제제들(또는 예를 들면 의학 영양학적 제제들)에 리파제를 첨가하는 것은 적합한 리파제 보충물을 스크리닝하고 안정화하고 제제화하기 위해 상당한 개발 작업을 요한다. 비규제 제제들에서, 충분한 시험 없이는, 리파제 안정성, 특이성 부족, 순도 및/또는 다른 재료들에 의한 방해물 포함하는 문제점은 과도한 또는 가능하게는 해로운 수치의 효소의 사용을 발생시킬 수 있다. 규제 장애를 넘어 엄청난 양의 새로운 물질을 첨가하는 것은 또한 장쇄 트리글리세라이드를 가수분해하는 능력이라는 감소한 사람, 특히 유아가 얼마나 잘 제제에 견디는지에 영향을 미치는 다른 변수를 도입한다. 이러한 문제점은 예를 들면 미국 특허 5,902,617(Pabst) 및 미국 특허 4,944,944(Tang)에 기재된 제제에서 지속된다.

[0058] 본 발명의 실시양태는 유아의 장을 통해 쉽게 흡수될 수 있는 증가한 양의 필수 모노글리세라이드 및 유리 지방산을 제공하는 공급 받은 그대로의 영양학적 제제를 제공함으로써 이들 다양한 문제점들을 해결한다. 그 결과, 제제를 공급받은 피험체는 DHA, EPA 및 ARA의 이익을 제공받을 수 있다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 기존의 제제들에서 존재하는 예비 가수분해된 지방을 제외한 새로운 성분을 도입하지 않는다. 특정한 실시양태들에서, 제제를 공급받은 유아는 리파제 보충물들에 대한 노출 없이 모유 수유 유아들에 의해 얻은 지방산 이익들이 제공된다. 다른 실시양태들에서, 본 발명의 영양학적 제제는 증가된 양의 장쇄 모노글리세라이드 및 유리 지방산, 특히 DHA, EPA 및 ARA를 제공하기 위해 유아용 제제에 첨가되는 최소 양의 리파제의 사용을 허용하는 매우 특이적인 리파제를 포함한다.

[0059] 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 지방산의 흡수를 개선시킨다. 몇몇 실시양태들에서, 피험체는 3일, 5일, 7일, 10일, 14일, 30일, 60일 이상 동안 영양학적 제제를 섭취한다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 영양학적 제제의 이러한 섭취는 대변에서 전체 지방을 감소시키고, 구체적으로 대변에서 DHA, ARA 및/또는 EPA의 수치를 감소시킬 수 있다. 몇몇 실시양태들에서, 이러한 감소는 영양학적 제제의 섭취를 시작하기 전의 피험체의 대변 조성에서 측정된다. 몇몇 실시양태들에서, 이러한 감소는 섭취 전에 리파제에 노출되지 않은 영양학적 제제, 예컨대 현재 구입 가능한 영양학적 제제를 공급받은 피험체의 대변 조성에 대해 측정된다. 대변에서의 전체 지방,

DHA, ARA 및/또는 EPA의 수치는 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 이상 감소할 수 있다. 특정한 실시양태들에서, 대변에서의 전체 지방, DHA, ARA 및/또는 EPA의 수치는 50% 내지 80% 감소한다. 몇몇 실시양태들에서, 대변에서의 전체 지방의 수치는 적어도 50% 감소한다. 몇몇 실시양태들에서, 대변에서의 적어도 1종의 LC-PUFA(예컨대 DHA, ARA 또는 EPA)의 수치는 적어도 50% 감소한다. 몇몇 실시양태들에서, 대변에서의 적어도 1종의 LC-PUFA(예컨대 DHA, ARA 또는 EPA)의 수치는 적어도 60% 감소한다. 몇몇 실시양태들에서, 대변에서의 DHA, ARA 및 EPA의 수치는 각각 적어도 50% 감소한다. 몇몇 실시양태들에서, 대변에서의 DHA, ARA 및 EPA의 수치는 각각 적어도 60% 감소한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제의 섭취는 DHA 및 ARA의 수치를 포함하는 지방 수치의 혈장, 적혈구, 및 조직 부작물을 개선한다. 조직은 망막, 심장, 지방조직, 및 신장 조직을 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제의 섭취는 혈장, 적혈구들, 또는 둘 다에서 DHA, ARA 또는 둘 다의 수치를 증가시킨다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제의 섭취는 망막에서 DHA, ARA 또는 둘 다의 수치를 증가시킨다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제의 섭취는 심장에서 DHA, ARA 또는 둘 다의 수치를 증가시킨다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제의 섭취는 트리글리세라이드, 콜레스테롤, HDL 및/또는 LDL의 혈장 수치를 증가시킨다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제의 섭취는 피험체의 혈장에서 HDL 대 LDL의 비를 증가시킨다.

[0060] 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제의 섭취는 비타민 A 및/또는 비타민 E의 혈장 수치를 증가시킨다. 이론에 구속되고자 의도함이 없이, 이러한 증가는 비타민들 A 및 E가 통상적으로 가수분해되어야 하는 에스터들로서 제공된다는 사실로 인해 것으로 생각된다. 본 발명의 다양한 방법들 및 조성물들에서 리파제에 대한 노출은 이들 비타민 에스터들의 가수분해를 개선하여, 혈장에서 비타민들 A 및 E가 더 많이 축적되게 한다고 생각된다.

[0061] 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제의 섭취는 간에서 지방의 축적을 유의적으로 증가시키지 않으면서 유리한 효과를 갖는다. 지방간 질환(FLD)은 간 세포들에서 지방, 특히 트리글리세라이드의 축적 증가를 특징으로 한다. 이 병증은 또한 지방 대사에 영향을 미치는 다른 질환들과 관련된다. 간이 지방을 포함하는 것은 정상이고 그 자체로, 이는 증상을 야기하지 않는다. 몇몇 환자들에서, 지방간은 간 염증 및 간 세포사(지방간염)를 수반할 수 있다. 간염(간세포 암종)과의 연관관계가 또한 존재한다. 인슐린 저항, 및 탄수화물 및 포화 지방산의 소비 증가, 및 섬유질 및 오메가-3 지방산의 섭취 감소는 모두 FLD의 발병과 분명히 연관된다.

[0062] FLD의 원인은 식이, 약제들, 질환들, 및 의학 병증을 포함한다. 과도한 칼로리 소모는 FLD를 발생시킬 수 있고; 과도한 칼로리 섭취는 정상 방식으로 지방을 대사시키는 간의 능력을 제압하고, 간에서 지방 축적을 발생시킨다. 타목시펜, 아미오다론 주사, 아미오다론 경구 및 메토트렉세이트를 포함하는 다수의 약제는 FLD와 관련된다. 지방간은 또한 II형 당뇨병, 비만 및 혈액에서의 고 트리글리세라이드 수치, 췌리악병, 및 윌슨병(구리 대사의 이상), 신속한 체중 감소 및 영양불량과 관련된다.

[0063] 리파제

[0064] 장쇄 트리글리세라이드 또는 장쇄 지방산 에스터를 가수분해시키는 능력 감소와 관련된 췌장 부전증 및 다른 병증은 현재 췌장 리파제를 포함하는 보충적 소화 효소들로 치료된다. 그러나, 췌장 효소들, 특히 이들 보충물들에 존재하는 췌장 리파제는 대개 위산 및 펩신에 의한 분해에 민감하여 오직 적은 분획의 섭취된 효소들만이 활성 형태로 십이지장에 도달한다. E. Ville 등, *Digestion* 65:73-81 (2001). 불행하게도, 상당 부분의 전달된 중량이 플라스틱 코팅이므로, 많은 산 보호 코팅들이 유아 집단들 또는 면역 손상 환자들에 대해 잠재적인 안정성 문제를 갖는다. 더구나, 산 보호 코팅들이 도움이 되지만, 약간의 정도의 흡수불량이 지속하여, 췌장 부전증을 앓는 환자는 증가하는 용량의 효소 보충물을 요한다. 장내로 코팅된 효소들의 지방산 흡수불량의 이러한 지속성은 췌장 부전증을 앓는 환자들에서 십이지장 및 상부 공장이 대개 산성 환경이어서 예상된 pH 상승이 성취되지 않아 보호 코팅이 효소를 방출하도록 적절히 용해되지 않는다는 사실에 기인할 수 있다. D. Graham, *New England J. Med.* 296(23):1314-1317 (1977). 이들 문제점들 모두는 투여된 리파제의 용량을 증가시킴으로써 해소되었다. 불행하게도, 상기 기재된 바와 같이, 고농도의 췌장 효소 보충물이 섬유화 결정질환과 관련되는 것으로 발견되었다. 따라서, 본 발명의 몇몇 실시양태는 첨가된 리파제를 포함함이 없이 더 높은 백분율의 장쇄 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산을 포함하는 영양학적 제제를 제공한다. 몇몇 실시양태는 본 명세서에 기재된 최적화된 용량의 리파제를 포함하는 영양학적 제제를 제공한다.

[0065] 리파제는 동물, 식물, 및 많은 천연 또는 유전 조작 미생물들로부터 얻어질 수 있다. 대부분은 아니지만, 많은 상업적으로 구입 가능한 식이 리파제 보충물은 동물들로부터 유래하고, 특히 소화 효소들에 의해 쉽게 분해된다. 보다 덜 빈번하게 사용되는 대체물은 미생물 리파제, 즉 박테리아 또는 진균, 예컨대 효모 등에 의해 제조된 리파제이다. 미생물 리파제는 동물 또는 식물 리파제들보다 더 넓은 pH 범위에 걸쳐 활성을 보유하고,

따라서 장내 코팅된 정제들에 대한 필요성을 없애준다. 그러나, 미생물 효소는 소장에서 트립신에 의해 분해되어, 장에서 트리글리세라이드 및 에스터를 분해하는 미생물 효소의 유용성을 감소시키는 경향이 있다. 특정한 실시양태들에서, 본 발명의 제제들, 방법들, 또는 디바이스들에서 사용되는 리파제는 박테리아 리파제들, 진균 리파제들, 또는 둘 다이다.

[0066] 개별 리파제들의 특이성 및 동역학은 매우 변할 수 있다. 리파제들의 특이성은 효소의 분자 특성, 기질의 구조 및 기질에 대한 효소의 결합에 영향을 미치는 인자들에 의해 제어된다. 특이성의 유형은 기질 특이성(즉, 소정의 리파제는 다른 리파제보다 지방산의 유형을 분해하는 데 더 활성일 수 있음) 및 위치 특이성(트리글리세라이드의 글라이세롤 골격의 1번 및/또는 3번 위치에서 에스터 결합들의 우선적 가수분해를 포함함)을 포함한다.

[0067] 크로모박테리움 비스코숨, 슈도모나스 플루오레센스, 부르콜테리아 세파시아, 및 리조푸스 오리자에에 의해 제조된 리파제가 다른 리파제들, 예컨대 칸디다 루고사, 리조무코르 미에헤이, 페니실룸 카멤베르티, 아스퍼질러스 니게르, 및 아스퍼질리스 오리자에에 의해 제조된 리파제보다 DHA, EPA 및 ARA에 대해 더 높은 특이성을 갖는다고 현재 밝혀졌다. 그 결과, 크로모박테리움 비스코숨, 슈도모나스 플루오레센스, 부르콜테리아 세파시아 및/또는 리조푸스 오리자에를 포함하는 리파제 보충물들, 또는 리파제 보충 영양학적 생성물은 TG-DHA, TG-EPA 및/또는 TG-ARA의 증가된 가수분해를 제공한다. 따라서, 본 발명의 일 양태는 크로모박테리움 비스코숨 리파제, 슈도모나스 플루오레센스 리파제, 부르콜테리아 세파시아 리파제 및/또는 리조푸스 오리자에 리파제를 포함하는 리파제 보충물들 또는 리파제 보충 영양학적 생성물을 제공한다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 크로모박테리움 비스코숨 리파제, 슈도모나스 플루오레센스 리파제, 또는 리조푸스 오리자에 리파제이다. 특정한 실시양태들에서, 리파제는 리조푸스 오리자에 리파제이다.

[0068] 특정한 종들의 리파제, 예컨대 크로모박테리움 비스코숨 리파제, 슈도모나스 플루오레센스 리파제, 부르콜테리아 세파시아 리파제 및 리조푸스 오리자에 리파제에 대한 언급은 반드시 리파제가 본래의 숙주 종들로부터 직접 제조된다는 것을 의미하지는 않는다. 예를 들면, 동일한 리파제가 다른 숙주 세포에서 제조함으로써 제조될 수 있다.

[0069] 본 발명의 다른 양태는 식이 보충물로서 크로모박테리움 비스코숨, 슈도모나스 플루오레센스, 부르콜테리아 세파시아, 및 리조푸스 오리자에 리파제들 중 하나 이상을 투여하거나, 또는 DHA, EPA 및/또는 ARA를 포함하는 제제를 이들 효소들 중 하나 이상으로 예비 가수분해함으로써 DHA, EPA 및/또는 ARA의 흡수를 증가시키는 방법이다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 크로모박테리움 비스코숨 리파제, 슈도모나스 플루오레센스 리파제, 또는 리조푸스 오리자에 리파제이다. 본 발명의 추가의 양태는 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)에 의해 정해지며 실시예 1에 기재된 바와 같은 크로모박테리움 비스코숨, 슈도모나스 플루오레센스, 부르콜테리아 세파시아, 및 리조푸스 오리자에 중 하나 이상의 특이적 활성에 필적하는 DHA, EPA 및/또는 ARA에 대한 특이적 활성을 갖는 리파제를 제공한다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 크로모박테리움 비스코숨 리파제, 슈도모나스 플루오레센스 리파제, 또는 리조푸스 오리자에 리파제 중 하나 이상의 특이적 활성에 필적하는 DHA, EPA 및/또는 ARA에 대한 특이적 활성을 갖는다. 본 발명의 일 실시양태는 5,000단위(예컨대 문헌[*Pharmaceutical Enzymes: Properties and Assay Methods*, R. Ruysen and A. Lauwers (Eds) Scientific Publishing Company, Ghent, Belgium (1978)]에 기재된 표준 올리브유 검정에서 평가된 단위) 미만의 리파제를 포함하는 영양학적 제제이다. 다른 실시양태들에서, 영양학적 제제는 3,000단위 미만의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 1,000단위 미만을 포함한다. 특정한 실시양태들에서, 5,000단위 미만, 3,000단위 미만, 또는 1,000단위 미만의 리파제를 포함하는 제제는 유아용 제제 또는 의학 영양학적 제제.

[0070] 부동화 리파제

[0071] 불용성 지지체들에 효소들 및 다른 단백질을 부동화하는 공정은 널리 공지되어 있고 문헌에 기재되어 있다. 리파제의 부동화는 효소의 안정성을 개선하여, 이것이 재사용되게 하고, 리파제에 의한 오염 없이 효소로부터 생성물들이 쉽게 분리되게 할 수 있다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 고체 지지체에 공유 결합하지만, 비공유 결합이 또한 사용될 수 있다. 리파제의 부동화의 적합한 방법은 예를 들면 흡착, 이온 결합, 공유 결합, 가교 결합, 캡슐화, 및 소수성 또는 친수성 중합체 및 무기 매트릭스들로의 포획을 포함한다. 문헌[Y. Ren 등, *BMC Biotechnol.* 11:63 (2011); V.R. Murty 등, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7:57-66 (2002)]을 참조한다. 리파제는 지지체 재료에 직접 결합하거나 링커를 통해 결합하여 부동화될 수 있다. 예를 들면, 문헌[Stark and Holmberg, *Biotechnol. and Bioeng.* 34(7):942-950 (1989)]을 참조한다.

[0072] 흡착에 의한 부동화는 가역적이고 통상적으로 소수성 힘을 포함한다. 이것은 단순하고 저렴하지만, 불완전한 부동화 또는 불용성 지지체로부터의 효소 누출의 단점을 갖는다. 이 방법을 이용한 부동화 리파제의 예는 문헌[E.

Lie 등, *Chem. Technol. and Biotechnol.* 50:549-553 (1991)(칸디다 실린드라세아 리파제, 제올라이트 지지체); M. Basri 등, *J. Chem. Technol. and Biotechnol.* 59:37-44 (1994)(칸디다 루고사 리파제; 중합체 지지체); H. Gunnlaugsdottir 등, *Enzyme and Microbiol. Tech.* 22:360-367 (1998)(휴미콜라 양모형 (*Humicola lanuginosa*) 리파제; 유리 비드 지지체)]에서 확인할 수 있다. 흡착에 의한 부동화에 적합한 지지체는 예를 들면 세라믹 비드, 예컨대 토요나이트(Toyonite)(Toyo Denka Kogyo Co., Ltd.)를 포함한다.

[0073] 이온 결합은 예컨대 고체 지지체 상의 DEAE-셀룰로스 또는 DEAE-세파덱스(Sephadex) 등과 같은 매트릭스들 상의 리파제 및 상이하게 하전된 이온성 기들 사이의 정전기 상호작용들에 기초한다. 이온 결합은 리파제의 형태에 최소한의 변화를 발생시키고 대부분의 경우에 고활성을 갖는 부동화 리파제를 생성시킨다. 그러나, 효소와 지지체 사이의 결합력이 흡착을 사용할 때보다 강하더라도, 이것이 공유 결합만큼 강하지 않으므로 지지체로부터의 리파제의 누출이 발생할 수 있다는 것을 유의해야 한다.

[0074] 공유 결합은 리파제의 표면 상의 아미노산 상의 작용기와 지지체 재료 사이의 공유 결합들에 기초한다. 지지체에 대한 효소의 이 결합에서 발생할 수 있는 작용기는 리파제의 촉매 활성에 필수적이지 않은 아미노, 카복실, 설프하이드릴, 하이드록실, 이미다졸 또는 페놀성 기들일 수 있다. 활성 자리를 보호하기 위해, 기질 또는 경쟁적 억제제의 존재 하에 부동화를 수행할 수 있다. 지지체 재료에 대한 리파제의 공유 결합을 이용하는 것에 대한 상당한 이점은 결합 강도, 즉 부동화의 안정성이다. 공유 결합에 의한 리파제 부동화의 예를 위해, 문헌[S. Emi 등, *European Polymer Journal* 30(5):589-595 (1994)]을 참조한다. 공유 결합에 적합한 지지체는 예를 들면 ImmobeadTM ChiralVision)]를 포함한다.

[0075] 가교 결합은 리파제를 그 자체에 결합시켜 3차원 구조를 형성하거나 가교결합제를 사용하여 리파제를 고체 구조에 결합시키는 것을 포함한다. 예를 들면, 리파제는 키토산 비드에 가교결합될 수 있다. 문헌[S.H. Chiou 등, *Prep. Biochem. Biotechnol.* 37(3):265-275 (2007)]을 참조한다. 캡슐화에 의한 리파제의 부동화는 일반적으로 리파제 주위의 다공성 코팅 또는 반투과성 막의 형성을 포함하여, 리파제는 다공성 재료 내부에 포함되지만, 트리글리세라이드 및 에스터는 자유롭게 통과할 수 있다. 포획에 의한 리파제의 부동화는 이를 격자 구조에 포획하여 효소의 이동을 제한하는 것을 포함한다. 알기네이트 비드는 이 유형의 부동화에 사용될 수 있다. I. Bushan 등, *J. Bioactive and Compatible Polymers* 23(6):552-562 (2008). 합성 및 천연 중합체를 또한 사용할 수 있다. 또한, 문헌[G. Fernandez-Lorente 등, *J. Am. Oil Chem. Soc.* (published online 14 December 2010) and G. Fernandez-Lorente 등, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88:1173-1178 (2011)]을 참조한다.

[0076] 특정한 실시양태들에서, 본 발명의 제제들, 방법들, 및 디바이스는 부동화의 다른 형태, 예컨대 캡슐화에 의해 또는 이것 없이 미국 특허 6,541,606(Margolin)에 기재된 바와 같이 안정성 증가를 위해 결정화되고 가교결합되는 리파제를 사용할 것이다.

[0077] 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 자기 나노입자들(MNP들)에 부동화된다. 이들 MNP는 리파제들이 반응하는 아미노 또는 에폭시 작용기를 포함하는 링커들 또는 중합체들에 의해 코팅될 수 있다. MNP들에 대한 적합한 하나의 코팅은 예를 들면 폴리도파민이다. 예를 들면, 문헌[Y. Ren 등, *BMC Biotechnology* 11:63 (2011)]을 참조한다. 리파제 부동화에 대한 MNP들의 사용은 생체적합성, 초상자성, 작은 크기 및 낮은 독성과 같은 이점을 갖는다. 나노입자들의 자기 특성은 용액으로부터 리파제의 제거를 수월하게 하고 또한 MNP-리파제를 고체 지지체에 부착하기 위한 다른 수단을 제공한다.

[0078] 몇몇 실시양태들에서, 부동화 리파제는 미생물 리파제이다. 몇몇 실시양태들에서, 부동화 리파제는 박테리아 리파제들로부터 선택된다. 몇몇 실시양태들에서, 부동화 리파제는 크로모박테리움 비스코숨, 슈도모나스 플루오레센스, 부르콜데리아 세파시아, 및 리조푸스 오리자로부터 선택되는 하나 이상의 리파제들이다.

[0079] 특정한 실시양태들에서, 리파제(부동화되던 또는 아니던)를 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30분 이상 동안 제제에 첨가한다. LC-PUFA 트리글리세라이드 및 에스터들의 가수분해를 RP-HPLC에 의해 측정한다. 특정한 실시양태들에서, LC-PUFA 트리글리세라이드 및 에스터들의 가수분해(%)는 30분에 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%이다. 실시양태들에서, LC-PUFA 트리글리세라이드 및 에스터들의 가수분해(%)는 20분에 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%이다. 실시양태들에서, LC-PUFA 트리글리세라이드 및 에스터들의 가수분해(%)는 10분에 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%이다. 특정한 실시양태들에서, 리파제는 리조푸스 오리자에 리파제이다.

[0080] 부동화 리파제를 포함하는 디바이스들

[0081] 다양한 실시양태들에 따라, 본 개시내용은 영양학적 생성물을 제조하기 위한 디바이스들 및 방법을 제공한다.

디바이스들 및 방법은 소모 전에 유아용 제제 또는 다른 영양학적 생성물을 리파제들에 노출시키기 위해 사용될 수 있다. 리파제는 따라서 지방들 및 오일을 분해하고 후속하여 유리 지방산 및 모노글리세라이드를 방출시킨다. 디바이스들 및 방법은 제제 또는 다른 영양학적 생성물을 제조하기 위한 편리한 수단을 허용한다. 몇몇 실시양태들에서, 디바이스들 및 방법은 유아들 또는 생성물을 소비하는 다른 사람들이 외인성 리파제를 소모하는 것을 방지하도록 한다. 몇몇 실시양태들에서, 디바이스들 및 방법은 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산을 포함하지만 (ELISA에 의해 정해지는 바와 같이) 임의의 상당한 양의 리파제를 포함하지 않는 제제의 제조를 허용한다.

[0082] 도 1, 도 2a-2c, 도 3a-3c, 도 4a-4b, 도 5a-5b, 도 9a-9c, 도 10a-10c, 도 11a-11c, 도 12, 도 13a-13b, 도 14, 도 15, 도 16, 도 17a-17b, 도 18, 도 19, 도 20 및 도 21은 본 개시내용의 다양한 실시양태들에 따른 디바이스를 예시한다. 도 1에 도시된 바와 같이, 본 개시내용의 디바이스들(100)은 유아용 제제(120) 또는 다른 액체 영양학적 생성물을 보유하도록 구성된 용기(110)를 포함할 수 있다. 하기 상세히 기재된 것처럼, 비위관(114) 또는 다른 공급 기전(예를 들면, 베이비 병)을 통해 유아에 공급된 제제(120)가 임의의 상당한 양의 리파제를 포함하지 않도록 용기(110)는 부동화된 리파제를 포함할 수 있다. 예를 들면, 리파제는 벽을 따라 또는 달리 용기 내에 발견되는 구조들(150) 상에 또는 그 내부에 부동화될 수 있어서, 리파제는 용기 내의 제제(120)와 유체 접촉한다. 추가로, 하기 다양한 실시양태를 참조하여 기재된 것처럼, 용기(110) 내의 리파제들의 효소 처리를 허용하는 다양한 방식으로 제제를 용기(110)에 첨가할 수 있다. 예를 들면, 유체는 관(112)을 통해 공급되거나 용기에 부어질 수 있고, 이후 후속하여 비위관 또는 다른 공급용 디바이스를 통과할 수 있다.

[0083] 본 개시내용에 전체에 걸쳐, 디바이스들 및 방법은 영양학적 제제, 예컨대 유아용 제제 및 의학 영양학적 제제 등을 제조하거나 치료하기 위한 용도로 언급될 것이다. 디바이스들 및 방법은 소모 전에 리파제 치료를 제공하는 데 유리할 수 있는 임의의 유형의 영양학적 제제를 제조하거나 치료하기 위해 사용될 수 있는 것으로 이해된다. 이러한 생성물은 체장 부전증을 갖거나 장쇄 트리글리세라이드 또는 에스터화 장쇄 PUFA를 가수분해하는 다른 능력이러한 감소된 사람에 의해 소모될 임의의 영양학적 제제를 포함할 수 있다.

