

명세서

발명의 명칭: 리파제를 이용하는 식물성 오일로부터 내 인성 카나비노이드 유사체의 제조방법 및 이의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 리파제를 이용하여 식물성 오일로부터 내인성 카나비노이드 유사체 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 인체 내인성 카나비노이드 시스템(endo-cannabinoid system, ECS)은 1990년경 대마(Cannabis) 유래의 THC(Tetrahydrocannabinol)의 작용기작을 연구하면서 발견된 복잡한 세포신호전달(cell-signaling) 시스템이다. 인체 ECS는 다양한 세포에 존재하는 카나비노이드 수용체인 CB1, CB2, TRPV1 등을 통해 세포에 신호전달을 하며 수면, 감정상태, 통증, 식욕, 기억, 임신, 에너지 및 대사와 면역시스템 등 다양한 생리현상의 조절시스템에 관여한다.
- [4] 이러한 이유로 대마 및 헴프 유래의 카나비노이드 약물이 뇌전증뿐 아니라 항암, 치매, 파킨슨 치료제 그리고 통증완화, 지방간, 피부염 등 폭 넓게 치료할 수 있을 것으로 기대되어 다양한 치료제 개발이 진행되고 있다. 한편, 대마 유래의 THC는 향정신성(psychoactive) 물질로 사용이 제한되고 있으나, 미국, 일본, 태국 등 다양한 국가에서 그 유용성 때문에 의료용 대마 사용이 허가되었으며 한국 식품의약품안전처에서도 환자편의성 개선을 위해 대마의약품 취급절차 간소화를 추진하였다. 이와 같이, 카나비노이드의 다양한 의약적 활성이 확인되어 인체 의 약용 소재로 개발 필요성이 대두되고 있으나 대마 등 식물 유래의 카나비노이드는 생체내 분해 메커니즘이 명확하지 않고 대부분 소변으로 배출되지만 잔여성분이 장기간 체내 잔류로 인해 다양한 부작용을 유발할 수 있다.
- [5] 인체 내에서 식물성 카나비노이드와 유사한 역할을 하는 물질로 아난다미드(Anandamide, N-arachidonylethanolamide, AEA), 2-AG(arachidonoylglycerol) 등의 에이코사노이드(eicosanoid)가 발견되었으며 이는 내인성 카나비노이드(endo-cannabinoid)라고 명명되었다. 식물 유래의 카나비노이드와는 달리 내인성 카나비노이드는 지방산아미드 분해효소(FAAH, fatty acid amide hydrolase) 또는 모노아실글리세롤 리파제(MAGL, monoacylglycerol lipase)에 의해 생체 내에서 분해되는 메커니즘이 존재하므로 식물 카나비노이드에 비해 매우 안전한 물질로 인식된다. 따라서 내인성 카나비노이드 유사체의 제조 및 활용은 식물성 카나비노이드를 대체하는 안전한 카나비노이드를 제공할 수 있으며 다양한 용도 개발이 가능하다.
- [6] 생체 내에서 내인성 카나비노이드는 세포막에 존재하는 인지질(phospholipids)로부터 다이글리세라이드(diacylglyceride) 또는 N-아라키도닐-포스파티딜에타놀

라민(N-arachidonic-phosphatidylethanolamine)을 거쳐 생합성되는데, 이 반응에는 리파제(lipase), 인지질가수분해효소-D(phospholipase-D), 알파/베타 가수분해효소-4(hydrolase-4), 글리세로포스포다이에스터레이즈-1(glycerophosphodiesterase-1) 등의 다양한 효소가 단계적으로 참여한다. 따라서 인체 의약품 소재로 가치가 높은 내인성 카나비노이드를 대량생산하기 위한 시스템의 개발이 요구된다.

- [7] 한편, 리파제는 생물촉매 반응에 가장 많이 사용되는 효소로서, 리파제의 생물학적 기능은 기본적으로 지방(triacylglyceride)을 지방산(fatty acid)과 글리세롤(glycerol)로 분해하는 것이다. 자연계에 존재하는 기질의 다양성으로 인해 리파제는 매우 광범위한 기질 특이성을 갖도록 진화하였고 지방의 가수분해(hydrolysis) 뿐만 아니라 에스테르화 반응(esterification), 아마이드화 반응(amidation), 에스테르 교환(interesterification, transesterification), 아미노분해 및 교환반응(aminolysis, transamidation), 과가수분해(perhydrolysis) 등의 기능을 수행한다. 또한 리파제는 매우 안정한 효소로서 수용액뿐만 아니라 유기용매, 이온성 액체, 초임계 유체, DES(deep eutectic solvent) 등 다양한 액상 환경에서 반응