[0084] 도 2a-2c 및 도 3a-3c는 다양한 실시양태들에 따라 더 상세한 디바이스를 예시한다. 도시된 바와 같이, 디바이스들(200-202, 300-302)은 액체 제제를 보유하기 위한 용기(210, 310)를 포함할 수 있다. 용기(210, 310)는 다양한 상이한 유형 및 입체구성을 포함할 수 있다. 예를 들면, 용기(210, 310)는 유리 또는 플라스틱 병(jar) 또는 바이알, 백(예를 들면, 실리콘 또는 IV 식염수 백과 같은 다른 가요성 재료), 원통형 용기, 예컨대 주사기 배럴, 또는 원하는 양의 제제 또는 다른 생성물을 보유하도록 크기화되고 성형된 다른 용기를 포함할 수 있다.

[0085] 기재된 바와 같이, 본 개시내용의 디바이스는 원하는 효소 효과를 얻기 위해 제제가 리파제들에 노출되도록 할 수 있는 한편, 제제가 이후 리파제를 소모함이 없이 편리하게 소모되게 할 수 있다. 따라서, 다양한 실시양태들에서, 리파제는 용기(210, 310) 내에 부동화되어, (예를 들면, 비위관, 베이비 병을 위한 니플을 통해, 또는 다른 용기에 제제를 이동시킴으로써) 제제가 제거될 때, 리파제는 용기(210, 310)에 잔류하거나, 소모 전에 제제로부터 제거될 수 있다. 다른 실시양태들에서, 리파제는 예를 들면 제거형 고체 지지체들에서 용기(210, 310) 내에 부동화되어, 리파제는 용기로부터 쉽게 제거될 수 있는 한편, 이후의 소모를 위해 용기에 제제를 남긴다.

[0086] 도 2a-2c는 용기(210) 내에 리파제를 부동화하기 위한 특정한 실시양태들과 함께 용기(210)에 대한 일 구성을 나타낸다. 기재된 바와 같이, 용기(210)는 다양한 상이한 재료들, 크기들 및 형상을 포함할 수 있다. 또한, 용기(210)는 제제(260)의 용기 내외로의 흐름을 제어하기 위한 하나 이상의 접근 포트들(220, 230)을 포함할 수 있다.

[0087] 리파제는 다양한 방식으로 용기(210) 내에 부동화될 수 있다. 예를 들면, 리파제는 용기 210(도 2a 및 2c) 내부에 위치한 구조들(250, 252) 내에 부동화되거나 포함될 수 있다. 추가로, 또는 대안적으로, 리파제들(251)은 용기(210)의 벽에 부동화되거나 벽 내에 포함될 수 있다(도 2b). 따라서, 제제(260)가 용기 내부에 위치할 때, 제제(260)는 리파제들과 접촉하여 원하는 효소 효과를 생성한다.

[0088] 기재된 바와 같이, 리파제는 용기 내의 구조들(250, 252)에 및/또는 용기의 벽들(251)에 리파제를 결합시킴으로써 용기 내에 부동화될 수 있다. 용기 내의 구조는 다양한 구성을 가질 수 있다. 예를 들면, 특정한 실시양태들에서, 구조는 비드, 볼들, 또는 구조들이 제제 내에 흐르도록 이들 자체가 용기 내에 이동 가능하게 할 수 있는 임의의 다른 구조를 포함할 수 있다. 예를 들면, 도 4a에 도시된 바와 같이, 구조들(250)은 리파제들(257)이 결합될 수 있는 표면 벽(256)을 갖는 비드 또는 볼을 포함할 수 있다. 추가로, 구조들(250, 252)이 다양한 상이한 형상들 또는 구성들(예를 들면, 장병형, 타원형, 봉형)을 가질 수 있는 것으로 이해된다.

- [0089] 용기(210)의 벽의 구성 및/또는 구조들(250, 252)은 원하는 표면적을 제공하도록 구성될 수 있어서, 제제는 허용되는 시간 기간 동안 충분한 양의 리파제와 접촉할 수 있다. 예를 들면, 구조들(250, 252)은 많은 비드(250)(도 2a) 또는 봉형 구조들(252)(도 2c)을 포함하여 충분한 양의 리파제를 결합시키기 위한 고표면적을 제공할 수 있다. 대안적으로, 제제를 소모 전에 리파제들과 향온처리하는 데 더 긴 시간 기간이 이용 가능하고/하거나 고 효소 활성을 갖는 리파제를 사용하는 경우, 더 적은 양의 리파제가 적합할 수 있다.
- [0090] 다양한 실시양태들에서, 제제(260)가 소모 또는 저장을 위해 용기로부터 제거될 때, 리파제가 제제(260) 내에 유지되지 않도록 구조들(250, 252) 및/또는 용기가 구성된다. 예를 들면, 비교적 작은 접근 포트(230)를 통해 통과하지 않도록 비드(250) 또는 봉형 구조들이 크기화될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 구조는 용기 벽에 부착되고/되거나 용기는 제제(260)를 갖는 구조들의 이동을 막도록 크기화된 스크린 또는 필터를 포함할 수 있다. 추가로, 구조들(250, 252)은 제제로부터 이의 분리를 수월하게 하는 다른 특성을 가질 수 있다. 예를 들면, 구조들(250)은 자기 필터에 결합함으로써 제거될 수 있는 자기 비드로 형성될 수 있다.
- [0091] 몇몇 실시양태들에서, 용기(210) 및/또는 용기 벽 내의 구조들에 대한 부착에 의해 리파제를 부동화하기보다는, 리파제들(257')은 구조들(250, 252) 및/또는 용기 벽(251) 내에 포함된다. 도 4b는 이러한 일 실시양태를 예시한다. 도시된 바와 같이, 구조(250')는 벽(256')을 갖는 비드 또는 다른 형상을 포함할 수 있다. 벽은 리파제들(257')이 아닌 제제(260)의 유입 및 유출을 허용하는 반투과성 재료들로 형성될 수 있다. 이러한 캡슐화는 다른 구조들(예를 들면, 252) 및/또는 용기 벽에 대해 유사하게 사용될 수 있어서, 벽의 표면은 리파제들이 포함될 수 있는 반투과성 재료를 갖는다.
- [0092] 용기는 유사하게 증가한 양의 리파제 및/또는 리파제의 제제(260)와의 접촉 증가를 제공하는 표면 구성을 가질 수 있다. 예를 들면, 용기의 벽은 용기부(ridge)들 또는 표면적을 증가시키는 다른 표면 변형예들을 가질 수 있다. 추가로, 단일 개방 공간을 포함하기보다는, 용기는 예를 들면 리파제들에 대한 연장된 또는 더 긴 노출을 허용하는 긴 구불구불한 경로 및/또는 리파제들이 부동화되고 제제가 흐를 수 있는 채널들 또는 관들의 집합과 같은 흐름 경로의 변형들을 포함할 수 있다. 예를 들면, 도 1, 부재 150 및 도 21, 부재 2101을 참조한다.
- [0093] 특정한 실시양태들에서, 용기는 본 명세서에 기재된 임의의 실시양태들에서 리파제들로 제조되고 예비 패키징될 수 있다. 사용 동안, 용기는 개방될 수 있고, 제제는 원하는 효소 효과를 생성하기 위해 충분한 시간 동안 리파제들과 접촉하도록 용기 내에 위치할 수 있다. 다른 실시양태들에서, 구조들, 예컨대 비드(250) 또는 봉형 구조는 그 표면들에 부동화되거나 내부에 수용/캡슐화된 리파제를 가지며 패키징되고 유통될 수 있고, 이들 구조는 제제를 포함하는 별개의 용기 내에 위치할 수 있다. 몇몇 실시양태들에서, 일정 기간 동안 부동화 리파제 및 제제를 포함하는 용기를 흔들거나 교반하는 것이 유리할 수 있다.
- [0094] 기재된 바와 같이, 제제(260)는 다양한 접근 포트를 통해 용기(210)에 위치할 수 있다. 예를 들면, 용기는 상부 접근 포트(220) 및/또는 바닥 접근 포트(230)를 포함할 수 있다. 포트들(220, 230)은 각각 제제의 유입 및 출입에 사용될 수 있다. 또한, 단일 포트가 사용될 수 있거나, 다중 포트들이 사용될 수 있다. 포트는 유체를 공급하거나 수송하는 데 사용될 수 있는 다른 디바이스를 체결하도록 구성된 구조를 포함할 수 있다. 예를 들면, 포트는 연결기, 예컨대 루어락(luer-lock) 연결, 트레드(thread) 및/또는 도관 또는 비워관을 체결할 수 있는 관을 포함할 수 있다. 또한, 포트는 베이비 병, 베이비 병 니플, 또는 다른 용기로의 유체의 수송을 수월하게 하거나 공급을 보조하는 임의의 다른 구조를 체결하도록 구성될 수 있다. 추가로, 포트들(220, 230) 1개 또는 둘 또는 밸브(140)(도 1), 밸브(240)(도 2a) 또는 다른 유체 흐름 대조 기전을 포함할 수 있다.
- [0095] 도 3a-3c는 특정한 실시양태들에 따라 본 개시내용의 디바이스를 예시한다. 도시된 바와 같이, 디바이스들(300-302)은 제제(260)를 수용하기 위한 용기(310)를 포함한다. 또한, 용기(310)는 캡(322) 또는 다른 밀폐 디바이스, 예컨대 단지(jar) 또는 병을 위한 트레드된 마개를 포함할 수 있다. 도 2a-2c에 도시된 실시양태들과 유사하게, 디바이스는 이의 표면들에 부동화되고/되거나 이 내에 캡슐화된 리파제를 포함하는 구조들(350, 351, 351' 및 353)을 포함할 수 있다.
- [0096] 도 3a-3c의 실시양태는 리파제를 포함하는 구조들로부터 제제의 더 신속한 분리를 제공할 수 있다. 예를 들면, 도 3a에 도시된 바와 같이, 봉형 구조들(350)은 리파제를 포함할 수 있고, 제제의 효소 처리 후, 구조들(350) 및 리파제를 동시에 제거하기 위해 캡(322)이 제거될 수 있다. 추가로, 캡(322)은 다른 캡, 병 니플 또는 다른 유체 연결로 대체될 수 있다. 유사하게, 볼들 또는 비드들(351, 351')(도 3b)과 같은 다른 구성을 갖는 구조는 제제(260)로부터의 용이한 제거를 위해 크기가 정해질 수 있다. 예를 들면, 도시된 바와 같이, 비드(351, 351')은 수동으로 또는 여과에 의해 쉽게 제거될 수 있도록 크기가 정해진다. 추가로, 용기(310)는 그 내면(353)에 부동화되거나 그 내부에 포함된 리파제를 제공할 수 있고, 효소 처리 후, 제제(260)는 다른 용기로 수송되거나

나, 캡(322)을 병 니플 또는 공급 시스템에 대한 다른 연결로 대체함으로써 소모될 수 있다.

- [0097] 대안적으로, 또는 추가로, 구조들(350, 351, 351')은 그 내부에 포함된 부동화 리파제를 제공하는 추가의 부품을 갖는 투과성 외부 벽을 가질 수 있다. 예를 들면, 구조(351')(도 3b)는 구조(351')가 많은 비드(250)을 밀폐하는 투과성 외부 벽을 갖는 일 실시양태를 예시한다. 외부 벽은 비드(250)와의 접촉을 제공하기 위해 구조(351') 내외로의 제제의 용이한 이동을 허용하는 메쉬 또는 다른 구성을 포함할 수 있다. 추가로, 비드는 상기 다양한 실시양태들에서 기재된 바와 같이 그 표면들에 부동화되거나 그 내부에 캡슐화될 수 있는 리파제를 제공할 수 있다.
- [0098] 상기 기재된 바와 같이, 리파제를 포함하는 구조는 용기(310)와 함께 예비패키징된 성분들로서 제조되고 유통될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 구조는 용기로부터 별개로 패키징되고 유통될 수 있다. 예를 들면, 봉형 구조들(350) 또는 비드(351, 351')를 포함하거나 그렇지 않으면 내부에 포함되거나 부동화된 리파제를 갖는 캡(322)이 제조되고 유통될 수 있다. 캡은 표준 베이비 병들, 물병, 또는 제제를 포함할 수 있는 다른 용기 또는 디바이스와의 연결을 위해 구성될 수 있다.
- [0099] 다른 실시양태들에서, 제제가 용기 내로 위치할 때 및/또는 용기로부터의 공급 또는 제거 중에 리파제들이 제제와 접촉하도록 리파제가 제공될 수 있다. 예를 들면, 도 5a는 예시적인 실시양태들에 따라 일 디바이스(500)를 예시한다. 디바이스(500)는 표준 병 니플을 포함할 수 있고, 리파제는 니플 림 또는 니플 그 자체의 내면(510)에 부동화될 수 있다. 이와 같이, 제제는 정상 사용 중에 리파제들과 접촉한다. 유사하게, 리파제는 비워 공급 디바이스의 유체 관과 같이, 공급에 사용될 수 있는 다른 구조들 내에 또는 이 위에 포함될 수 있다.
- [0100] 대안적으로, 리파제는 정상 유체 흐름 동안 제제와 리파제들과의 접촉을 허용하도록 구성된 별개의 부재에 제공될 수 있다. 예를 들면, 일 실시양태에서, 리파제는 병 마개, 예컨대 니플(도 5a) 또는 병 캡/마개(도 5b)와의 체결을 위해 구성된 하우징(520) 내에 포함될 수 있다. 하우징(520)은 제제가 하우징의 용적을 관통하여 흐르고 이 내부에 제공된 리파제들과 접촉하는 투과성 벽을 포함할 수 있다.
- [0101] 하우징(520) 내에 포함된 리파제는 다양한 형태들로 제공될 수 있다. 예를 들면, 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 상기 기재된 바와 같이 접합 또는 캡슐화에 의해 하우징(520) 내의 비드(550) 상에 부동화된다. 추가로, 하우징(520)은 개방 메쉬 또는 제제가 흐르게 하는 다른 구성을 포함할 수 있다. 예를 들면, 도 5a에 도시된 병 구성으로, 개방 메쉬 또는 하우징(520)을 통한 흐름 경로는 제제가 공급 중 병을 빠져나오면서 제제가 리파제들과 접촉하게 한다. 대안적으로, 도 5b에 도시된 바와 같이, 제제는 용기(310)의 충전 또는 비움 동안 제제와 리파제들과의 접촉을 허용하도록 하우징의 상부(530) 내외로 부어질 수 있다. 하우징(520)의 상부(530) 및/또는 임의의 다른 부분은 다양한 재료들로부터 형성될 수 있다. 예를 들면, 하우징(520)은 제어된 유체 흐름을 허용하는 막으로 형성될 수 있다. 추가로, 상부(530)는 액체(제제)가 흐르도록 하지만, 리파제들이 통과하지 못하게 하는 반투과성 막으로 형성될 수 있다. 따라서, 상부(530)를 형성하는 막은 용기(310) 내의 리파제를 달리 결합시키거나 부동화함이 없이 용기(310) 내의 리파제를 부동화하도록 작용할 수 있다.
- [0102] 다양한 실시양태들에서, 상기 기재된 디바이스는 리파제 활성을 개선하거나 그렇지 않으면 제어하도록 변형들을 포함할 수 있다. 예를 들면, 용기들(110, 210, 310)은 항온처리 기간 동안 제제의 연속 이동을 허용하여, 리파제들이 유체 용적 전체에 걸쳐 발견되는 지방산과 접촉하게 하는 교반 시스템을 포함할 수 있다. 추가로, 디바이스는 리파제 활성을 개선하거나 제어하도록 온도 대조 시스템을 포함할 수 있다.
- [0103] 본 발명의 특정한 실시양태는 영양학적 제제 및 리파제를 포함하는 용기를 제공한다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 용기에서 영양학적 제제와 접촉한다. 다른 실시양태들에서, 리파제 및 영양학적 제제는 용기와 접촉하지 않는다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제 및 리파제는 용기 내의 별개의 구획들에 포함된다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 건조 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 액체 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제를 영양학적 제제를 포함하는 구획으로 방출시킴으로써 리파제는 영양학적 제제와 접촉한다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제 및 영양학적 제제를 (예를 들면, 리파제 구획 및 영양학적 제제 구획을 다른 용기로 비움으로써) 다른 용기 내로 이동시킴으로써 리파제는 영양학적 제제와 접촉한다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제 및 영양학적 제제를 다른 용기 내로 이동시키기 전에 또는 후에 액체를 다른 용기에 첨가한다.
- [0104] 본 개시내용에 따른 디바이스는 다수의 상이한 형상들 및/또는 구성을 가질 수 있다. 예를 들면, 도 9a-9c, 도 10a-10c, 도 11a-11c, 도 12, 도 13a-13b, 도 14, 도 15, 도 16, 도 17a-17b, 도 18, 도 19, 도 20, 도 21은 다양한 추가의 형상들 및 구성을 예시한다. 이들 도면들과 관련하여 기재된 각각의 구성들에서, 리파제는 (예를 들면, 디바이스 내에 구조들 예컨대 비드에 리파제를 부동화함으로써 및/또는 디바이스의 벽 또는 다른 표면 내

에 또는 이 위에 리파제를 부동화함으로써) 상기 기재된 방법들 중 임의의 것을 이용하여 부동화될 수 있다. 추가로, 특별한 구성이 표면적, 용적, 리파제들의 양 및/또는 효소들에 대한 재료들의 노출 시간과 같은 다양한 상이한 특징을 제공하도록 선택될 수 있다.

- [0105] 도 9a-9c, 도 10a-10c, 도 11a-11c, 도 12, 도 13a-13b, 도 14, 도 15, 도 16, 도 17a-17b, 도 18, 도 19, 도 20, 도 21에 예시된 디바이스는 다양한 방식으로 리파제들의 접촉을 허용하도록 구성될 수 있다. 예를 들면, 다양한 실시양태들에서, 디바이스의 일부 또는 전부는 제제를 포함하는 용기 내에 삽입되어 제제와 리파제들 사이의 접촉을 허용할 수 있다. 다른 실시양태들에서, 디바이스는 제제의 인라인(in-line) 처리를 위해 구성된다.
- [0106] 도 9a-9c는 제제를 처리하기 위해 용기 내에 위치할 수 있는 디바이스들에 대한 다양한 구성을 예시한다. 도시된 바와 같이, 디바이스(900, 920)(도 9a 및 9c)는 리파제를 밀폐하는 외부 벽(901, 901')으로 형성된 다양한 상이한 형상을 가질 수 있다. 상기 기재된 바와 같이, 리파제들(902)은 비드로의 부착을 포함하는 다양한 상이한 방식으로 부동화될 수 있다. 더욱이, 디바이스들(910)(도 9b)은 하나 이상의 벽들(901')에서 형성된 1 개 초과 포켓 또는 개구(903)를 포함할 수 있다. 특정 구성, 포켓들 또는 개구들의 수, 및 리파제의 양 및/또는 디바이스의 용적은 의도되는 용도에 따라 및/또는 리파제 활성 속도를 제어하기 위해 변할 수 있다.
- [0107] 특정한 실시양태들에서, 디바이스는 그 크기 및 또는 형상의 변화를 허용하도록 구성될 수 있다. 예를 들면, 도 10a-10c는 사용 전에 예를 들면 용기(1001)에서의 저장을 위해 압축될 수 있는 디바이스(1000)를 예시한다. 원할 때, 용기(1001)는 개방될 수 있고, 디바이스의 벽(1003)은 용기 용적에 대한 리파제 용적(1002)의 원하는 비를 생성하도록 팽창될 수 있다. 몇몇 실시양태들에서, 디바이스(1000)는 구조 지지체를 제공하고/하거나 디바이스가 원하는 형상 및/또는 용적을 유지하도록 돕는 코일 또는 스프링(1004)을 포함한다.
- [0108] 몇몇 실시양태들에서, 디바이스는 제제의 용적 내에 리파제의 배치 및 제거를 수월하게 하는 봉형 연장부를 포함할 수 있다. 예를 들면, 도 11a-11c, 도 12, 도 13a-13b, 도 14, 및 도 15는 봉형 연장부를 갖는 디바이스들에 대한 다양한 예시적인 구성을 예시한다. 도시된 바와 같이, 디바이스(1100, 1100', 1100", 1200, 1300, 1400, 1500)는 봉형 연장부(1102, 1202, 1302, 1402, 1502)의 원위 구역 근처의 다양한 구성들에 위치한 하나 또는 다수의 포켓들 또는 개구들(1101, 1201, 1301, 1401, 1501)을 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태들에서, 도시된 바와 같이 예를 들면, 도 13a-13b에서, 포켓들 또는 개구들(1301)의 배열은 예를 들면 사용 동안 좁은 개구 내의 삽입을 허용하도록 및/또는 저장 공간을 최소화하기 위해 조정 가능할 수 있다.
- [0109] 다양한 실시양태들에서, 리파제는 병 또는 단지의 캡 또는 마개의 부분에 부착될 수 있어서, 캡 또는 마개가 병 또는 단지에 위치할 때, 리파제는 병 또는 단지 내에 포함된 유체들과 접촉할 수 있다. 예를 들면, 본 명세서에 도시된 임의의 디바이스는 병 또는 단지 내의 제제 용기와 접촉하도록 하는 캡 또는 마개의 표면에 부착될 수 있다. 캡 또는 마개(1602, 1702, 1802, 1902, 2002)에 부착된 리파제를 포함하는 디바이스들(1600, 1700, 1800, 1900, 2000)의 다양한 구성들이 도 16, 도 17a-17b, 도 18, 도 19, 및 도 20에 예시되어 있다. 도시된 바와 같이, 리파제는 다양한 형상들 또는 구성을 갖는 포켓들 또는 개구들(1601, 1705, 1805, 1901, 2001) 내에 포함될 수 있다. 추가로, 몇몇 실시양태들에서, 캡 또는 마개(1902, 2002)는 용기로부터 유체를 삽입하거나 제거하기 위한 개구(1910, 2010)를 포함할 수 있고, 이러한 개구들(1910, 2010)은 유체 관을 위한 연결기, 예를 들면, 루어형 연결기를 포함할 수 있다.
- [0110] 몇몇 실시양태들에서, (예를 들면, 도 1에 도시된 바와 같이 공급 중에 또는 하나의 용기로부터 다른 용기로의 이동 중에) 제제가 관을 통해 흐르면서 제제를 처리하는 것이 바람직할 수 있다. 도 21은 리파제들의 인라인 처리를 위한 다른 디바이스(2100)를 예시한다. 디바이스(2100)는 상기 기재된 바와 같이 부동화될 수 있는 리파제를 포함하는 포켓 또는 개구(2101)를 포함할 수 있다. 추가로, 포켓 또는 개구(2101)는 리파제들과 제제 사이의 더 긴 접촉 시간을 허용하는 구불구불한 또는 곡선의 경로를 가질 수 있다. 또한, 디바이스(2100)는 제제의 유입 및 출입을 위한 관들 또는 도관들에 대한 연결을 허용하는 양단에서 개구들(2110)을 포함할 수 있다.
- [0111] 다양한 실시양태들에서, 디바이스는 환자에 의해 섭취될 제제에 리파제들이 진입하는 것을 방지하기 위해 스크린 또는 메쉬로서 작용하는 재료를 포함할 수 있다. 예를 들면, 도 19 및 도 21에 도시된 디바이스는 비드 또는 다른 구조들 상에 부동화된 리파제들이 섭취될 제제로 이동하는 것을 방지하는 하나 이상의 메쉬들 또는 스크린들(1906, 2106)을 포함할 수 있다.
- [0112] 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 용기의 부품 내에 또는 이 위에 부동화될 수 있어서, 추가의 단계들이 취해질 때까지 리파제는 제제와 접촉하지 않는다. 예를 들면, 일 실시양태에서, 리파제는 캡 또는 마개의 부분 내에 또는 이 위에 포함될 수 있고, 캡 또는 마개는 용기 내로 부동화 리파제를 방출하기 위한 기전을 포함할 수 있다.

예를 들면, 리파제는, 추가적으로 캡에 부착되거나 캡 내에 포함되는 비드 또는 다른 구조들(예를 들면, 도 18에서 부재(1805) 참조)에 또는 그 내부에 포함될 수 있고; 원할 때, 리파제는 (예를 들면, 캡을 비틀거나 장벽/부착 기전을 제거함으로써) 용기 내로 낙하할 수 있다. 유사하게, 리파제는 용기 또는 다른 구조의 벽에 부착되거나 이와 포함되고 비드 또는 다른 재료들 상에 부동화될 수 있고, 리파제는 (예를 들면, 리파제를 용기로 방출하거나 리파제들에 대해 장벽을 제거함으로써) 원할 때에만 제제와 접촉하도록 허용될 수 있다.

[0113] 도 6a는 중합체 비드에 부동화된 리조푸스 오리자에 리파제를 포함하는 바이알의 사진이다. 부동화 리파제는, 도 6b-d에 도시된 디바이스와 같이, 본 발명에 따른 디바이스의 용기 또는 챔버에 첨가될 수 있는 건조 과립 형태이다. 부동화 리파제는 디바이스의 챔버에 포획되는 한편, 제제가 흐르지만 챔버 내에 부동화 리파제를 보유하기에 충분히 큰 기공을 포함하는 챔버의 유출 말단에서 단순히 필터를 제공함으로써 챔버를 통해 그리고 챔버 밖으로의 제제의 유동을 여전히 허용한다. 대안적으로, 리파제는, 제제가 챔버를 통과하는 동안 리파제에 노출되도록, 예를 들면 디바이스의 내부 채널들 또는 챔버를 코팅함으로써 부동화될 수 있다. 이러한 디바이스에서의 부동화 리파제는 안정성 증가 및 리파제의 재사용성으로 인해 장기간 연속 공급에 사용될 수 있다.

[0114] 영양학적 제제들

[0115] 본 발명의 특정한 실시양태는 영양학적 제제를 제공한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 유아용 제제이다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 의학 영양학적 제제이다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 섭취 전에 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 이 노출은 영양학적 제제에서 적어도 일부 지질들의 예비 가수분해를 허용한다. 따라서, 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 "공급받은 대로의" 제제, 즉 제조업자가 판매하는 제제와 조성이 다른 피험체에 의한 섭취 전에만 구성되는 액체 제제이다. 용어 "영양학적 제제"는 섭취 후 피험체의 체내에 존재하는 조성물을 포함하지 않는다.

[0116] 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 장쇄 지방산을 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 하나 이상의 LC-PUFA, 예컨대 DHA, ARA 및 EPA를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 DHA를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 ARA를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 DHA 및 ARA를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 DHA, ARA 및 EPA를 포함한다.

[0117] 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제 중의 전체 장쇄 지방산 중 5% 초과가 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산의 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA 중 5% 초과가 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, DHA 중 5% 초과가 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, ARA 중 5% 초과가 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, EPA 중 5% 초과가 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다.

[0118] 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제 중의 전체 장쇄 지방산 중 10% 초과, 15% 초과, 20% 초과, 30% 초과, 40% 초과, 50% 초과, 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 100%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA 중 10% 초과, 15% 초과, 20% 초과, 30% 초과, 40% 초과, 50% 초과, 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 100%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, DHA 중 10% 초과, 15% 초과, 20% 초과, 30% 초과, 40% 초과, 50% 초과, 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 100%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, ARA 중 10% 초과, 15% 초과, 20% 초과, 30% 초과, 40% 초과, 50% 초과, 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 100%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, EPA 중 10% 초과, 15% 초과, 20% 초과, 30% 초과, 40% 초과, 50% 초과, 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 100%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, DHA 및 ARA 둘 다 중 10% 초과, 15% 초과, 20% 초과, 30% 초과, 40% 초과, 50% 초과, 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 100%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 구체적인 실시양태에서, DHA 및 ARA 둘 다 중 90% 초과는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 구체적인 실시양태에서, DHA 및 ARA 둘 다 중 95% 초과는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다.

[0119] 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제 중의 전체 장쇄 지방산 중 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA 중 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다.

태이다. 몇몇 실시양태들에서, DHA 중 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, ARA 중 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, EPA 중 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, DHA 및 ARA 둘 다 중 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 구체적인 실시양태에서, DHA 및 ARA 둘 다 중 적어도 90%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 구체적인 실시양태에서, DHA 및 ARA 둘 다 중 적어도 95%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다.

[0120] 본 발명의 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 영양학적 제제의 대략적인 제공량은 조식아용 제제의 경우 약 100-110ml, 만삭아용 제제의 경우 90-150ml(예를 들면, 148ml), 장내 영양의 경우 230-500ml(예를 들면, 235-250ml), 및 소아용 제제 및 성인용 제제들의 경우 230-250ml이다. 몇몇 실시양태들에서, 각각의 제공은 (현재 구입 가능한 조산아 및 만삭아용 제제들에서 TG-ARA의 완전 가수분해로부터 얻어지는 바와 같이) 약 10-35mg의 ARA 유리 지방산 및 모노글리세라이드 또는 (현재 구입 가능한 성인용 제제에서 TG-ARA의 완전 가수분해로부터 얻어지는 바와 같이) 약 40-50mg의 ARA 유리 지방산 및 모노글리세라이드를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 각각의 제공은 (현재 구입 가능한 조산아 및 만삭아용 제제들에서 TG-DHA의 완전 가수분해로부터 얻어지는 바와 같이) 약 7-20mg의 DHA 유리 지방산 및 모노글리세라이드 또는 (현재 구입 가능한 소아용 및 성인용 제제에서 TG-DHA의 완전 가수분해로부터 얻어지는 바와 같이) 약 10-40mg의 DHA 유리 지방산 및 모노글리세라이드를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 230-250ml의 성인 제공은 (현재 구입 가능한 몇몇 성인용 제제, 예컨대 ProSure®에서 TG-EPA 및 TG-DHA의 완전 가수분해로부터 얻어지는 바와 같이) 약 1,100mg의 EPA 유리 지방산 및 모노글리세라이드 및 약 240mg의 DHA 유리 지방산 및 모노글리세라이드를 포함한다. 그러나, 본 발명의 몇몇 실시양태들에서, 섭취 전에 TG-LC-PUFA를 예비 가수분해하는 능력은 현재 구입 가능한 제제들에서보다 더 높은 수치의 LC-PUFA로 제제가 제조되게 한다. 따라서, 몇몇 실시양태들에서, ARA 및/또는 DHA의 유리 지방산 및/또는 모노글리세라이드의 양은 현재 구입 가능한 제제들에서 TG-LC-PUFA의 완전 가수분해로부터 얻은 양보다 많다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 영양학적 제제의 제공은 50-100mg의 LC-PUFA 유리 지방산 및/또는 모노글리세라이드를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 영양학적 제제의 제공은 100-200mg의 LC-PUFA 유리 지방산 및/또는 모노글리세라이드를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 영양학적 제제의 제공은 200-300mg의 LC-PUFA 유리 지방산 및/또는 모노글리세라이드를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 영양학적 제제의 제공은 250-500mg의 LC-PUFA 유리 지방산 및/또는 모노글리세라이드를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 영양학적 제제의 제공은 500-1000mg의 LC-PUFA 유리 지방산 및/또는 모노글리세라이드를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 영양학적 제제의 제공은 1-2그램의 LC-PUFA 유리 지방산 및/또는 모노글리세라이드를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 영양학적 제제의 제공은 2-3그램의 LC-PUFA 유리 지방산 및/또는 모노글리세라이드를 포함한다.

[0121] 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 지방들, 탄수화물들, 및 단백질들(또는 아미노산)을 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 유아용 제제는 하기 중 하나, 하나 초과 또는 모든 하기: 비지방 우유, 락토스, 식물성 오일(예를 들면, 하나 이상의 팜 올레인, 코코넛, 대두 및 고올레산 해바라기유), 유청 단백질 농축물, 당들, LC-PUFA, 비타민들, 및 미네랄을 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 중간 사슬 지방산으로 이루어진 지방들 및 장쇄 지방산으로 이루어진 지방을 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 n-6 지방산으로 이루어진 지방들 및 n-3 지방산으로 이루어진 지방을 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 LA 및 ALA를 포함한다.

[0122] 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 영양학적 제제는 첨가된 리파제를 포함하지 않는다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 디바이스 및/또는 방법은 영양학적 제제를 리파제에 노출시키도록 사용되지만, 영양학적 제제는 공급 전에 리파제로부터 분리되지 않아, 공급받은 그대로의 영양학적 제제는 첨가된 리파제를 포함하지 않는다. 첨가된 리파제를 포함하지 않는 영양학적 제제는 예를 들면, 고체 지지체로부터 제제로의 부동화 리파제의 삼출로 인해 리파제가 검출 가능하지 않거나 매우 낮은 수치로만 존재하는 제제를 의미한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 0.02%(w/w) 이하의 리파제, 0.01%(w/w) 이하의 리파제, 0.005%(w/w) 이하의 리파제, 0.002%(w/w) 이하의 리파제, 0.001%(w/w) 이하의 리파제, 0.0005%(w/w) 이하의 리파제, 0.0002%(w/w) 이하의 리파제, 또는

0.0001%(w/w) 이하의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 0.02%(w/w) 미만의 리파제, 0.01%(w/w) 미만의 리파제, 0.005%(w/w) 미만의 리파제, 0.002%(w/w) 미만의 리파제, 0.001%(w/w) 미만의 리파제, 0.0005%(w/w) 미만의 리파제, 0.0002%(w/w) 미만의 리파제, 또는 0.0001%(w/w) 미만의 리파제를 포함한다.

[0123] 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 크로모박테리움 비스코숨 리파제, 슈도모나스 플루오레센스 리파제, 부르콜데리아 세파시아 리파제 및 리조푸스 오리자에 리파제로부터 선택된다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 크로모박테리움 비스코숨 리파제, 슈도모나스 플루오레센스 리파제 및 리조푸스 오리자에 리파제로부터 선택된다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 크로모박테리움 비스코숨 리파제이다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 슈도모나스 플루오레센스 리파제이다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 리조푸스 오리자에 리파제이다.

[0124] 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제의 제공은 5,000단위(예컨대 문헌[*Pharmaceutical Enzymes: Properties and Assay Methods*, R.Ruyssen and A. Lauwers (Eds) Scientific Publishing Company, Ghent, Belgium (1978)]에 기재된 표준 올리브유 검정에서 평가된 단위) 미만의 리파제를 포함한다. 다른 실시양태들에서, 영양학적 제제의 제공은 3,000단위 미만의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제의 제공은 1,000단위 미만을 포함한다. 특정한 실시양태들에서, 제공당 5,000단위 미만, 3,000단위 미만, 또는 1,000단위 미만의 리파제를 포함하는 제제는 유아용 제제 또는 의학 영양학적 제제이다.

[0125] 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 (유리 지방산, 노노글리세라이드, 에스터, 또는 트리글리세라이드 형태 이든지 간에) 영양학적 제제 중의 전체 지방의 1밀리그램당 0.01mg 내지 1그램의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 지방의 1밀리그램당 0.1 내지 500mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 지방의 1밀리그램당 0.1 내지 250mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 지방의 1밀리그램당 0.1 내지 200mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 지방의 1밀리그램당 0.1 내지 150mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 지방의 1밀리그램당 0.1 내지 100mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 지방의 1밀리그램당 0.1 내지 50mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 지방의 1밀리그램당 1 내지 50mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 지방의 1밀리그램당 25 내지 75mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 지방의 1밀리그램당 1 내지 100mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 지방의 1밀리그램당 50mg 이하의 리파제를 포함한다.

[0126] 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 (유리 지방산, 노노글리세라이드, 에스터, 또는 트리글리세라이드 형태 이든지 간에) 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA의 1밀리그램당 0.001 내지 10mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA의 1밀리그램당 0.001 내지 5mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA의 1밀리그램당 0.001 내지 3mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA의 1밀리그램당 0.001 내지 1mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA의 1밀리그램당 0.001 내지 0.5mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA의 1밀리그램당 0.001 내지 0.1mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA의 1밀리그램당 0.001 내지 0.05mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA의 1밀리그램당 0.01 내지 0.1mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA의 1밀리그램당 0.02 내지 0.08mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA의 1밀리그램당 0.04 내지 0.06mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA의 1밀리그램당 0.1mg 이하의 리파제를 포함한다.

[0127] 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 (유리 지방산, 노노글리세라이드, 에스터, 또는 트리글리세라이드 형태 이든지 간에) 영양학적 제제 중의 전체 DHA의 1밀리그램당 0.001 내지 10mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 DHA의 1밀리그램당 0.001 내지 5mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 DHA의 1밀리그램당 0.001 내지 3mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 DHA의 1밀리그램당 0.001 내지 1mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 DHA의 1밀리그램당 0.001 내지 0.5mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 DHA의

1밀리그램당 0.001 내지 0.1mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 DHA의 1밀리그램당 0.001 내지 0.05mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 DHA의 1밀리그램당 0.01 내지 0.1mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 DHA의 1밀리그램당 0.02 내지 0.08mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 DHA의 1밀리그램당 0.04 내지 0.06mg의 리파제를 포함한다.

[0128] 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 (유리 지방산, 모노글리세라이드, 에스터, 또는 트리글리세라이드 형태 이든지 간에) 영양학적 제제 중의 전체 ARA의 1밀리그램당 0.001 내지 10mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 ARA의 1밀리그램당 0.001 내지 5mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 ARA의 1밀리그램당 0.001 내지 3mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 ARA의 1밀리그램당 0.001 내지 1mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 ARA의 1밀리그램당 0.001 내지 0.5mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 ARA의 1밀리그램당 0.001 내지 0.1mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 ARA의 1밀리그램당 0.001 내지 0.05mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 ARA의 1밀리그램당 0.01 내지 0.1mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 ARA의 1밀리그램당 0.02 내지 0.08mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 ARA의 1밀리그램당 0.04 내지 0.06mg의 리파제를 포함한다.

[0129] 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 (유리 지방산, 모노글리세라이드, 에스터, 또는 트리글리세라이드 형태 이든지 간에) 영양학적 제제 중의 전체 EPA의 1밀리그램당 0.001 내지 10mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 EPA의 1밀리그램당 0.001 내지 5mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 EPA의 1밀리그램당 0.001 내지 3mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 EPA의 1밀리그램당 0.001 내지 1mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 EPA의 1밀리그램당 0.001 내지 0.5mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 EPA의 1밀리그램당 0.001 내지 0.1mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 EPA의 1밀리그램당 0.001 내지 0.05mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 EPA의 1밀리그램당 0.01 내지 0.1mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 EPA의 1밀리그램당 0.02 내지 0.08mg의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 EPA의 1밀리그램당 0.04 내지 0.06mg의 리파제를 포함한다.

[0130] 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 본 명세서에 개시된 방법에 의해 제조된다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 본 명세서에 개시된 디바이스를 사용하여 제조된다.

[0131] 영양학적 제제를 제조하는 방법

[0132] 다양한 실시양태들에 따라, 본 개시내용은 또한 영양학적 제제를 제조하는 방법을 제공한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 유아용 제제이다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 의학 영양학적 제제이다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 성인용 영양 드링크(예컨대 완전 영양 드링크, 예를 들면, ENSURE, PEDIASURE)이다.

[0133] 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제를 제조하는 방법은 액체 영양학적 조성물을 리파제에 노출시키는 것을 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 LC-PUFA 트리글리세라이드 또는 LC-PUFA 에스터를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 DHA, ARA 및 EPA로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 LC-PUFA의 트리글리세라이드 또는 에스터를 포함한다.

[0134] 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 크로모박테리움 비스코숨 리파제, 슈도모나스 플루오레센스 리파제, 부르콜데리아 세파시아 리파제 및 리조푸스 오리자에 리파제로부터 선택되는 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 크로모박테리움 비스코숨 리파제, 슈도모나스 플루오레센스 리파제 및 리조푸스 오리자에 리파제로부터 선택된다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 크로모박테리움 비스코숨 리파제이다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 슈도모나스 플루오레센스 리파제이다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 리조푸스 오리자에 리파제이다.

[0135] 이들 방법들에 포함된 성분는 다양한 순서로 혼합될 수 있다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제를 액체 영양학적 조

성물에 첨가하여 액체 영양학적 조성물 중의 지질을 리파제에 노출시킨다. 몇몇 실시양태들에서, 식수용 액체를 영양학적 조성물의 고체 또는 분말 형태에 첨가하여 액체 영양학적 조성물을 제조한다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 식수용 액체의 첨가 전에 영양학적 조성물의 고체 또는 분말 형태로 존재한다. 다른 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물을 제조한 후 리파제를 첨가한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 조성물의 리파제 및 고체 또는 분말 형태를 식수용 액체에 동시에 첨가한다.

[0136] 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 섭취 전 적어도 1분, 적어도 2분, 적어도 3분, 적어도 5분, 적어도 8분, 적어도 10분, 적어도 15분, 적어도 30분, 적어도 45분, 또는 적어도 60분 동안 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 30초 이하, 1분 이하, 2분 이하, 3분 이하, 5분 이하, 8분 이하, 10분 이하, 15분 이하, 30분 이하, 45분 이하, 60분 이하, 2시간 이하, 4시간 이하, 6시간 이하, 12시간 이하 또는 24시간 이하 동안 리파제에 노출된다.

[0137] 몇몇 실시양태들에서, 상기 방법은 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA의 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%가 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산의 형태인 영양학적 제제를 생성시킨다. 몇몇 실시양태들에서, DHA의 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산의 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, ARA의 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산의 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, EPA의 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다.

[0138] 본원의 목적을 위해, 영양학적 조성물 또는 제제의 노출은 액체 영양학적 조성물 또는 액체 제제가 용액 중에 있거나 부동화될 수 있는 리파제와 접촉하는 기간을 의미한다. 본원의 목적을 위해, 리파제에 대한 노출은 피험체가 제제를 섭취할 때 또는 리파제가 부동화된 고체 지지체로부터 액체 제제를 분리함으로써 리파제가 제거될 때 종료한다. 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 10분 이하 동안 리파제에 노출되고, 생성된 영양학적 제제 중의 DHA 중 적어도 20%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 10분 이하 동안 리파제에 노출되고, 생성된 영양학적 제제 중의 ARA 중 적어도 20%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 10분 이하 동안 리파제에 노출되고, 생성된 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA 중 적어도 20%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다.

[0139] 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 10분 이하 동안 리파제에 노출되고, 생성된 영양학적 제제 중의 DHA 중 적어도 40%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 10분 이하 동안 리파제에 노출되고, 생성된 영양학적 제제 중의 ARA 중 적어도 40%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 10분 이하 동안 리파제에 노출되고, 생성된 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA 중 적어도 40%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다.

[0140] 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 10분 이하 동안 리파제에 노출되고, 생성된 영양학적 제제 중의 DHA 중 적어도 50%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 10분 이하 동안 리파제에 노출되고, 생성된 영양학적 제제 중의 ARA 중 적어도 50%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 10분 이하 동안 리파제에 노출되고, 생성된 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA 중 적어도 50%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다.

[0141] 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 10분 이하 동안 리파제에 노출되고, 생성된 영양학적 제제 중의 DHA 중 적어도 60%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 10분 이하 동안 리파제에 노출되고, 생성된 영양학적 제제 중의 ARA 중 적어도 60%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 10분 이하 동안 리파제에 노출되고, 생성된 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA 중 적어도 60%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다.

[0142] 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 10분 이하 동안 리파제에 노출되고, 생성된 영양학적 제제 중의

DHA 중 적어도 60%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 30분 이하 동안 리파제에 노출되고, 생성된 영양학적 제제 중의 ARA 중 적어도 60%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 30분 이하 동안 리파제에 노출되고, 생성된 영양학적 제제 중의 LC-PUFA 중 적어도 60%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다.

[0151] 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 30분 이하 동안 리파제에 노출되고, 생성된 영양학적 제제 중의 DHA 중 적어도 70%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 30분 이하 동안 리파제에 노출되고, 생성된 영양학적 제제 중의 ARA 중 적어도 70%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 30분 이하 동안 리파제에 노출되고, 생성된 영양학적 제제 중의 LC-PUFA 중 적어도 70%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다.

[0152] 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 30분 이하 동안 리파제에 노출되고, 생성된 영양학적 제제 중의 DHA 중 적어도 80%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 30분 이하 동안 리파제에 노출되고, 생성된 영양학적 제제 중의 ARA 중 적어도 80%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다. 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 30분 이하 동안 리파제에 노출되고, 생성된 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA 중 적어도 80%는 모노글리세라이드 및/또는 유리 지방산 형태이다.

[0153] 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 피험체에게 공급될 때 영양학적 제제에 잔존한다. 다른 실시양태들에서, 리파제는 피험체에게 공급되기 전에 액체 영양학적 조성물로부터 제거된다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제에 결합하는 분자에 부동화된 고체 지지체 부동화에 리파제를 포함하는 액체 영양학적 조성물을 노출시켜, 리파제를 고체 지지체에 결합시키고, 고체 지지체로부터 액체 영양학적 조성물을 분리시킴으로써 리파제를 제거한다. 리파제가 고체 지지체에 부동화되므로, 고체 지지체로부터 액체 영양학적 조성물을 분리시키는 것은 액체 영양학적 조성물로부터 리파제를 제거시키는 효과를 갖는다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 액체 영양학적 조성물에 노출되기 전에 고체 지지체에 부동화되고, 고체 지지체로부터 액체 영양학적 조성물을 분리시킴으로써 리파제는 제거된다. 몇몇 실시양태들에서, 리파제는 챔버의 내면의 적어도 일부 또는 챔버 내에 포함된 고체 지지체에 부동화되고, 액체 영양학적 조성물은 챔버를 통과하여 일시적으로 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 챔버는 컬럼이다. 몇몇 실시양태들에서, 액체 영양학적 조성물은 고체 지지체에 부동화된 리파제를 포함하는 용기에 노출되고, 용기의 내면의 적어도 일부는 트리글리세라이드 및 에스터들에 투과성이지만, 고체 지지체에 불투과성인 재료로 이루어진다.

[0154] 몇몇 실시양태들에서, 상기 방법은 첨가된 리파제를 포함하지 않는 영양학적 제제를 제조한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 리파제에 노출되지만, 영양학적 제제는 공급 전에 리파제로부터 분리되어, 공급받은 그 대로의 영양학적 제제는 첨가된 리파제를 포함하지 않는다. 첨가된 리파제를 포함(또는 함유)하지 않는 영양학적 제제는 예를 들면, 고체 지지체로부터 제제로의 부동화 리파제의 삼출로 인해 리파제가 검출 가능하지 않거나 매우 낮은 수치로만 존재하는 제제를 의미한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 0.02%(w/w) 이하의 리파제, 0.01%(w/w) 이하의 리파제, 0.005%(w/w) 이하의 리파제, 0.002%(w/w) 이하의 리파제, 0.001%(w/w) 이하의 리파제, 0.0005%(w/w) 이하의 리파제, 0.0002%(w/w) 이하의 리파제, 또는 0.0001%(w/w) 이하의 리파제를 포함한다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 0.02%(w/w) 미만의 리파제, 0.01%(w/w) 미만의 리파제, 0.005%(w/w) 미만의 리파제, 0.002%(w/w) 미만의 리파제, 0.001%(w/w) 미만의 리파제, 0.0005%(w/w) 미만의 리파제, 0.0002%(w/w) 미만의 리파제, 또는 0.0001%(w/w) 미만의 리파제를 포함한다.

[0155] 몇몇 실시양태들에서, 상기 방법은 5,000단위(예컨대 문헌[*Pharmaceutical Enzymes: Properties and Assay Methods*, R.Ruyssen and A. Lauwers (Eds) Scientific Publishing Company, Ghent, Belgium (1978)]에 기재된 표준 올리브유 검정에서 평가된 단위) 미만의 리파제에 영양학적 제제를 노출시키는 것을 포함한다. 다른 실시양태들에서, 영양학적 제제는 제공당 3,000단위 미만의 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 제공당 1,000단위 미만의 리파제에 노출된다. 특정한 실시양태들에서, 제공당 5,000단위 미만, 3,000단위 미만, 또는 1,000단위 미만의 리파제에 노출되는 제제는 유아용 제제 또는 의학 영양학적 제제이다.

[0156] 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 방법은 영양학적 제제 중의 전체 지방(유리 지방산, 모노글리세라이드, 에스터, 또는 트리글리세라이드 형태이든) 1밀리그램당 0.01mg 내지 1그램의 리파제에 영양학적 제제를 노출시킨다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 방법은 영양학적 제제 중의 전체 지방 1밀리그램당 0.1 내지 500mg의 리파제에 영양학적 제제를 노출시킨다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 방법은 영양학적 제제 중의 전체 지방 1밀리그램당 0.1 내지 250mg의 리파제에 영양학적 제제를 노출시킨다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 방법은

영양학적 제제 중의 전체 지방 1밀리그램당 0.1 내지 200mg의 리파제에 영양학적 제제를 노출시킨다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 방법은 영양학적 제제 중의 전체 지방 1밀리그램당 0.1 내지 150mg의 리파제에 영양학적 제제를 노출시킨다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 방법은 영양학적 제제 중의 전체 지방 1밀리그램당 0.1 내지 100mg의 리파제에 영양학적 제제를 노출시킨다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 방법은 영양학적 제제 중의 전체 지방 1밀리그램당 0.1 내지 50mg의 리파제에 영양학적 제제를 노출시킨다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 방법은 영양학적 제제 중의 전체 지방 1밀리그램당 1 내지 50mg의 리파제에 영양학적 제제를 노출시킨다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 방법은 영양학적 제제 중의 전체 지방 1밀리그램당 25 내지 75mg의 리파제에 영양학적 제제를 노출시킨다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 방법은 영양학적 제제 중의 전체 지방 1밀리그램당 1 내지 100mg의 리파제에 영양학적 제제를 노출시킨다. 몇몇 실시양태들에서, 본 발명의 방법은 영양학적 제제 중의 전체 지방 1밀리그램당 50mg 이하의 리파제에 영양학적 제제를 노출시킨다.

[0157] 몇몇 실시양태들에서, 상기 방법은 영양학적 제제 중의 LC-PUFA(유리 지방산, 모노글리세라이드, 에스터, 또는 트리글리세라이드 형태이든) 1밀리그램당 0.001 내지 10mg의 리파제에 영양학적 제제를 노출시킨다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA 1밀리그램당 0.001 내지 5mg의 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA 1밀리그램당 0.001 내지 3mg의 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA 1밀리그램당 0.001 내지 1mg의 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA 1밀리그램당 0.001 내지 0.5mg의 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA 1밀리그램당 0.001 내지 0.1mg의 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA 1밀리그램당 0.001 내지 0.05mg의 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA 1밀리그램당 0.01 내지 0.1mg의 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA 1밀리그램당 0.02 내지 0.08mg의 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA 1밀리그램당 0.04 내지 0.06mg의 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 LC-PUFA 1밀리그램당 0.1mg 이하의 리파제에 노출된다.

[0158] 몇몇 실시양태들에서, 상기 방법은 영양학적 제제 중의 전체 DHA(유리 지방산, 모노글리세라이드, 에스터, 또는 트리글리세라이드 형태이든) 1밀리그램당 0.001 내지 10mg의 리파제에 영양학적 제제를 노출시킨다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 DHA 1밀리그램당 0.001 내지 5mg의 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 DHA 1밀리그램당 0.001 내지 3mg의 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 DHA 1밀리그램당 0.001 내지 1mg의 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 DHA 1밀리그램당 0.001 내지 0.5mg의 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 DHA 1밀리그램당 0.001 내지 0.1mg의 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 DHA 1밀리그램당 0.001 내지 0.05mg의 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 DHA 1밀리그램당 0.01 내지 0.1mg의 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 DHA 1밀리그램당 0.02 내지 0.08mg의 리파제에 노출된다. 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제는 영양학적 제제 중의 전체 DHA 1밀리그램당 0.04 내지 0.06mg의 리파제에 노출된다.

[0159] 몇몇 실시양태들에서, 영양학적 제제를 제조하는 방법은 액체 영양학적 조성물을 본 명세서에 기재된 디바이스에 노출시키는 것을 포함한다.

[0160] 실시예 1: DHA 및 ARA에 대한 리파제들의 특이적 활성

[0161] DHA 및/또는 ARA 트리글리세라이드에 대한 다양한 리파제들의 효소 활성을 평가하기 위해, 0.1M 트라이스 완충제, pH 7.7 및 기질 DHA 또는 ARA 트리글리세라이드를 포함하는 2mℓ의 유리 바이알(자기 교반 막대 구비) 중에 실험을 수행하였다. 리파제 용액을 첨가하여 반응을 개시하였다. 하기의 상업용 공급원으로부터 리파제를 얻었다: 리조푸스 오리자에(Amano DF-15, Amano Enzymes Inc., Nagoya, Japan), 크로모박테리움 비스코움(EMD CalBiochem, EMD Biosciences, Billerica, MA), 및 슈도모나스 플루오레센스(Amano AK, Amano Enzymes Inc., Nagoya, Japan). 다른 리파제는 또한 상업용 공급원들, 예컨대 칸디다 루고사(Amano AY 30 or Amano 30, Amano Enzymes Inc., Nagoya, Japan), 아스퍼질러스 니게르(Amano DS, Amano Enzymes Inc., Nagoya, Japan), 페니실륨 카멤베르티(Amano 50, Amano Enzymes Inc., Nagoya, Japan), 리조무코르 미에헤이(L4277, Sigma-Aldrich), 아스퍼질러스 오리자에(62285, Sigma-Aldrich), 및 부르콜테리아 세파시아(534641, Sigma-Aldrich)로부터 구입 가능하다. B. 세파시아 리파제를 동중성으로 정제한다는 것을 제외하고는 추가의 정제 없이 이 상업적으로 구입

가능한 리파제들로부터 리파제 용액을 제조하였다.

[0162] 바이알을 자기 교반기 상에 위치한 37℃에서의 수조에 옮겼다. 50 μ l의 샘플을 상이한 시간 간격 - 0, 15, 30, 45, 60, 90, 및 120분에 취하고, 950 μ l의 작동 완충제(30% 10mM 인산암모늄 완충제, pH 3.0 및 70% 아세트나이트릴)를 포함하는 HPLC 바이알에 첨가하였다. 이후, 샘플을 Agilent HPLC1100 시리즈 및 C8 RP 컬럼을 이용하여 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)에 의해 DHA 유리 산 또는 ARA 유리 산에 대해 분석하고 215 및 220 nm에서 모니터링하였다. 유리 산 피크를 상업적으로 구입 가능한 표준품: DHA 트리글리세라이드(Nu-check Prep, Inc. 롯트 번호 T-310-D7-V), ARA 트리글리세라이드(Nu-check Prep, Inc. 롯트 번호 T-295-JY14-V), DHA 유리 산 형태(Nu-check Prep, Inc. 롯트 번호 U-84A-AU20-U), 및 ARA 유리 산 형태(Nu-check Prep, Inc. 롯트 번호 U-71A-N11-U)를 사용하여 보유 시간에 따라 확인하였다. DHA 및 ARA에 대한 이 검정에서의 일련의 리파제들에 대한 특이적 활성이 표 1에 요약되어 있다. 발명자들의 손에서, 크로모박테리움 비스코숨(CV), 부르콜테리아 세파시아(BC), 슈도모나스 플루오레센스(PF), 및 리조푸스 오리자에(RO)는 칸디다 루고사(CR)를 포함하여 시험된 다른 리파제들과 비교하여 DHA 및/또는 ARA에 대해 실질적으로 더 높은 특이적 활성을 가졌다.

표 1

DHA 및 ARA에 대한 리파제들의 특이적 활성

효소	제조된 DHA, μ mol/min/mg	제조된 ARA, μ mol/min/mg
CV	27.73	23.207
PF	4.66	2.599
RO	9.83	6.297
CR	0.01	0.205
AN	0.00	0.000
PC	0.00	0.000
BC	55.11	13.920
AO	0.33	0.263
RM	0.14	0.03

[0163]

[0164] 실시예 2: 유아용 제제에서 DHA, ARA 및 EPA에 대한 크로모박테리움 비스코숨 및 리조푸스 오리자에 리파제들의 효소 활성

[0165] 유아용 제제에 보충될 때 DHA, ARA 및 EPA에 대한 CV 및 RO 리파제의 효소 활성을 평가하기 위해, 10g의 ENFAMIL® 분말을 35ml의 물 중에 용해시켜 젓 기반 유아용 제제를 제조하였다. 기질 EPA, 0.1M 트라이스 완충제, pH 7.7, 및 기질 2.7mg DHA(Nu-check Prep, Inc. 롯트 번호 T-310-D7-V) 및 5.4mg ARA(Nu-check Prep, Inc. 롯트 번호 T-295)를 포함하는 유아용 제제를 1ml의 유리 바이알(자기 교반 막대 구비)에 첨가하였다. 효소 (즉 리파제)를 첨가하여 반응을 개시하고; 각각의 효소의 4 가지 농도를 시험하였다. 바이알을 자기 교반기 상에 위치한 37℃에서의 수조에 옮겼다. 50ml의 각각의 샘플을 상이한 시간 간격 - 0, 10, 20, 30, 45, 및 60분에 취하고, 950ml의 HPLC 작동 완충제(30% 10mM 인산암모늄 완충제, pH 3.0 및 70% 아세트나이트릴)를 포함하는 HPLC 바이알에 첨가하였다. 이후, 샘플을 상기대로 RP-HPLC에 의해 DHA 산, ARA 산, 또는 EPA 산에 대해 분석하였다.

[0166] 유리 산 및 모노글리세라이드의 양이 증가하면서 전체 트리글리세라이드의 백분율이 시간에 따라 감소하였다. 예를 들면, RO로 가수분해될 때, DHA 유리 산의 양은 시간에 따라 증가하였다(도 7). 유사하게, RO로 가수분해

될 때, 유리 산의 양은 시간에 따라 증가하였다(도 8).

[0167] 이 검정에서의 각각의 리파제들의 특이적 활성을 유아용 제제에 방출된 유리 DHA 산, ARA 산, 또는 EPA 산의 양에 기초하여 계산하고 표 2에 기재되어 있다.

표 2

유아용 제제에서 TG-DHA, TG-ARA, 및 TG-EPA에 대한 리파제들의 특이적 활성

효소	제조된 DHA, $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	제조된 ARA, $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	제조된 EPA, $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$
CV	39.461	36.587	19.866
RO	13.062	10.940	14.156

[0168]

[0169] 실시예 3: DHA 트리글리세라이드 및 ARA 트리글리세라이드 스케일업의 가수분해

[0170] 유아용 제제를 보충하기 위해 사용될 수 있는 양까지 스케일업될 때 TG-DHA 및 TG-ARA를 가수분해하는 능력에 대해 리파제를 평가하였다. 162g의 Enfamil 분말을 648mL의 수돗물(열수, 온도는 37°C임) 중에 용해시켜 유아용 제제(젖)를 제조하였다. DHA 트리글리세라이드(442mg, DHA의 최종 농도는 전체 지방의 1.2%인 0.54g임) 및 ARA 트리글리세라이드(885mg, ARA의 최종 농도는 전체 지방의 2.4%인 1.08g임)를 실시예 2에서처럼 동일한 공급원으로부터 정확히 칭량하고, 물을 첨가하기 전에 유아용 제제 분말과 혼합하였다. 계속해서 교반하면서 수조 중에 반응을 수행하였다. CV 또는 RO 리파제를 첨가하여 지방 가수분해를 개시하였다. 제제 샘플을 0, 15, 및 30분에 꺼내고, 상기대로 RP-HPLC에 의해 DHA 및 ARA의 가수분해에 분석하였다. 결과들이 하기 표 3에 기재되어 있다.

표 3

유아용 제제 중의 TG-DHA 및 TG-ARA의 가수분해

	리파제, mg	가수분해(%) DHA			가수분해(%) ARA	
		15분	30분		15분	30분
CV	9	75.17	71.32		58.97	74.38
	18	84.51	87.25		65.83	63.31
RO	29	62.35	71.19		104.81	124.67
	58	73	67.77		124.22	113.08

[0172] 실시예 4: 유아용 제제 및 완충제에서의 TG-DHA 또는 TG-ARA에 대한 부동화 리조푸스 오리자에 리파제의 효소 활성 유아용 제제에 보충될 때 TG-DHA 또는 TG-ARA에 대한 부동화 RO 리파제의 효소 활성을 평가하기 위해, 10g의 ENFAMIL® 분말을 35mL의 물 중에 용해시켜 젖 기반 유아용 제제를 제조하였다. 반응을 하기 대로 수행하였다. 유아용 제제, 0.1M 트라이스 완충제, pH 7.7, 및 기질(TG-DHA 또는 TG-ARA)을 1mL의 유리 바이알(자기 교반 막대 구비)에 첨가하였다. 리파제를 첨가하여 반응을 개시하였다. 바이알을 자기 교반기 상에 위치한 37°C에서의 수조에 옮겼다. 50 μL 의 각각의 샘플을 상이한 시간 간격 - 0, 10, 20, 및 30분에 취하고, 900 μL HPLC 작동 완충제(30% 10mM 인산암모늄 완충제, pH 3.0 및 70% 아세토나이트릴)를 포함하는 HPLC 바이알에 첨가하였다. 이후, 샘플을 상기대로 RP-HPLC에 의해 DHA 산 또는 ARA 산에 대해 분석하였다.

[0173] TG-DHA 및 TG-ARA의 가수분해에 대한 리파제의 특이적 활성을 유아용 제제에서 방출된 유리 DHA 산 또는 ARA 산의 양에 기초하여 계산하고 표 4에 기재되어 있다.

표 4

유아용 제제 및 완충제에서의 TG-DHA 또는 TG-ARA에 대한 부동화 RO 리파제의 특이적 활성

효소	제조된 DHA, $\mu\text{mol}/\text{분}/\text{mg}$	제조된 ARA, $\mu\text{mol}/\text{분}/\text{mg}$
부동화 리조푸스 오리자에 리파제(RO)	0.017(0.004)	0.020(0.008)

괄호 내의 값은 완충제 단독에 대해서이다. **실시예 5: 동물들 및 수술 절차**

5.1 동물들

각각 대략 $10 \pm 2\text{kg}$ 이 나가는 Odarslov; Swedish Agricultural University, Department of Agricultural Biosystems and Technology서 대학 허드(University herd)로부터 12마리의 돼지들(9 + 3)에서 실험을 수행하였다. 동물들 12시간 낮-밤 사이클로 유지시키고, 낮은 06.00-18.00(6am-6pm)이고 밤은 18.00-06.00(6pm-6am)시간이다. 돼지를 각각 건조 공급 트로프(trough), 드링크 니플 및 일정한 가열 램프(150W)가 구비된 대사 케이지 또는 개별 펜에 감금하였다. 이를 축사 내에 자유롭게 움직이게 하고, 서로 육안 접촉하였다.

5.2 사료 공급

수술 후 및 전치료 기간 동안, 돼지들에게 5000IE/kg의 비타민 A, 500 IE/kg의 비타민 D, 및 85mg/kg의 비타민 E와 함께 17.5% 미정제 단백질, 3.9% 미정제 섬유, 3.5% 미정제 지방, 및 5.2% 재(ash)를 포함하는 표준 돼지식이("53908 Vaxtill 320 P BK", Lantmannen, Sweden)를 공급하였다. 돼지들에게 09:00-10:00시(9am-10 am) 및 17:00-18:00시(5pm-6pm)에 1일 2회(식사당 체중의 2.0%) 공급하였다. 실험 시작 전 며칠 동안, 즉 적응 기간 전에, 돼지를 유아용 제제(NAN Pro 1 Gold 유아용 제제, Nestle)를 소비하도록 훈련시켰다. 돼지들이 다량의 용적의 액체를 마시지 않으므로 적절한 소모를 위해 제조업자가 추천하는 1:7 대신에 수돗물 중의 1:4 희석으로 제제를 제조하였다. 매일 영양 요구량은 400kJ/kg 체중이고, 이는 체중 1kg당 40g의 제제 분말에 상응하다. 제1 식사를 9am에 시작하고 이후 매 3시간, 이후 6pm에 하루의 마지막 식사로 매일 공급사료를 4 부분으로 나눴다. 100g의 NAN 제제는 약 27.7% 지방, 9.6% 단백질, 및 57.8% 탄수화물을 포함한다.

5.3 DHA 및 ARA 트리글리세라이드로 강화된 유아용 제제 젖

제조업자에 따라, NAN Pro 1 Gold(Nestle)는 영양학적으로 완전하고 출생시부터 건강한 유아들에 특별히 제제화된 프리미엄 유형 우세 스타터 유아용 제제이다. 이는 또한 뇌 및 시각 발육을 지원하는 것을 돕는 어유를 포함한다. (http://www.nestlebaby.com/au/baby_nutrition/products/infant_formula/)

NAN Pro 1 Gold 성분들:

젖 고형분들, 식물성 오일들(대두 포함), 미네랄들(시트르산칼슘, 칼륨 시트레이트, 염화칼륨, 염화마그네슘, 염화나트륨, 황산나트륨, 황산제일철, 황산아연, 인산칼슘, 황산구리, 황산망간, 요오드화칼륨, 셀렌산나트륨), 오메가 LCPUFA(어유로부터의 DHA, AA), 유화제(대두 레시틴), 비타민들 [나트륨 아스코르베이트(비타민 C), d-1 알파 토크페릴 아세테이트(비타민 E), 니아신아마이드(니아신), 칼슘 판토테네이트, 레티닐 아세테이트(비타민 A), 티아민 모노니트레이트(비타민 B1), 피리독신 하이드로클로라이드(비타민 B6), 리보플라빈(비타민 B2), 엽산, 필로퀴논(비타민 K1), 바이오틴, 콜레칼시페롤(비타민 D3)], 사이아노코발라민(B 12), L-히스티딘, 타우린, 이노시톨, 뉴클레오타이드(사이티딘 5'-모노포스페이트, 유리딘 5'-모노포스페이트, 아데노신 5'-모노포스페이트, 구아노신 5'-모노포스페이트), L-카르니틴, 배양물(쌍미균).

하기 표 5는 유아용 제제 및 이 실험들에서 사용하기 위한 돼지 제제 젖과 함께 모유 및 유아용 제제 젖*의 지질 조성을 요약한 것이다.

표 5

LCPUFA 강화 제제 젖

	모유*	만삭아 제제	조산아 제제	EPI 돼지들에서 연구를 위한 돼지 제제
TG(g/L)	25-29	33-36	25	50
콜레스테롤(mg/dL)	9-15	0-4		10
전체 FA의 %에서	모유*	유아용 화학식	조산아 제제	EPI 돼지들에서 연구를 위한 돼지 제제
팔미테이트 C16:0	20-25	8-24	NA [†]	NA [†]
스테아레이트 C18:0	7-12	2-6	NA [†]	NA [†]
LA C18:2n-6	10-15.5	10-29.9	4.5	NA [†]
LNA C18:3n-3	0.58-1.44	0.08-2	0.086	NA [†]
DHA C22:6n-3 (w 3)	0.19-0.42	0-0.15	0.083	1.6% ^{***} 까지
ARA C20:4n-6 (w 6)	0.4-0.54	0-0.4	0.167*	3.15% ^{***} 까지
* 1990년과 2005년 사이에 호주, 유럽, 미국 및 캐나다에서의 다양한 여성 코호트들로부터의 데이터. Nutrilom(Nutricia,Netherland), Enfamil(Mead Johnson, Canada), Similac(Abbott Ross, US),SMA(Wyeth, US)를 포함하는 다양한 만삭아 제제들로부터의 데이터. (JPGN 2010;51: 380-401)// ** Huang MC, 2007, ^{\$} MCT 9.6 * 최종 농도는 실험 종료 후 측정하였다.				

[0185]

[0186]

NAN 제제 중의 TG-DHA 및 TG-AA의 전체 농도는 0.22%이고, 이는 추천되는 1%의 수치보다 낮다. 따라서, NAN 제제를 어유로부터의 TG-DHA 및 TG-AA(NuCheck(<http://www.nu-chekprep.com>, 약 40%의 TG-DHA 및 TG-ARA)로 강화하여 각각 1% TG-DHA 및 2% TG-DHA의 최종 농도에 도달하였다.

[0187]

5.4 외분비 췌장 부전증(EPI)의 유도에 대한 췌장관 결찰 수술

[0188]

6-8주령의 12+2마리의 어린 돼지에서 EPI 수술을 수행하였다. EPI는 통상적으로 수술 후 3주 내지 4주에 완전히 발생하였다. 전체 췌장 부전증의 발생을 정지된 성장(최소 체중 또는 체중 증가 무) 및/또는 지방변의 발생에 의해 확인하였다.

[0189]

실시예 6: 실험 설계, 절차들

[0190]

6.1 연구 설계

[0191]

연구는 3의 기간을 포함하였다: 적응, 조절 및 시험. 7일 적응 기간 동안, 돼지를 TG-DHA 및 TG-ARA로 강화된 유아용 제제를 마시도록 훈련시켰다. 7일 조절 기간 동안, 돼지는 TG-DHA 및 TG-ARA로 강화된 유아용 제제를 계속해서 공급받았다. 7일 시험 기간 동안, 돼지는 (a) 비가수분해; (b) CV 리파제로 예비 가수분해; 또는 (c) RO 리파제로 예비가수분해된, TG-DHA 및 TG-ARA로 강화된 유아용 제제를 공급받았다. 제제 소모를 매일 측정하고, 대변 샘플을 각각의 연구 기간 마지막 3일(72시간 수집)에 수집하고, 혈액 샘플을 조절 및 시험 기간의 7일에 수집하였다.

[0192]

6.2 리파제 용량

[0193]

리파제의 용량 및 예비 가수분해 시간을 실험실내 결과들(실시예 3) 및 돼지들의 매일의 영양학적 요건에 기초하여 결정하였다. 리파제 RO 또는 CV(약 1300의 U/g 전체 지방)와 혼합된 NAN 제제를 37°C에서 15분 동안 진탕시키면서 항온처리하였다.

[0194]

제안된 제제 제조 및 리파제 혼합물:

- [0195] - 11-14kg 범위의 돼지들의 체중
- [0196] - 사료 요건: 40g의 제제 분말/kg 체중;
- [0197] - 매일 500g 분말/돼지 필요
- [0198] - 매일 4회 식사
- [0199] - 125g의 분말/돼지/식사
- [0200] 식사 제조: 500g 분말 + 1.5L의 물(희석 1:4)
- [0201] - 처음에 건조 분말을 첨가한다
- [0202] - TG-PUFA 오일들(7.5mL의 DHA 및 15mL의 ARA)을 첨가하고, 잘 혼합하고, 37℃에서 수조로부터 수돗물을 첨가하고, 잘 혼합한다
- [0203] - 리파제 처리 제제를 위해, CV 또는 RO 리파제 중에 혼합한다
- [0204] - 물을 최종 용적에 첨가한다
- [0205] - 37℃에서 수조 중에 모두 15분 혼합한다
- [0206] - 4개의 버킷으로 나누고 각각의 돼지에게 약 600mL의 제제를 공급한다.
- [0207] 6.2.1 적응 기간(7-10일)
- [0208] 적은 기간 대략 7-10일 전에, 12마리의 돼지를 대사 케이지에 위치시키고 TG-PUFA가 풍부한 제제를 마시도록 훈련시켰다. 적응 기간 제1 아침에, 체중을 아침 식사 전에 기록하였다.
- [0209] 6.2.2 조절 기간(7일)
- [0210] 모든 선택된 돼지들에게 유아용 제제를 1일 4회 유일한 식품 원으로 제공하였다. 전체 실험 동안 전체 매일 제제 소모량을 측정하였다. 조절 기간의 제1 일의 아침에, 체중을 아침 식사 전에 기록하였다. 5일로부터 7일의 3x24h 대변 샘플을 수집하였다. 이 기간 마지막 일에, 식사 1h 전에 및 1, 2, 및 3시간 후에 혈액 샘플을 수집하였다.
- [0211] 6.2.3 시험 기간(7일)
- [0212] 모든 선택된 돼지들에게 TG-PUFA 풍부 유아용 제제를 1일 4회 유일한 식품 원으로 제공하였다. 전체 실험 동안 전체 매일 젓 소모량을 측정하였다. 시험 기간 제1 일의 아침에 체중을 아침 식사 전에 기록하였다. 5일로부터 7일의 3x24h 대변 샘플을 수집하였다. 이 기간 마지막 일에, 식사 1h 전에 및 1, 2, 및 3시간 후에 혈액 샘플을 수집하였다.
- [0213] 이 기간 시작 전에, 돼지를 체중 및 음료 제제에 대한 의향에 기초하여 3개의 그룹들로 무작위화하였고:
- [0214] 1) EPI 돼지들의 $\frac{1}{3}$ (n=4)에게 RO 리파제로 예비 가수분해된 제제를 공급하였다;
- [0215] 2) EPI 돼지들의 $\frac{1}{3}$ (n=4)에게 CV 리파제로 예비 가수분해된 제제를 공급하였으며;
- [0216] 3) EPI 돼지들의 $\frac{1}{3}$ (n=4)에게 제제만을 공급하였다.
- [0217] 제제 및 리파제 혼합물의 제조는 상기 단락 [00201]에 기재되어 있다.
- [0218] 6.3 양성 반응을 위한 기준
- [0219] 2%TG-ARA 및 1%TG-AA로 보충된 제제만을 공급받은 EPI 돼지들과 비교할 때 대변 LCPUFA의 유의적인 감소, 지방 흡수 계수(CFA(%)) 증가 및 혈장 LCPUFA의 농도 증가.
- [0220] 6.4 데이터 분석
- [0221] - 개별 데이터를 이들이 생성된 시간에 기록하였다. 스튜던트 t-시험을 이용하여 통계 분석을 수행하였다. $p < 0.05$ 인 경우 차이가 유의적인 것으로 생각되었다.
- [0222] **실시예 7: RO 및 CV 리파제는 EPI 돼지들에서 지방산 흡수를 개선한다**
- [0223] 널리 확립된 수술 모델인 외분비 췌장 부전증(EPI)을 갖는 돼지를 외분비 췌장 작용이 손상된 조산아 또는 만삭

아 인간 유아를 모방하는 모델로서 사용하였다. 비가수분해된 유아용 제제와 비교하여 CV 리파제 또는 RO 리파제로 예비 가수분해된 유아용 제제의 지방산 흡수에 대한 효과를 평가하기 위해 실시예 5 및 6에 실질적으로 기재된 바와 같이 EPI 수술 돼지 모델을 사용하였다. EPI 돼지는 인간 유아의 약 6개월에 해당하는 10주령(+/-2주)이었다. 돼지들에게 어유로부터의 2% ARA 트리글리세라이드(TG-ARA) 및 1% DHA 트리글리세라이드(TG-DHA)이 풍부한 Nestle(NAN Pro 1 Gold) 유아용 제제를 공급하였다(NuCheck(<http://www.nu-checkprep.com>), 약 40%의 TG-DHA 및 TG-ARA). 공급은 1일 4회 매 3시간 시행하였다. 예비 가수분해된 제제를 투여받은 돼지들의 그룹에서, 37℃에서 CV 리파제 또는 RO 리파제와 혼합하여 공급하기 전에 15분 제제를 예비 가수분해하였다. 실험 기간은 1주이고, 이후 대변에서의 LC-PUFA 농도, 혈장에서의 LC-PUFA의 흡수, 및 조직들(지방, 심장, 간, 신장, 적혈구들, 뇌, 및 지방)에서의 LC-PUFA의 부착물을 분석하였다.

[0224] 도 22a에 나타난 바와 같이, CV 리파제 또는 RO 리파제로 예비 가수분해된 제제를 공급받은 EPI 돼지는 대변 중량이 유의적으로 감소하였다(CV: >60% 감소, $p<0.001$; RO: 약 30% 감소, $p<0.05$). CV 리파제 또는 RO 리파제에 의한 지방의 예비 가수분해는 또한 대조군 EPI 돼지들(도 22b)과 비교하여 대변에서 전체 지방 함량을 유의적으로 감소시키고 대조군들과 비교하여 지방 흡수 계수(CFA(%))를 유의적으로 증가시키고(도 22c), $CFA(\%) = (\text{지방 섭취}(g/24\text{시간}) - \text{대변에서의 지방}(g/24\text{시간})) / (\text{지방 섭취}(g/24\text{시간}))$, $n=3/\text{암}(\text{arm})$, CV 대 대조군에 대해 $p=0.002$ 및 RO 대 대조군에 대해 $p=0.003$. 대조군과 비교하여, CV 리파제 또는 RO 리파제에 의한 예비 가수분해는 대변 ARA(각각 36% 및 65% 감소), EPA(효소에 의한 78% 감소), 및 DHA(각각 68% 및 60% 감소)(도 23)의 유의적인 감소를 발생시켰다. 이 데이터는 CV 또는 RO 리파제에 의한 제제의 예비 가수분해가 전체 지방, ARA, DHA, 및 EPA의 대변 수치를 감소시킨다는 것을 보여주고, 이는 오메가-3, 오메가-6, 및 전체 지방산의 흡수 개선을 나타낸다.

[0225] 또한, 예비 가수분해된 제제를 공급받은 돼지는 대조군 돼지들과 비교하여 공급 7일 후 ARA 및 DHA의 혈장 및 조직 수치가 유의적으로 증가하였다. 이들 연구를 위해, 대조군 및 CV 리파제 그룹들에서 4마리의 돼지들 및 RO 리파제 그룹에서 3마리의 돼지들이 있었다. 치료 7일 후 밤새 공복시킨 후 식전 혈장 샘플을 취했다. ARA 및 DHA의 혈장 수치는 비가수분해된 제제를 공급받은 돼지들과 비교하여 RO 리파제로 예비 가수분해된 제제를 공급받은 돼지들에서 유의적으로 더 높았다(각각 60% 및 30%, $p<0.05$)(도 24). ARA의 혈장 수치는 또한 비가수분해된 제제를 공급받은 돼지들과 비교하여 CV 리파제로 예비 가수분해된 제제를 공급받은 돼지들에서 유의적으로 더 높았다(40%, $p<0.05$)(도 24). ARA 및 DHA 수치는 또한 비가수분해된 제제를 공급받은 돼지들과 비교하여 CV 리파제로 예비 가수분해된 제제를 공급받은 돼지들의 지방(도 25a) 및 지방 조직(도 25b)에서 유의적으로 더 높았다. ARA의 지방 수치는 또한 비가수분해된 제제를 공급받은 돼지들과 비교하여 CV 리파제로 예비 가수분해된 제제를 공급받은 돼지들에서 유의적으로 더 높았다($p<0.05$)(도 25a). CV 또는 RO 리파제로 예비 가수분해된 제제를 공급받은 돼지들에서, ARA 수치는 또한 비가수분해된 제제를 공급받은 돼지들과 비교하여 돼지들의 심장(도 26a: 각각 60% 및 20% 증가) 및 신장(도 26b)에서 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). DHA 수치는 비가수분해된 제제를 공급받은 돼지들과 비교하여 CV 리파제로 예비 가수분해된 제제를 공급받은 돼지들의 심장에서 유의적으로 증가하였다(60%, $p<0.05$)(도 26a). 간, 적혈구들, 및 뇌에서 최소 변화가 있거나 변화가 없었고, 이는 이 연구에서 비교적 짧은 치료 기간(7일)에 의해 설명될 수 있다.

[0226] 실시예 8: "티백" 내의 부동화 리파제에 의한 유아용 제제에서의 TG-DHA 및 TG-ARA의 가수분해

[0227] 리조푸스 오리자에(RO) 리파제는 아크릴 비드에 공유 결합되고 티백을 담은 디바이스에 포함되었다. 엔팔락 유아용 제제(25g)를 37℃에서 수돗물(88mL)과 합했다. 100mL의 유아용 제제 및 100, 500, 1000, 또는 2000mg의 부동화 RO 리파제를 포함하는 티백을 갖는 유리 병에서 반응을 수행하였다. 각각의 반응물을 도치하면서 30분 동안 37℃에서 항온처리하였다. 샘플을 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 및 30분의 시점에서 취했다. DHA 및 ARA에 대해 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)에 의해 샘플을 분석하였다.

[0228] 부동화 RO 리파제의 각각의 농도에서, 부동화 RO 리파제의 양이 증가함에 따라 DHA 및 ARA의 가수분해(%)가 증가하였다(도 27). 이 데이터는 리파제에 의해 제제를 예비가수분해하기 위한 티백 디바이스의 이용성을 나타낸다.

[0229] 실시예 9: 카트리지 내의 부동화 리파제에 의한 유아용 제제에서의 TG-DHA 및 TG-ARA의 가수분해

[0230] 리조푸스 오리자에(RO) 리파제 및 크로모박테리움 비스코숨(CV) 리파제는 거대다공성 아크릴 중합체 비드(Immobeads™, ChiralVision)에 부동화되었다. 대략 200mg의 RO 리파제를 비드 1밀리그램당 사용하였다. 부동화 리파제의 효력에 대한 조사의 효과를 결정하기 위해 CV 리파제 코팅 비드의 샘플을 조사하였다(CVI). 대략 1.7g의 각각의 비드 제제(RO, CV, 및 CVI)를 대략 5mL의 흡착제 용적으로 컬럼들에 패키징하였다. DHA 및 ARA 트리글

리세라이드를 포함하는 유아용 제제를 75ml/시간의 유속으로 컬럼 위로 통과시켰다. HPLC에 의한 DHA 및 ARA 가수분해에 대해 컬럼 용리물을 분석하였다. CV, CVI, 및 RO 리파제들에 의한 DHA 및 ARA 트리글리세라이드의 가수분해(%)가 표 6에 기재되어 있다.

표 6

[0231]

부동화 리파제 카트리지를 사용한 TG-DHA 및 TG-ARA의 가수분해

	컬럼 패킹	가수분해(%) TG-DHA	가수분해(%) TG-ARA
CV	5ml	92.50	41.00
CVI	5ml	71.90	34.50
RO	5ml	98.79	94.85

[0232]

실시예 10: RO 리파제 대 판크레아틴 리조푸스 오리자에(RO) 리파제는 췌장 리파제들, 프로테아제들, 및 아밀라제들의 혼합물을 포함하는 돼지 판크레아틴(Zenpep®)보다 DHA 및 ARA 트리글리세라이드에 훨씬 더 높은 활성을 나타냈다. 1.4ml의 유아용 제제를 100 μ l의 리파제(판크레아틴 또는 RO 리파제) 및 DHA 및 ARA의 100 μ l의 각각의 트리글리세라이드와 혼합하였다. 반응물을 37°C에서 15분 동안 항온처리하였다. 샘플을 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 및 15분의 시점에서 취하고, DHA 및 ARA에 대해 RP-HPLC에 의해 분석하였다. DHA(도 28a) 및 ARA(도 28b) 트리글리세라이드는 시간에 따라 RO 리파제에 의해 가수분해되지만, 판크레아틴에 의해서는 가수분해되지 않았다.

[0233]

실시예 11: 6주 돼지 연구: 부동화 리파제에 의한 예비 가수분해된 제제에 의한 돼지들의 장기간 공급

[0234]

6마리의 건강한 돼지들 및 수술 유도된 외분비 췌장 부전증(EPI)을 갖는 20마리의 돼지들(실시예 5 참조)을 2주 적응/대조 기간 후 6주 시험 기간(도 29)을 겪게 하였다. 적응 기간 동안, 모든 돼지들에게 NAN Pro 1 Gold 유아용 제제(Nestle)("IF")를 공급하였다. 시험 기간 동안, 건강한 돼지들("건강한") 및 EPI를 갖는 6마리의 돼지들("EPI")에게 TG-LCPUFA로 강화된 유아용 제제(실시예 5 및 6 참조)를 공급하고; EPI를 갖는 7마리의 돼지들에게 "티백" 디바이스("EPI + iRO")를 사용하여 부동화 RO 효소로 예비 가수분해된 TG-LCPUFA 강화 유아용 제제를 공급하였다. 남은 돼지는 완전한 EPI 유도 수술 실패와 같은 다양한 이유로 연구로부터 배제되었다.

[0235]

예비 가수분해를 위해, 37°C에서 1.5리터의 물을 50mg/kg TG-DHA 및 100mg/kg TG-ARA로 강화된 500g의 분말화 제제와 혼합하여 2리터의 NAN Pro 1 Gold(Nestle) 유아용 제제를 제조하였다(실시예 5, 섹션 5.3 참조). 비드에 서 부동화된 RO 리파제(각각의 "티백"에서 1그램의 부동화 리파제)를 포함하는 4개의 티백형 디바이스를 내지 2리터의 제제에 첨가하고 일정한 혼합 속도로 자기 교반기를 사용하여 실온에서 15분 동안 혼합하였다. 이는 강화 제제 중의 전체 지방 150그램(60U/g의 전체 지방)당 부동화 RO 리파제의 9,000단위(올리브유에 대해 측정된)에 상응한다. 가수분해 전에, 강화 제제는 17.4mmol/리터의 비에스터화 지방산을 포함하였다. 가수분해 후에, 상기 제제는 107.6mmol/리터의 비에스터화 지방산을 포함하였다.

[0236]

식품 소모량을 매일 측정하였다. 혈액 및 대변 샘플을 적응 기간("기초") 종료시, 및 치료 기간 1, 4, 및 6주 후 수집하였다. 기초 샘플의 경우, 48시간(2x24h) 동안 대변을 수집하였다. 1, 4, 및 6주 샘플들의 경우, 72시간(3x24h) 동안 대변을 수집하였다. 치료 기간 종료시, 흡수 및 안정성 실험을 위해 장기들 및 조직을 수집하였다.

[0237]

예비 가수분해된 제제는 효과적이며, (육안 검사에 의해) 식품 섭취, 성장, 장기들에서, 또는 일반적인 웰빙에서의 어떠한 치료 관련 변화도 없었다. 6주 연구의 종료시 돼지를 희생할 때 간의 육안 검사에 따르면 지방간 발생은 없었다.

[0238]

6주 후, 예비 가수분해(EPI) 없이 TG-LCPUFA 강화 제제를 공급받은 EPI 돼지들과 비교하여 예비 가수분해된 제제(EPI+iRO)를 공급받은 EPI 돼지들에서 적혈구들(각각 20% 및 36%)에서의 ARA(도 30a) 및 DHA 수치들(도 30b)에서 통계학적으로 유의적인 증가가 있었다. ARA 및 DHA의 적혈구 수치는 건강한 돼지들과 6주 동안 예비 가수분해된 제제를 공급받은 EPI 돼지들 사이에 유의적으로 다르지 않았다.

[0239]

표 7에 나타난 바와 같이, 6주 동안 예비 가수분해된 제제를 공급받은 EPI 돼지들에서 트리글리세라이드, 콜레스테롤, HDL, 및 LDL의 혈장 수치의 통계학적으로 유의적인 증가가 있었다. 트리글리세라이드, 콜레스테롤, HDL, 및 LDL의 혈장 수치는 건강한 돼지들과 6주 동안 예비 가수분해된 제제를 공급받은 EPI 돼지들 사이에 유의적으로 다르지 않았다.

표 7

[0240]

그룹	트리글리세라이드s	콜레스테롤	HDL	LDL
건강한	4.13±0.68	0.51±0.25	2.04±0.31	1.27±0.33
EPI	2.69±0.56	0.22±0.07	1.46±0.41	0.69±0.35
EPI + iRO	4.09±1.47*	0.44±0.19*	1.93±0.46*	1.13±0.54*

[0241]

(모든 값은 mmol/ℓ 단위. 별표는 EPI와 EPI+iRO 사이의 차이에 대한 $p<0.05$ 를 나타냄.) 표 8에 나타낸 바와 같이, 6주 동안 예비 가수분해된 제제를 공급받은 돼지는 비타민 A 및 E의 혈장 수치가 증가하였지만, 비타민 D에 유의적인 차이가 없었다. EPI와 EPI+iRO 그룹 사이에 비타민 E의 혈장 수치에서 통계학적으로 유의적인 차이($p<0.05$)가 있었다. 비타민 A의 경우, EPI와 건강한 그룹 사이의 통계학적으로 유의적인 차이($p<0.05$)가 있었지만, EPI+iRO과 건강한 그룹 사이에는 없었다.

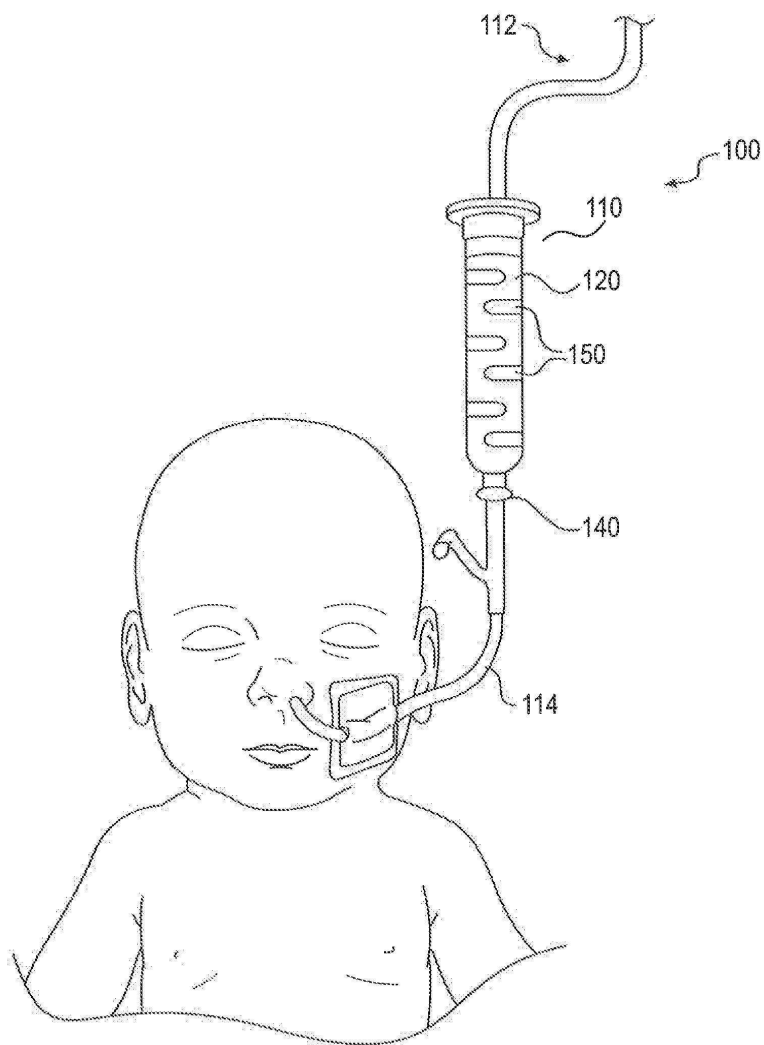
표 8

[0242]

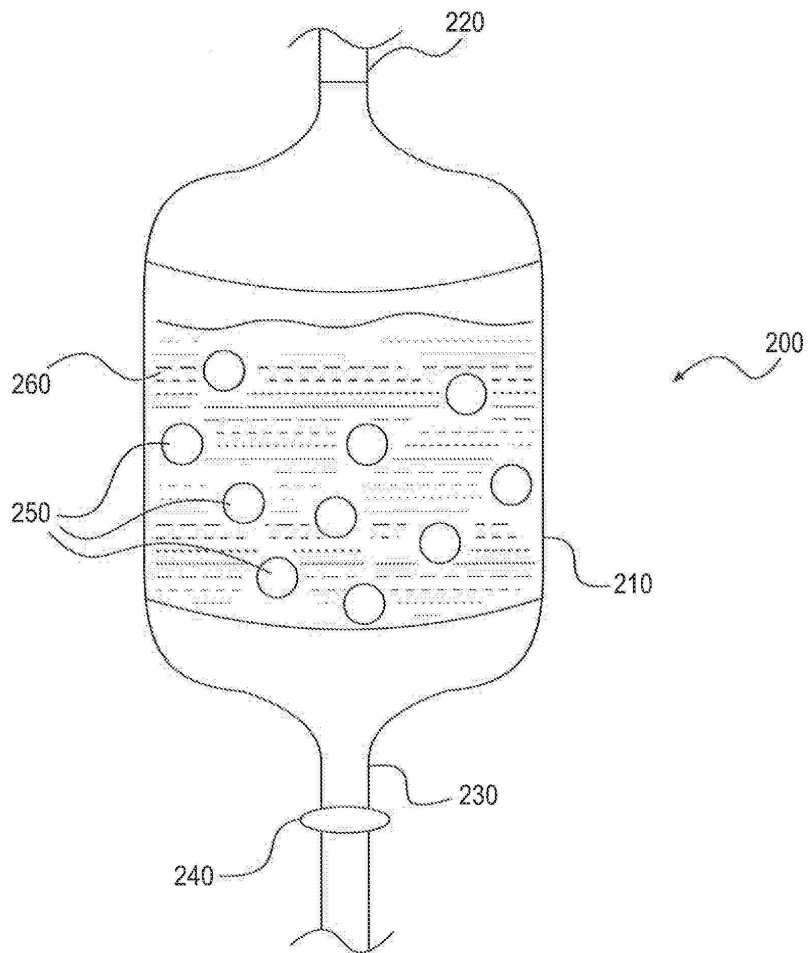
그룹	알파-토코페롤 mg/ml 비타민 E	레티놀 mg/ml 비타민 A	25-OH-D3 ng/ml 비타민 D
건강한	6.6±1.4	0.34±0.06	9.4±2.0
EPI	0.8±0.4	0.18±0.06	10.4±3.6
EPI + iRO	1.5±0.9*	0.26±0.17	10.2±4.1

도면

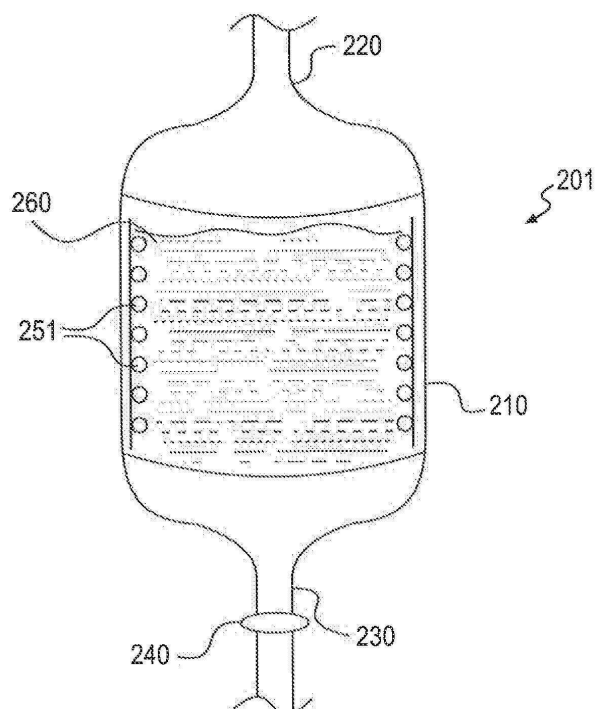
도면1



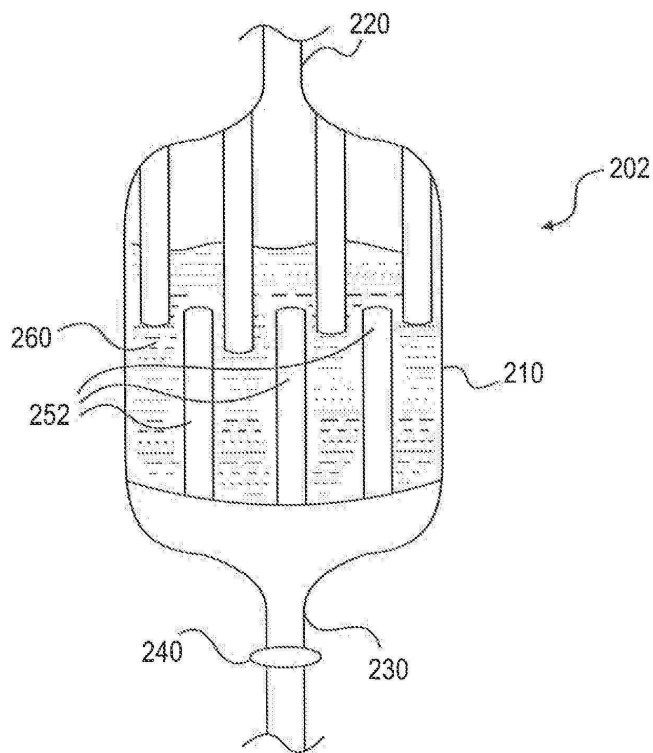
도면2a



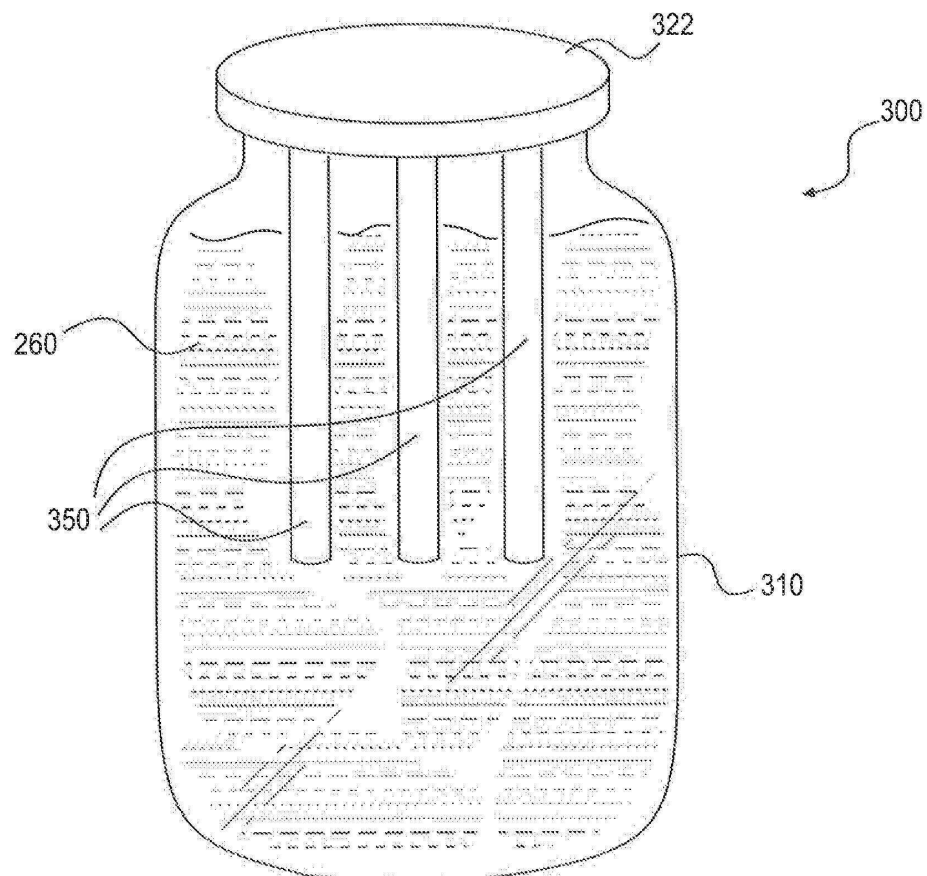
도면2b



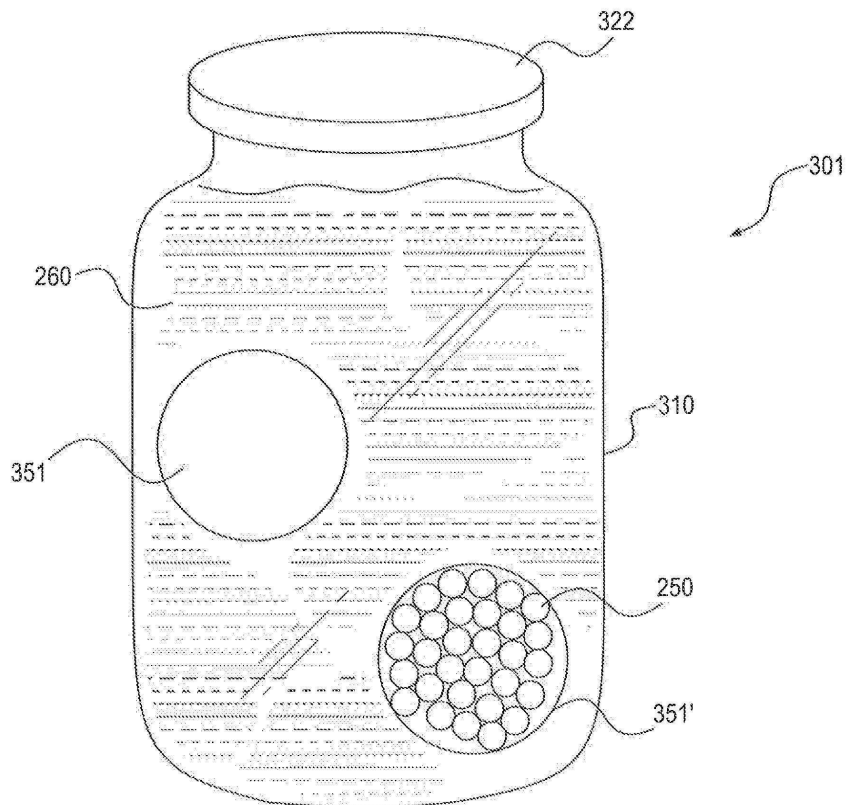
도면2c



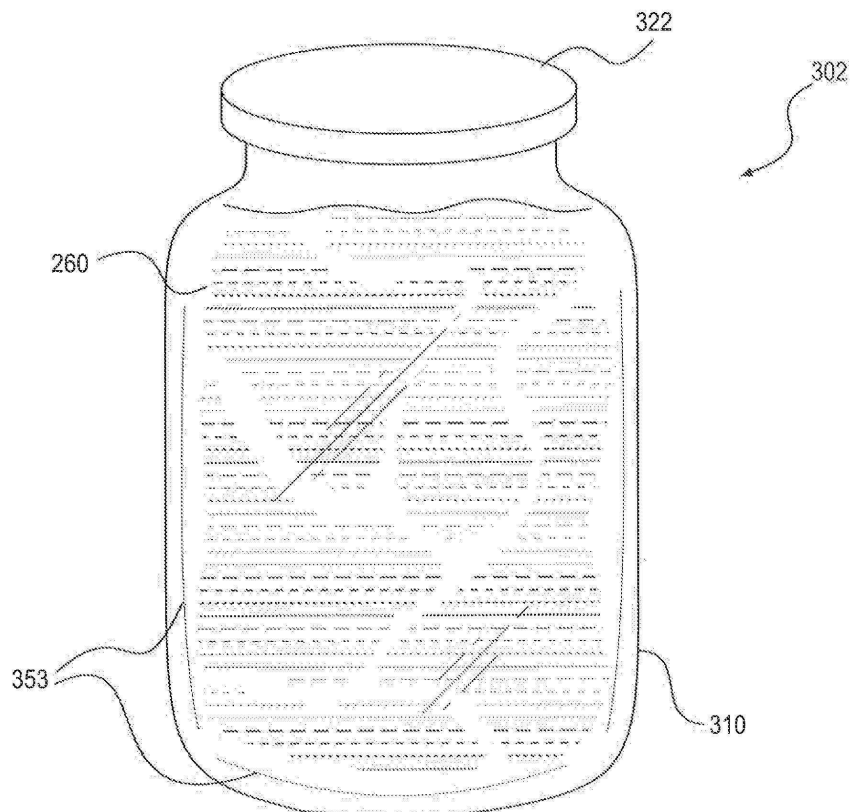
도면3a



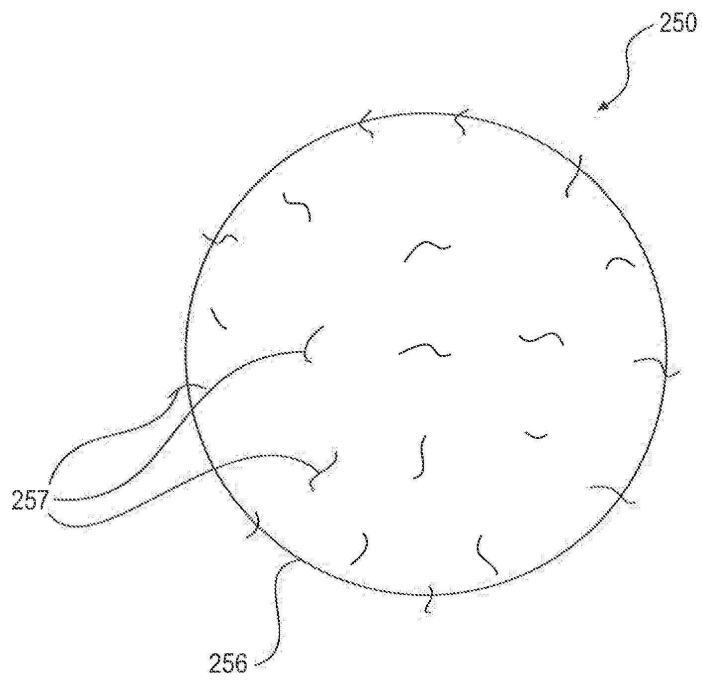
도면3b



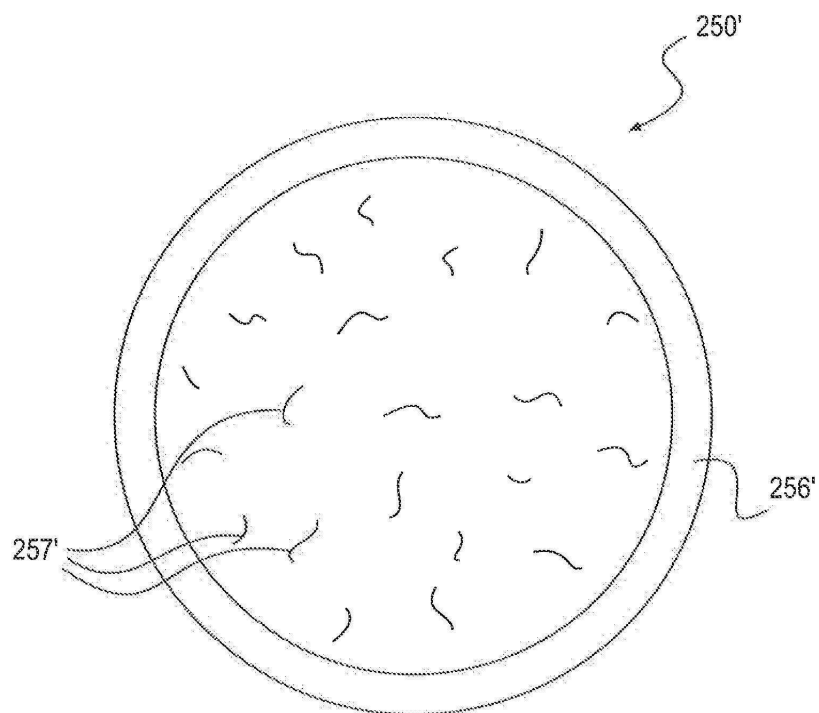
도면3c



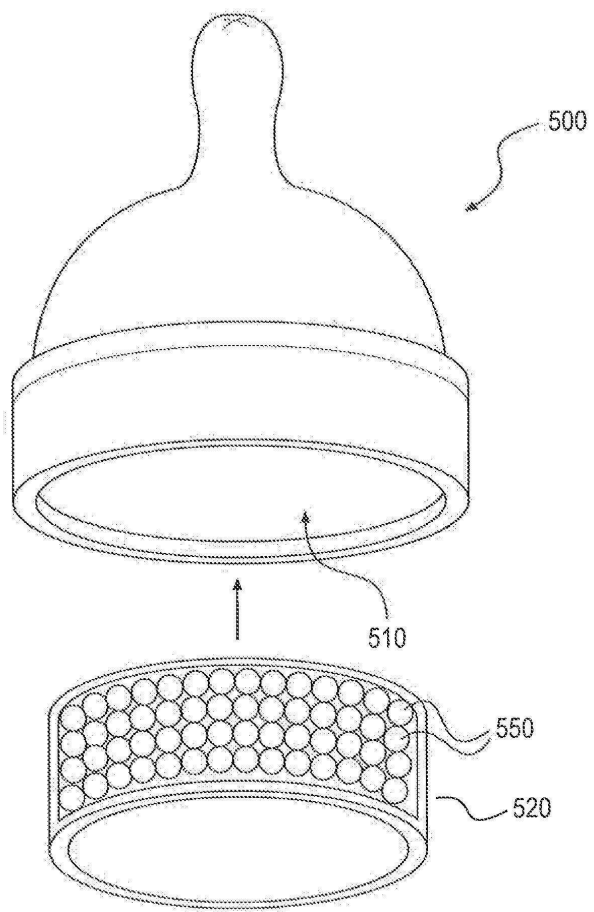
도면4a



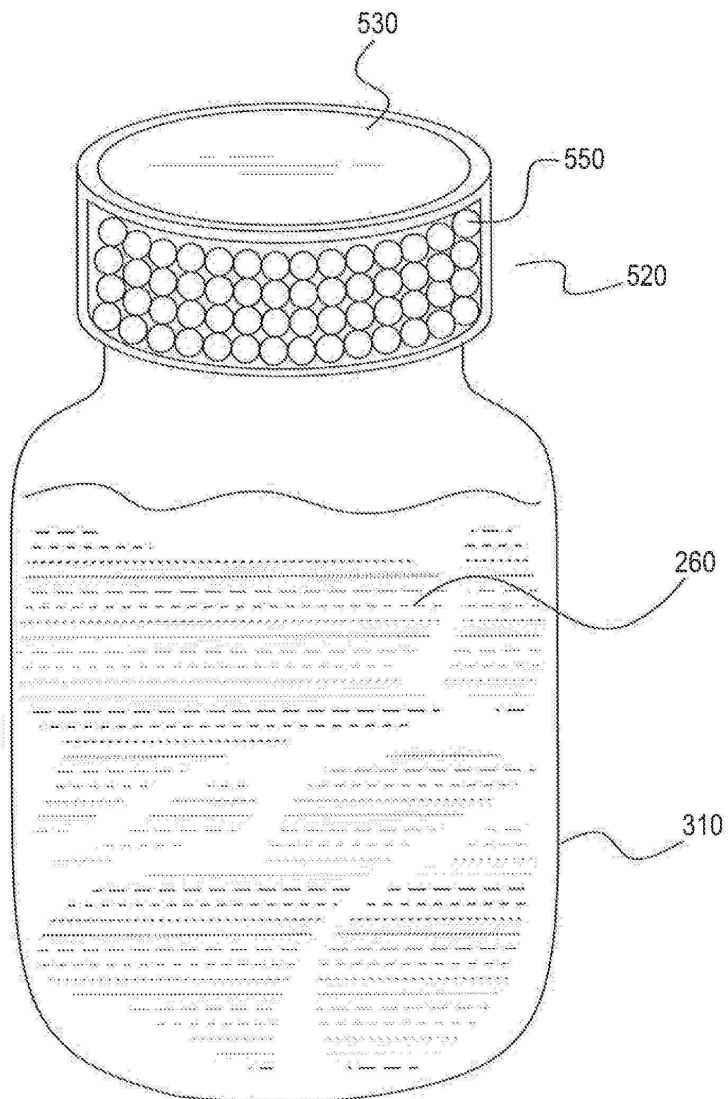
도면4b



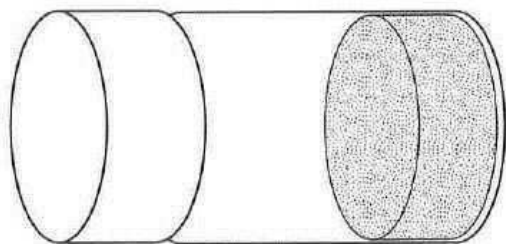
도면5a



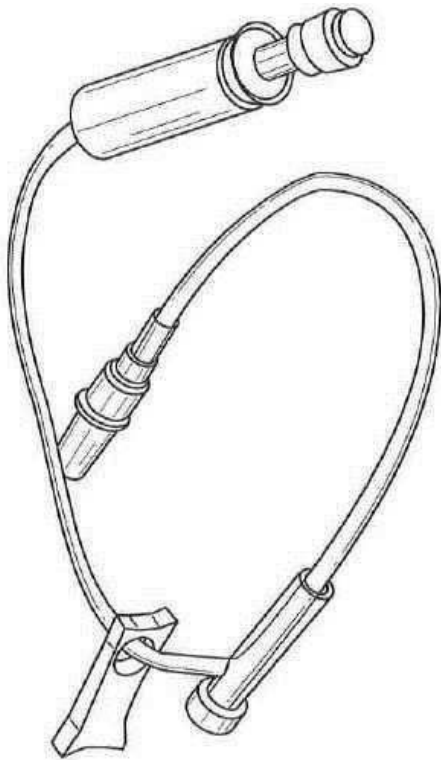
도면5b



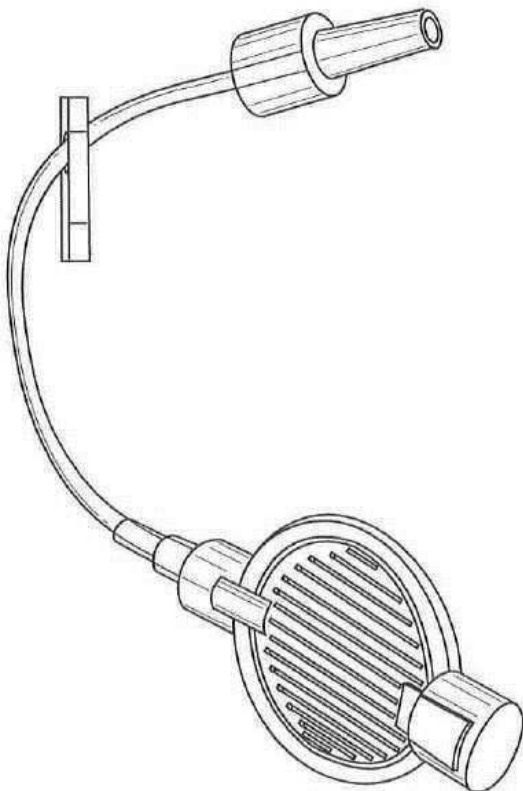
도면6a



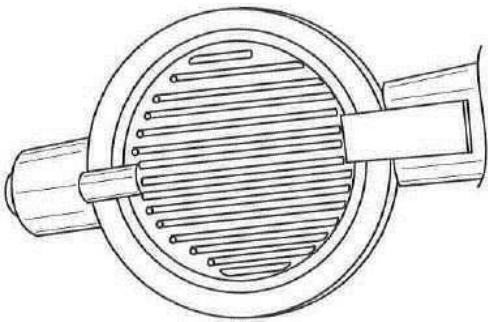
도면6b



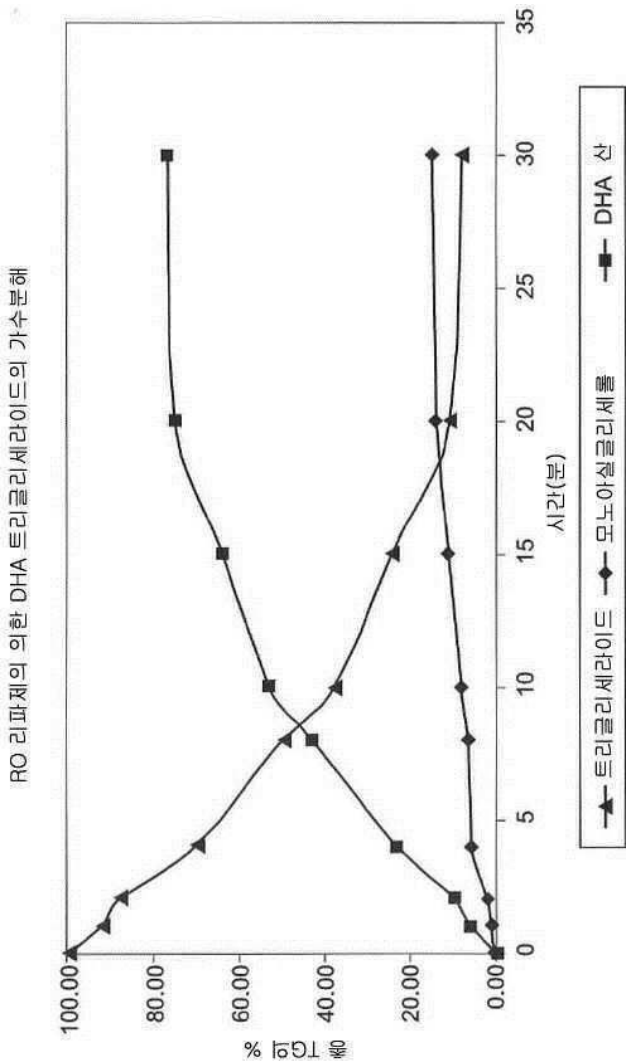
도면6c



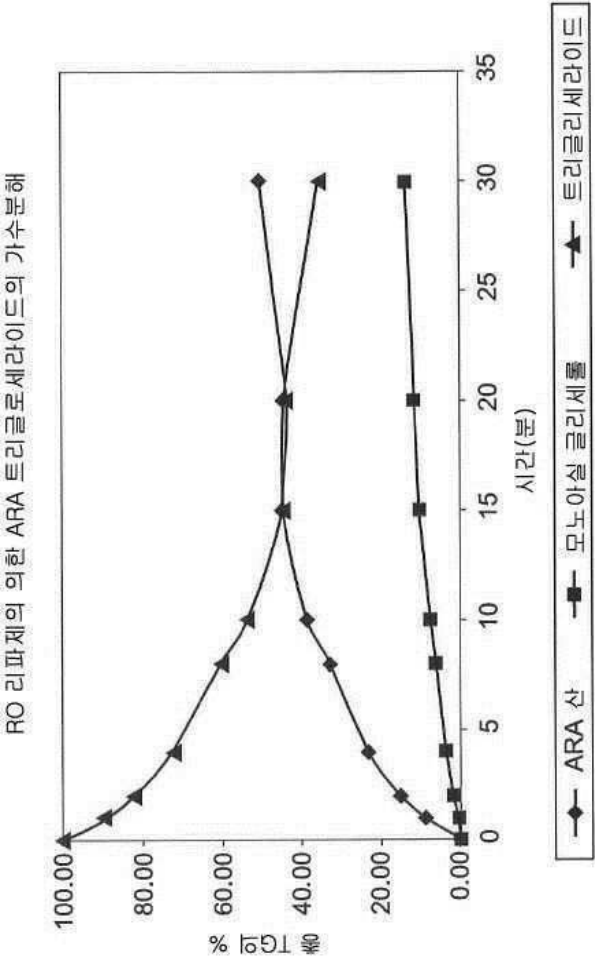
도면6d



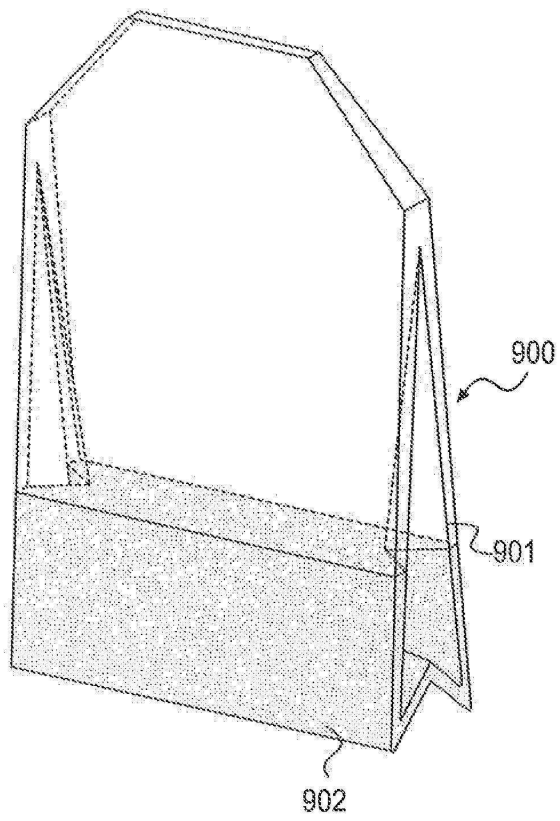
도면7



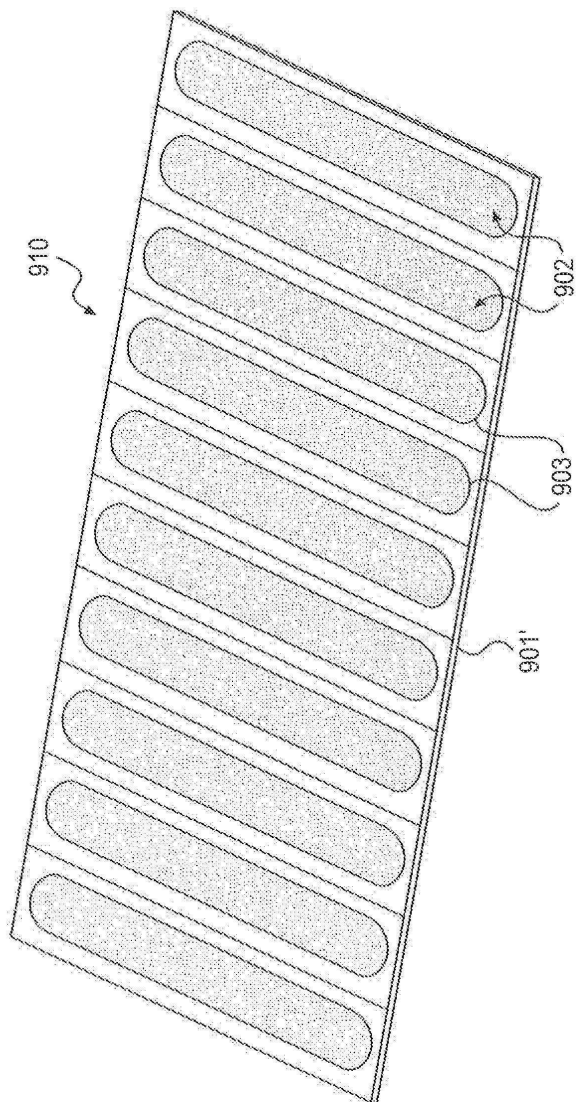
도면8



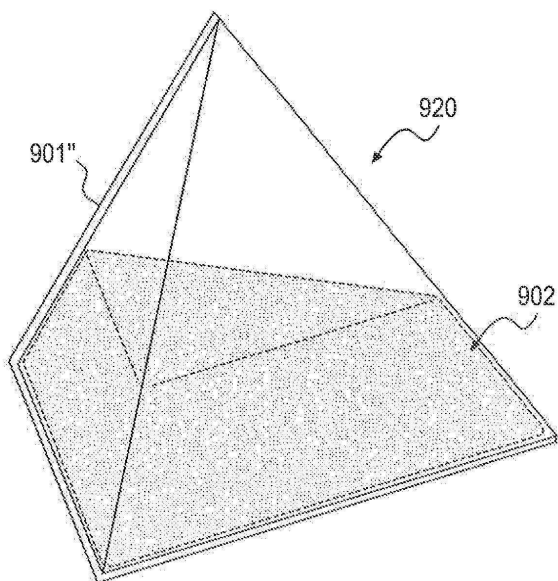
도면9a



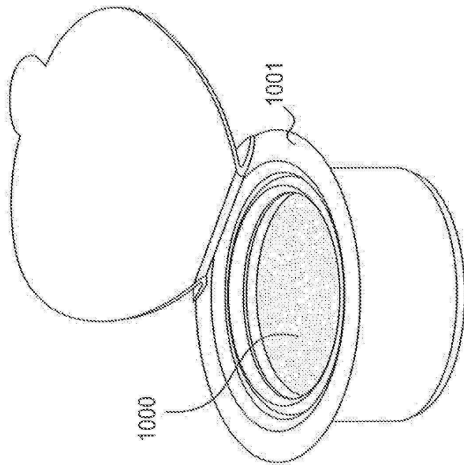
도면9b



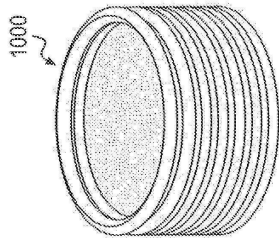
도면9c



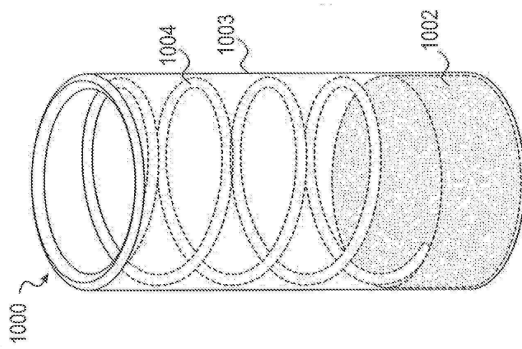
도면10a



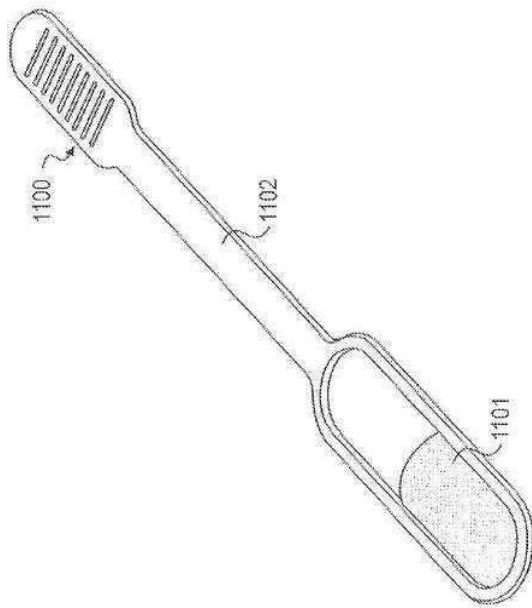
도면10b



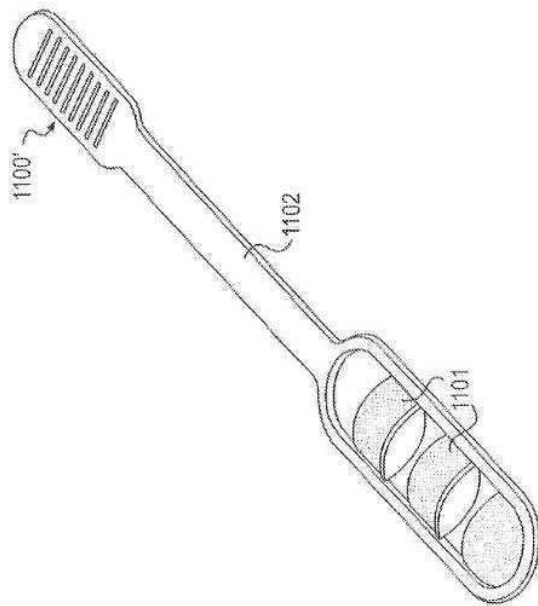
도면10c



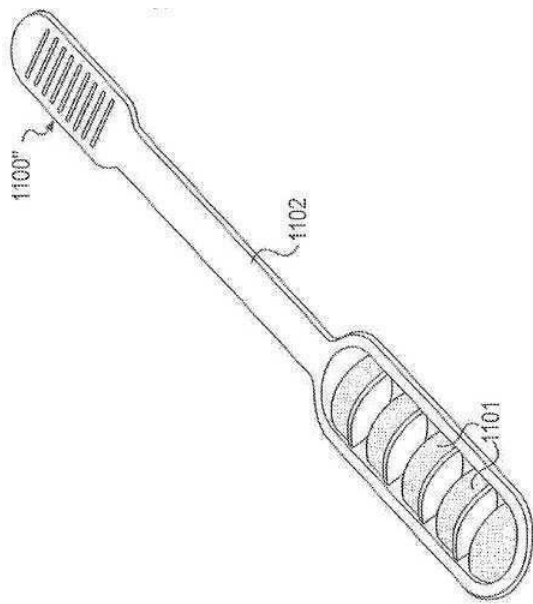
도면11a



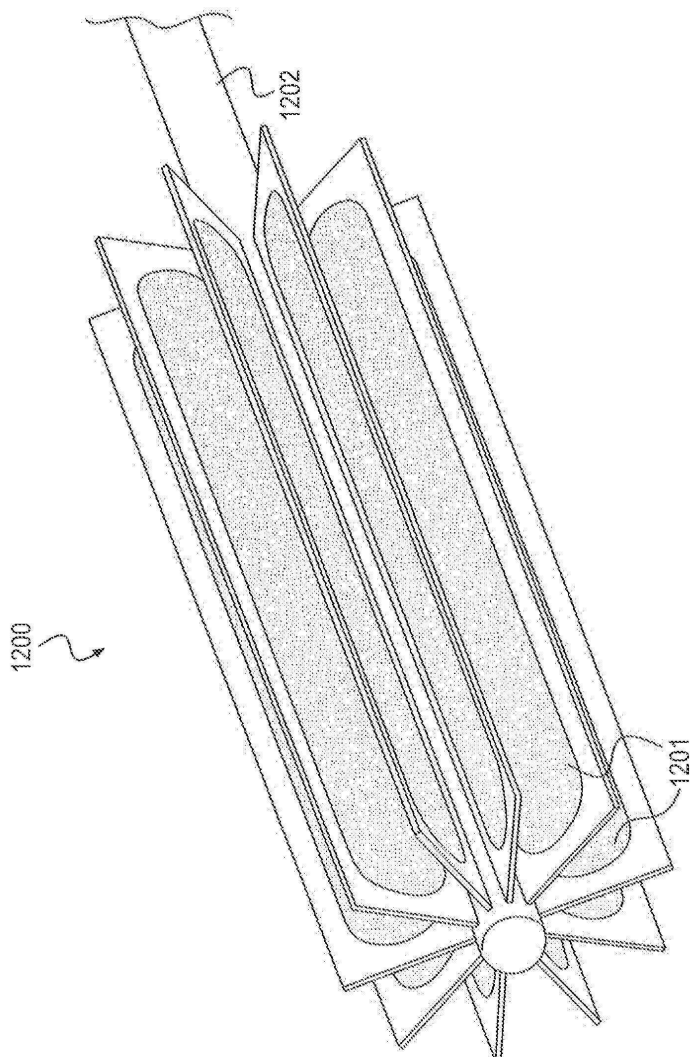
도면11b



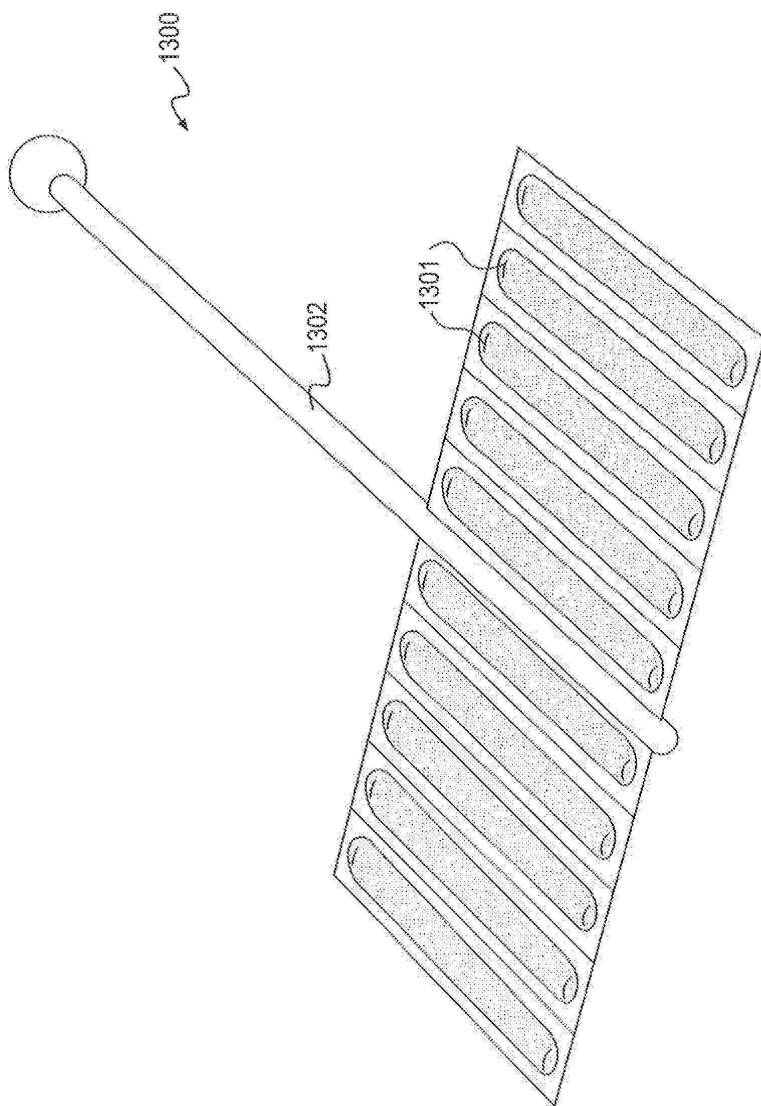
도면11c



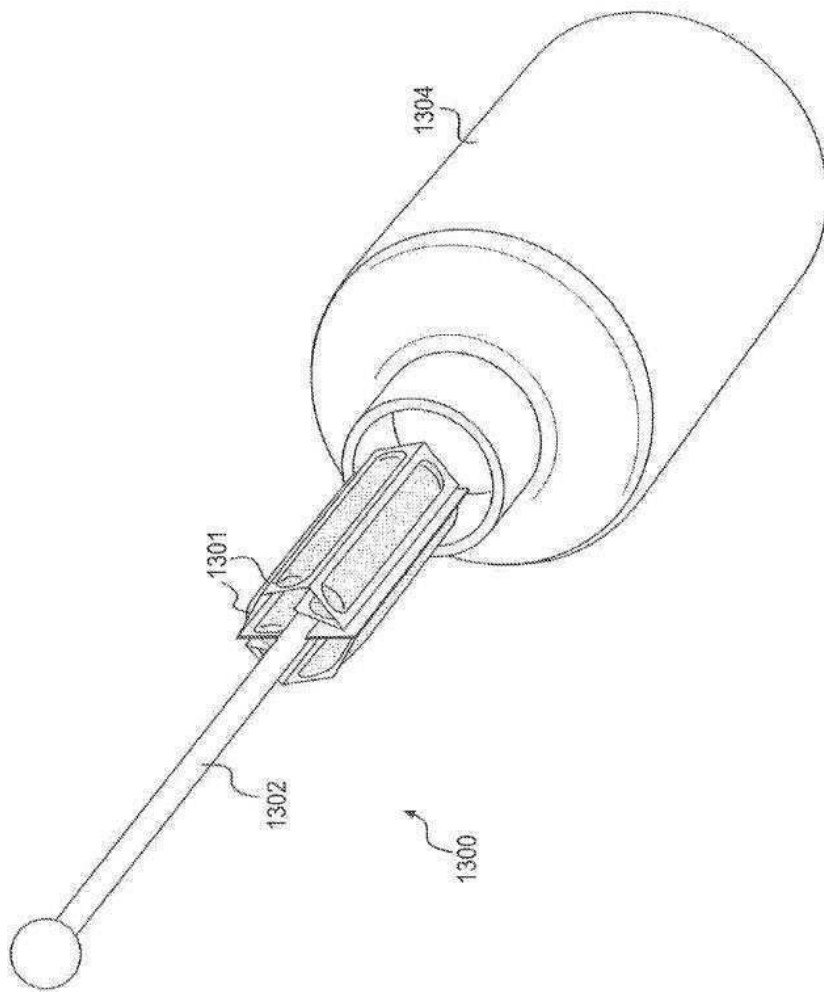
도면12



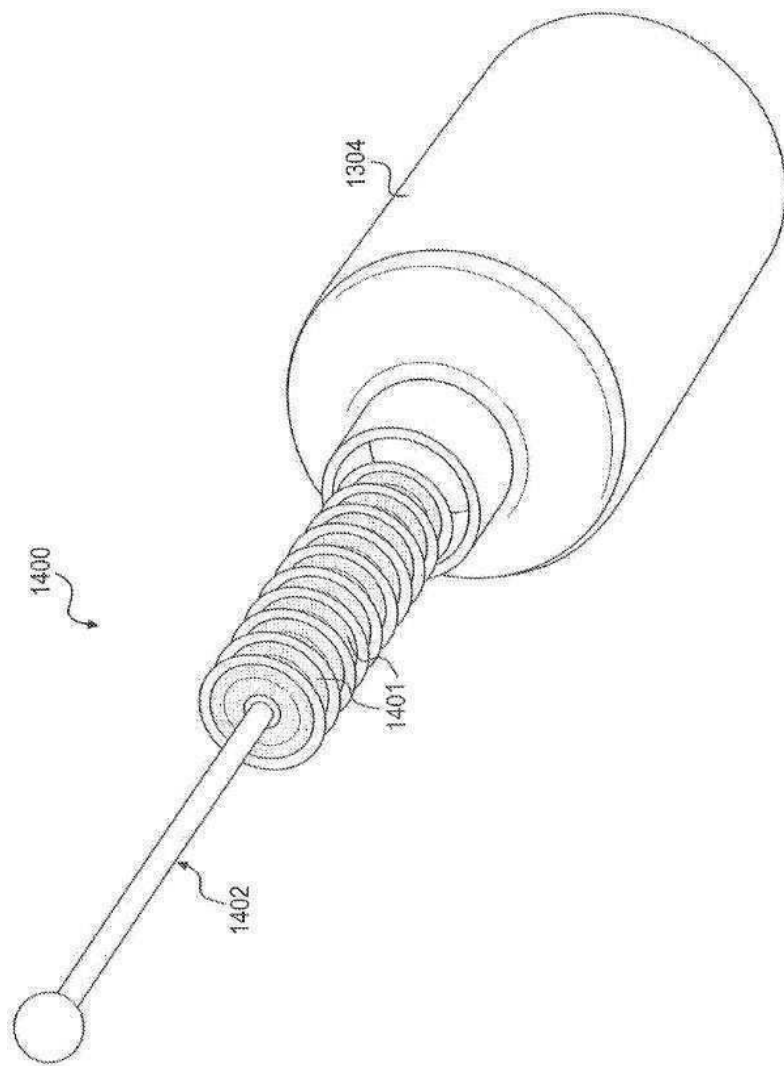
도면13a



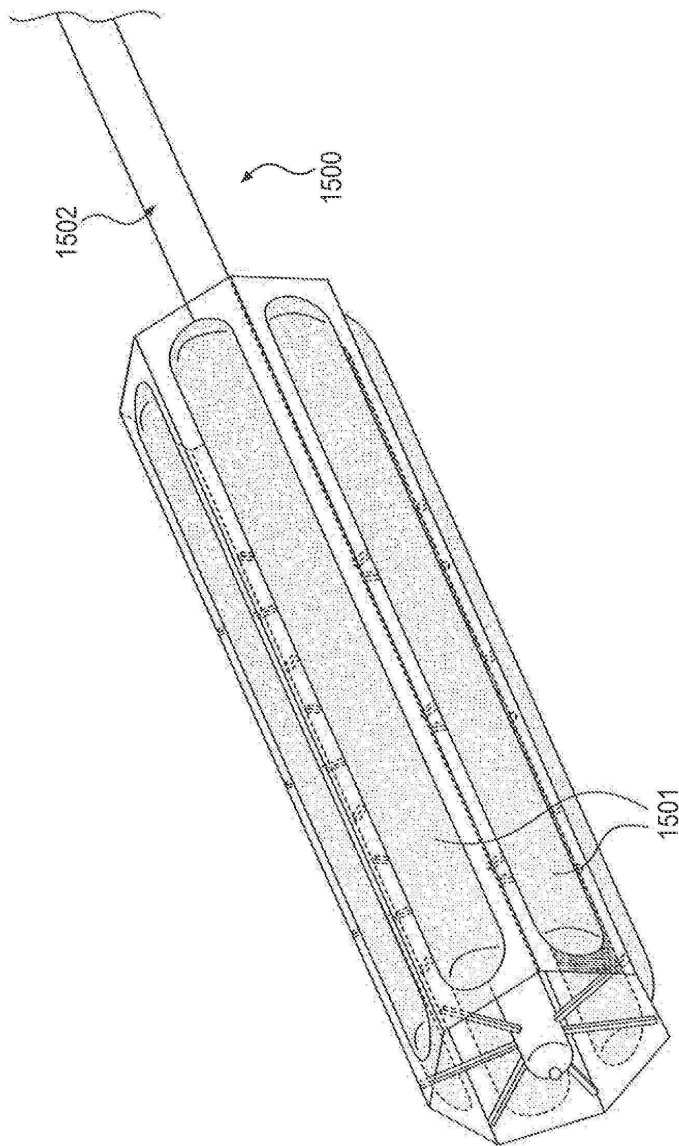
도면13b



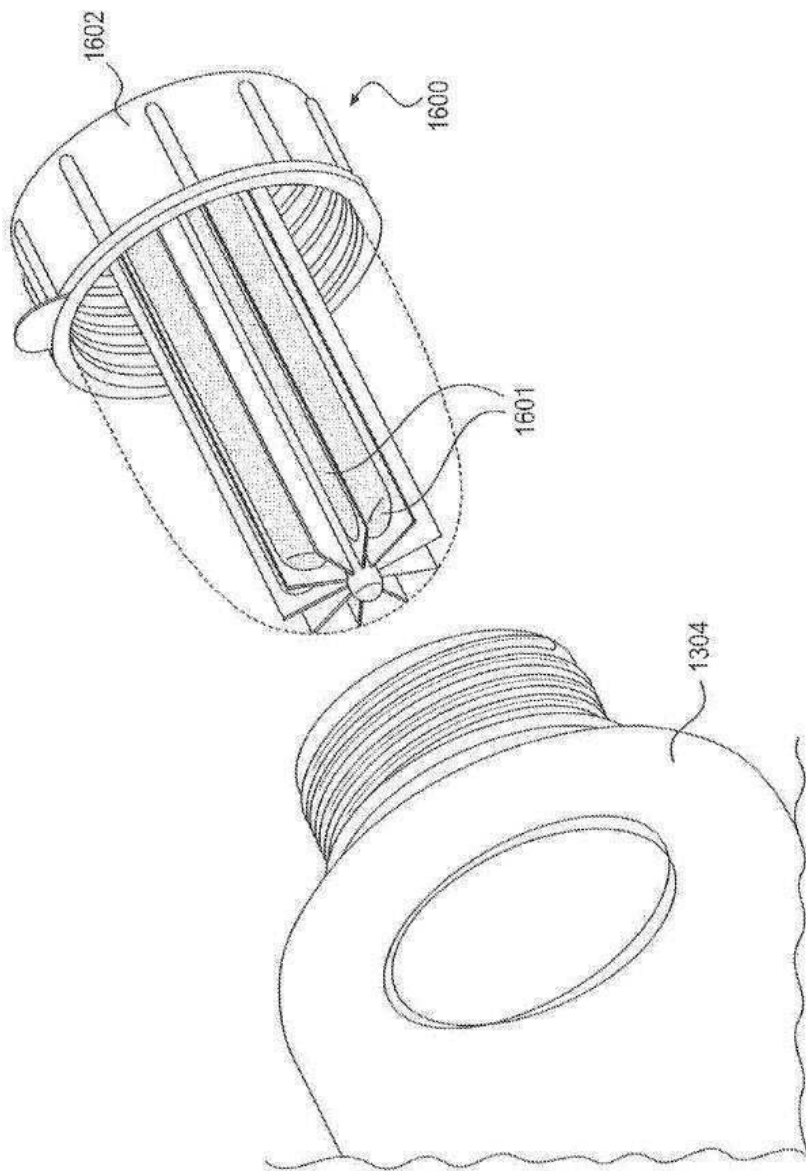
도면14



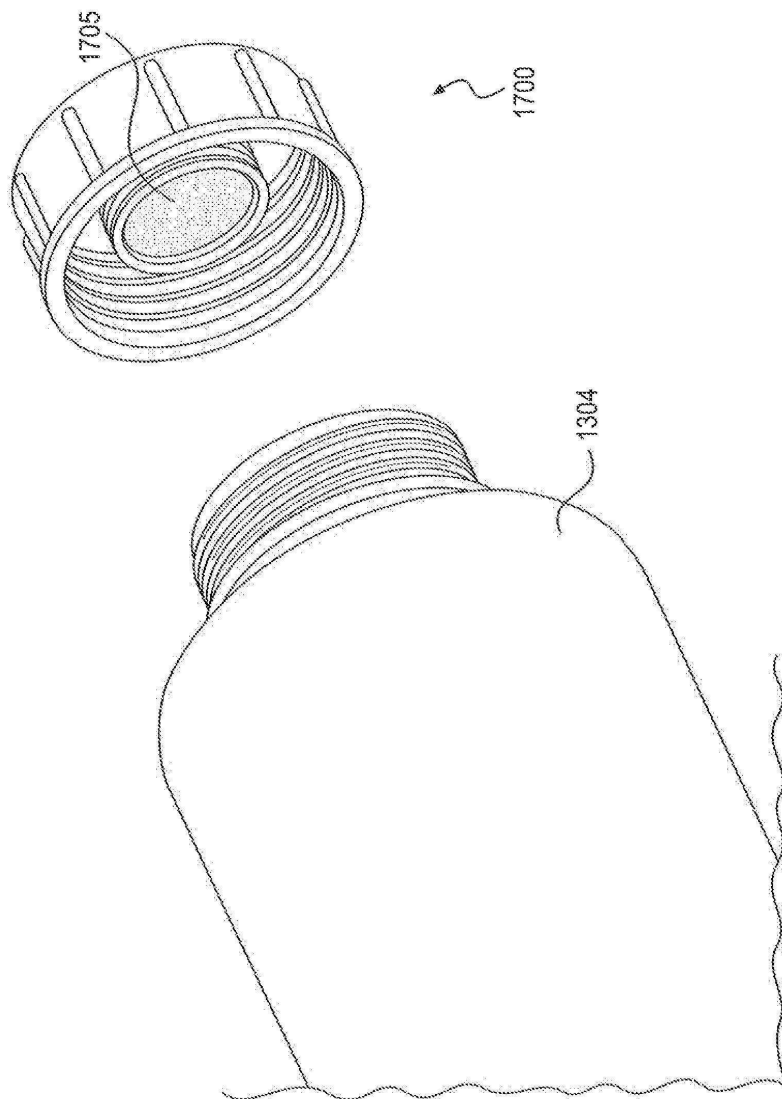
도면15



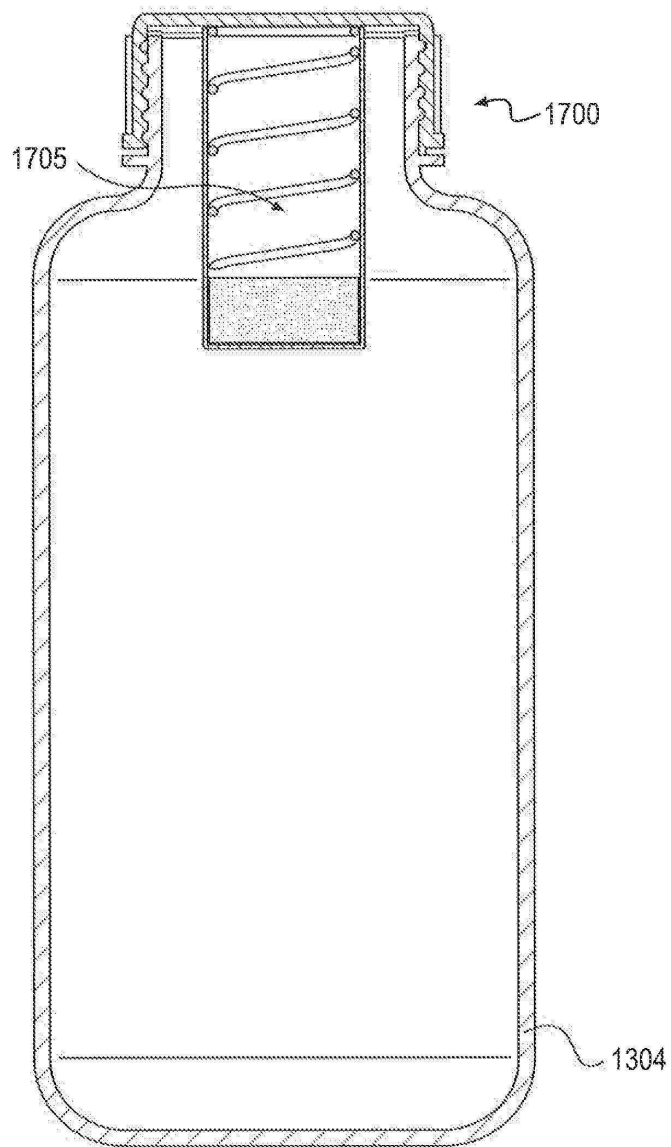
도면16



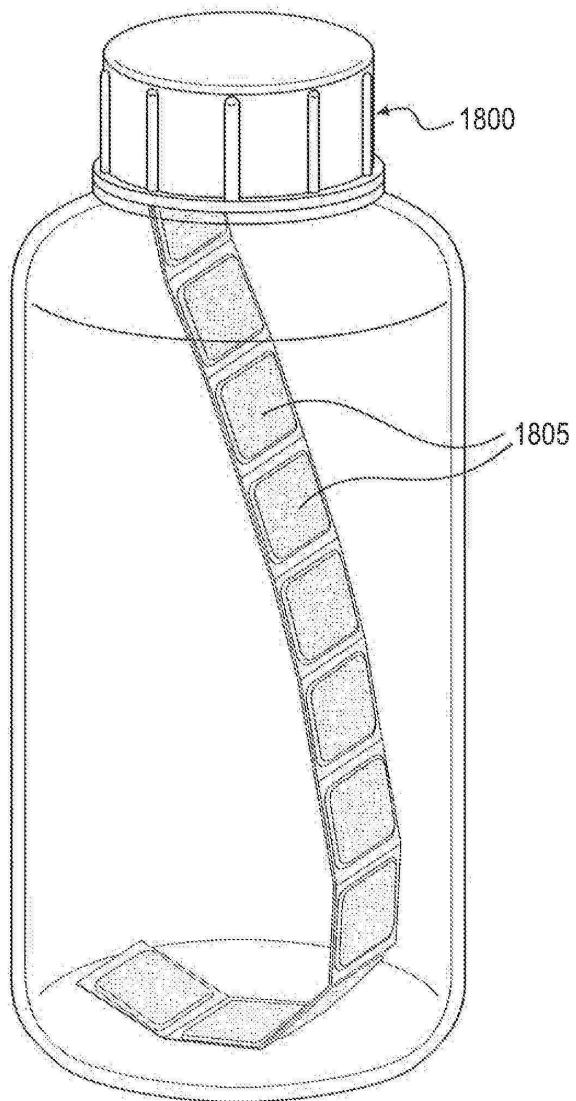
도면17a



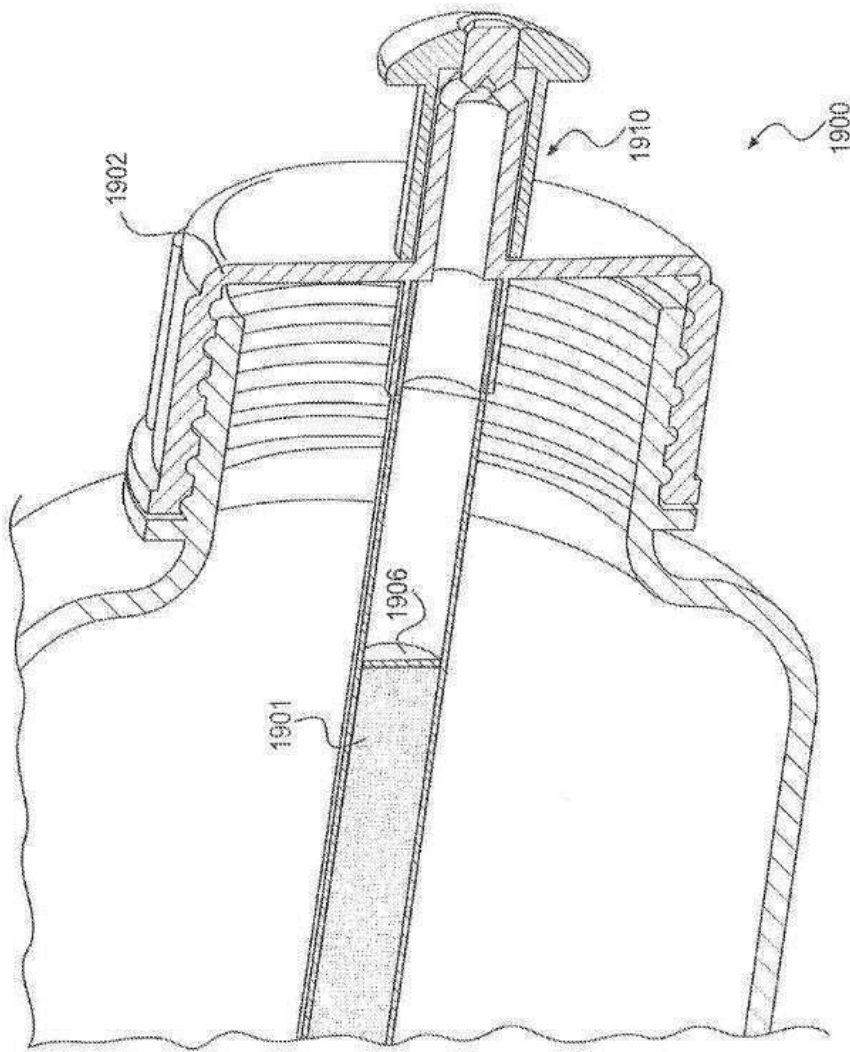
도면17b



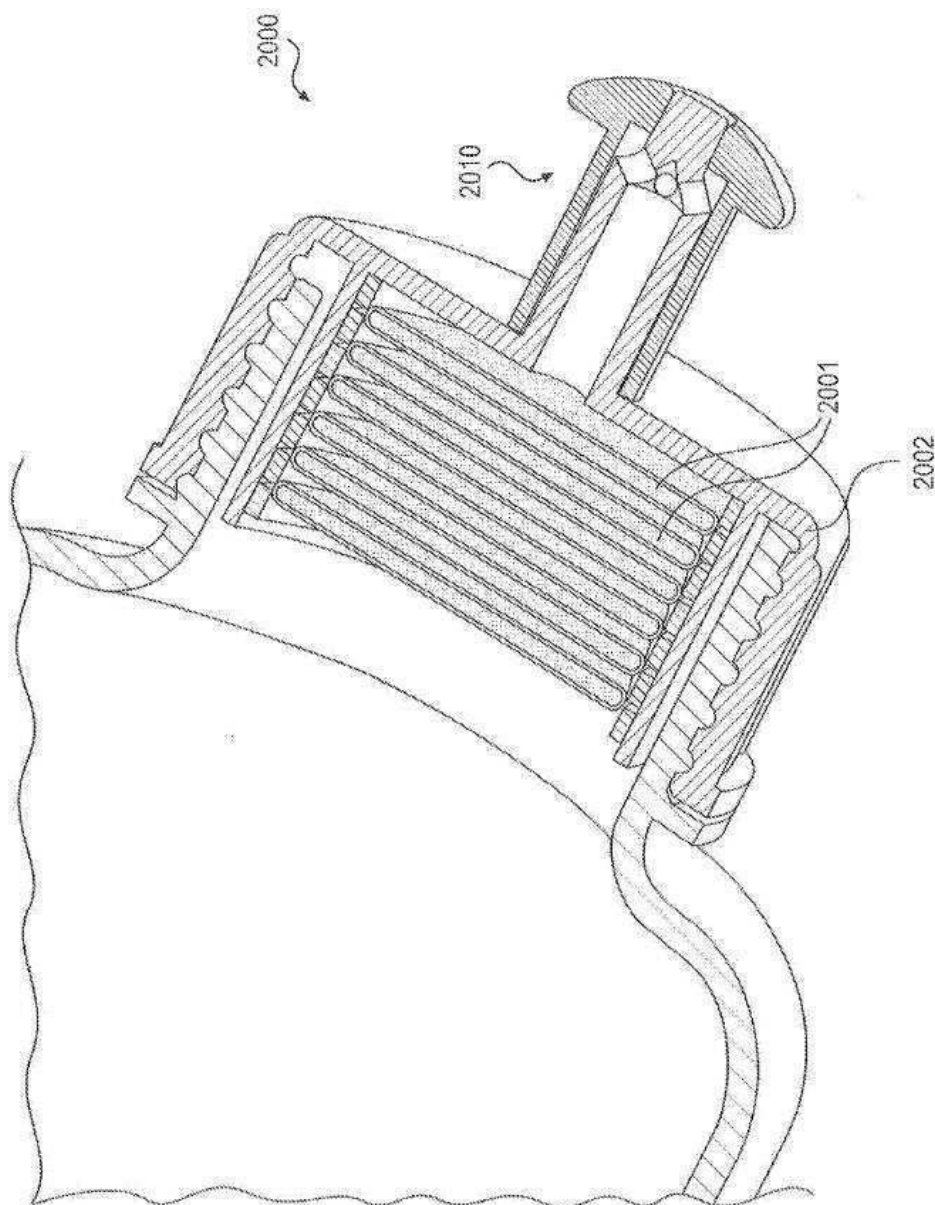
도면18



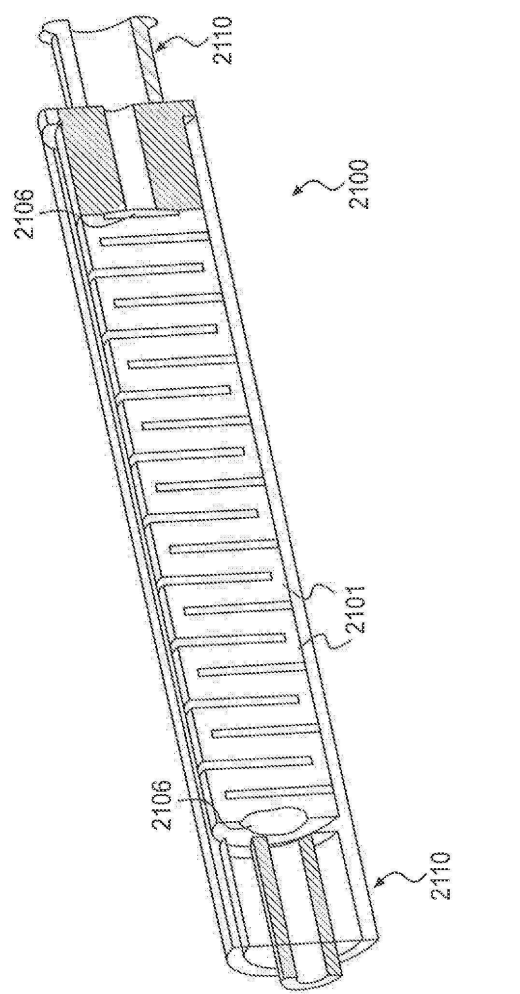
도면19



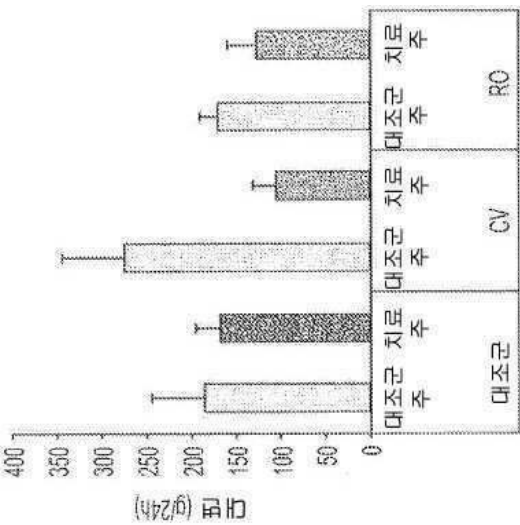
도면20



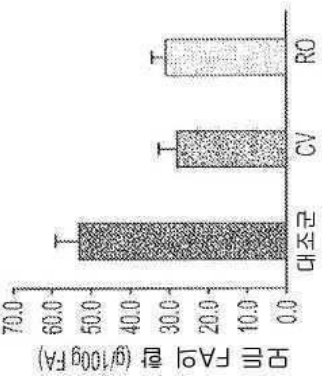
도면21



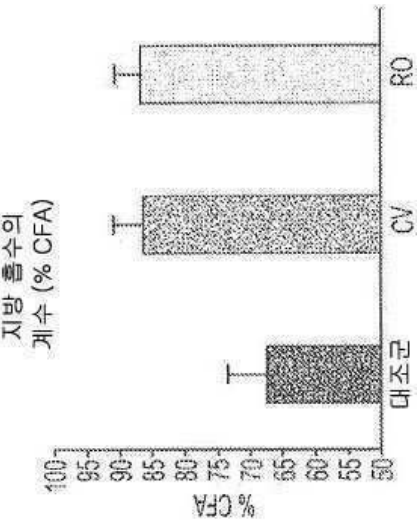
도면22a



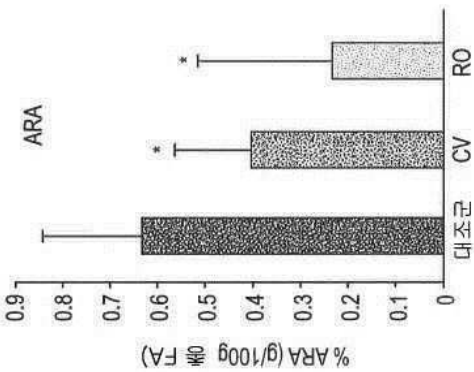
도면22b



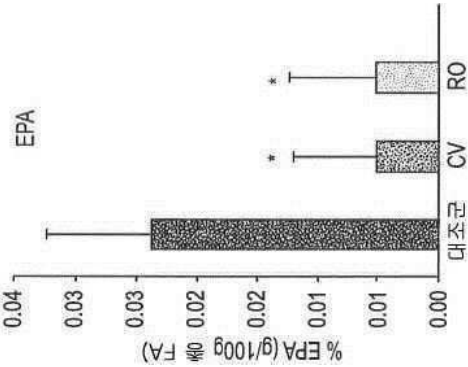
도면22c



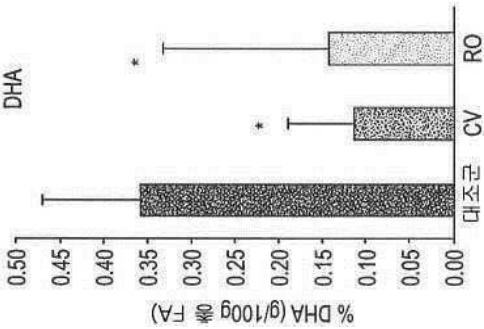
도면23a



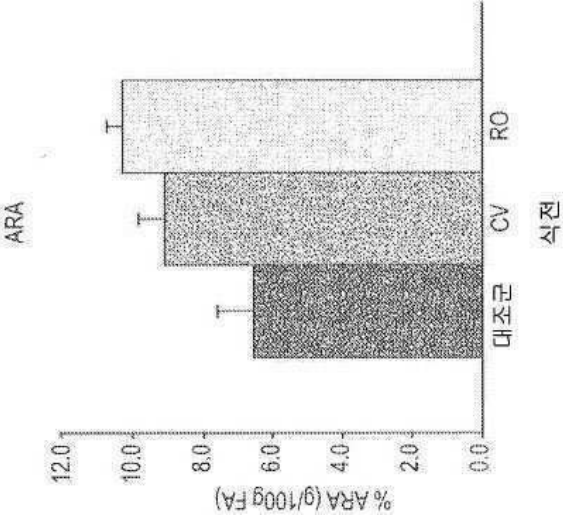
도면23b



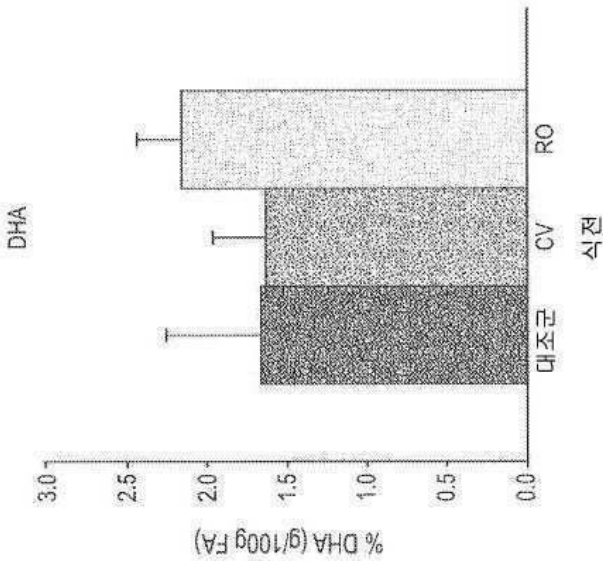
도면23c



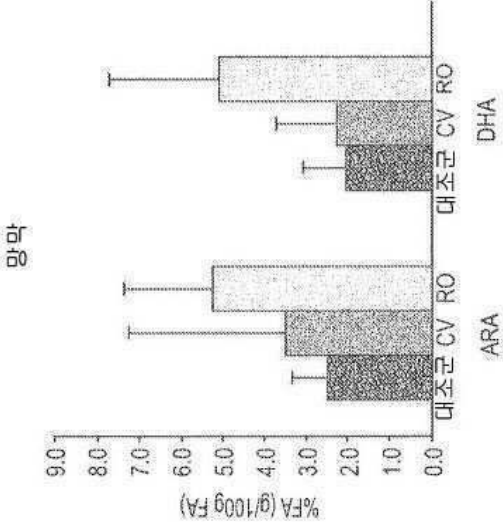
도면24a



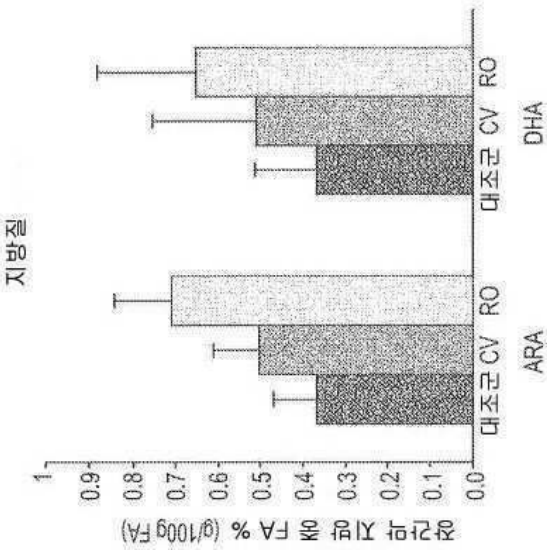
도면24b



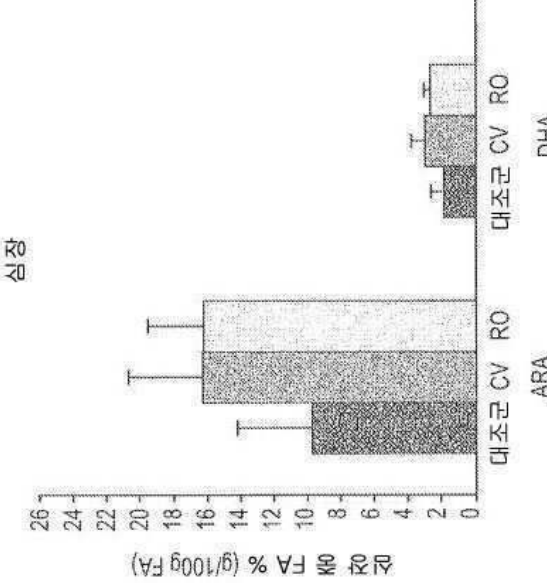
도면25a



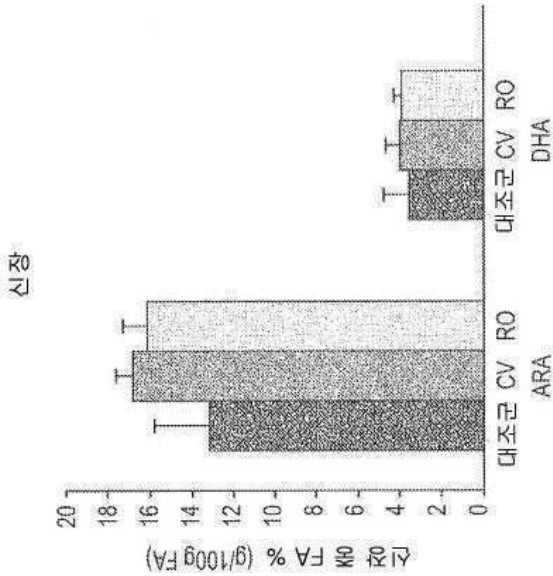
도면25b



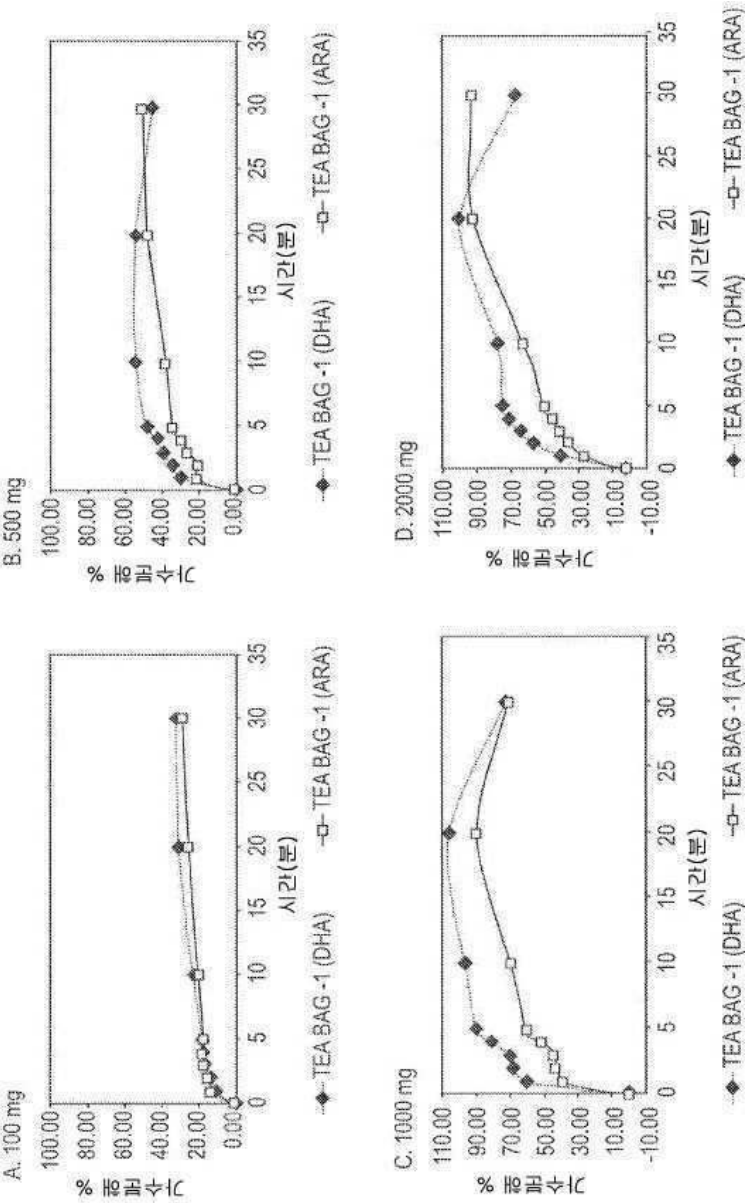
도면26a



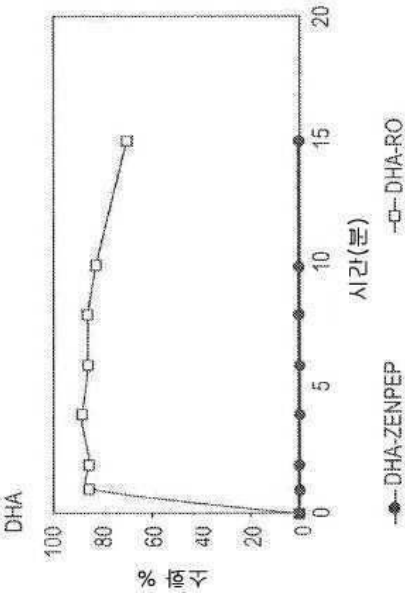
도면26b



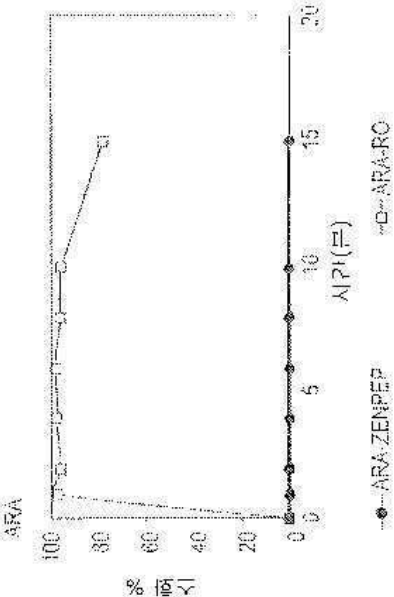
도면27



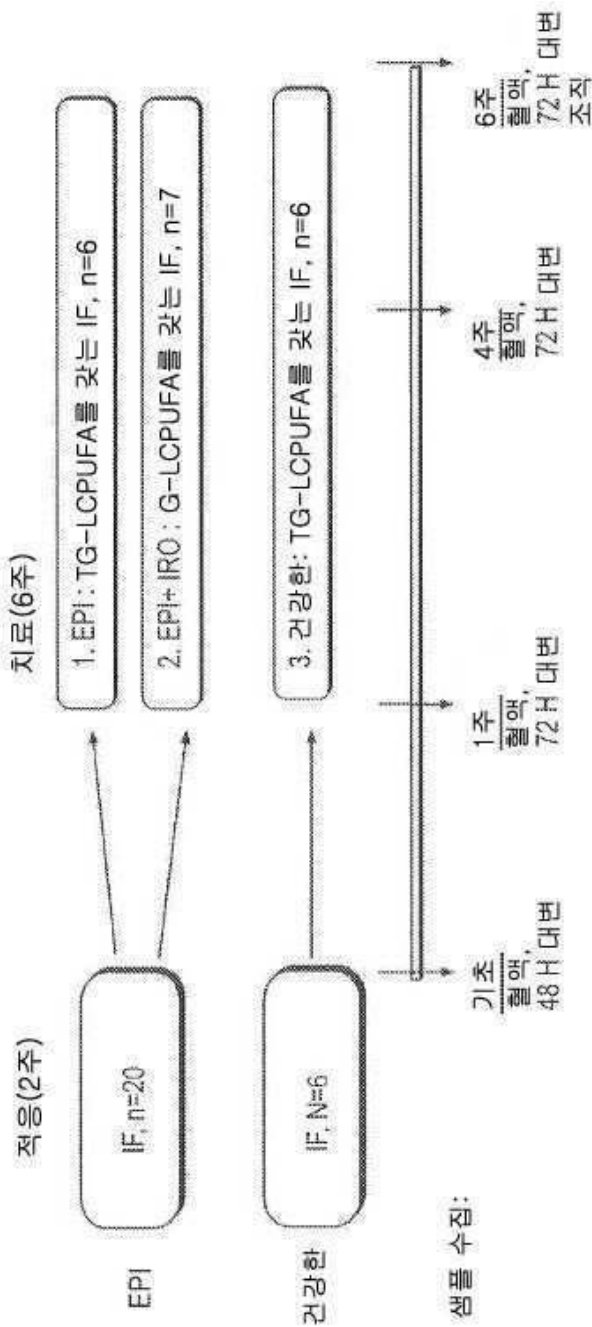
도면28a



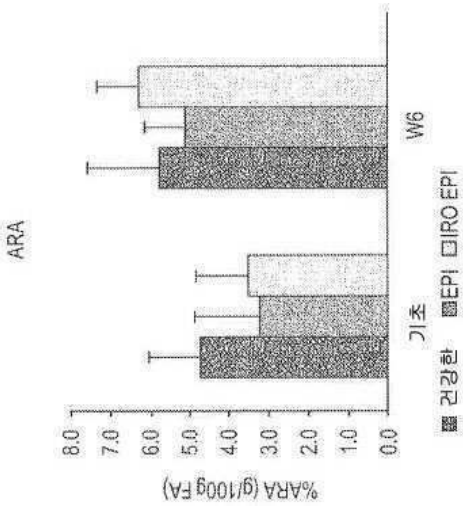
도면28b



도면29



도면30a



도면30b

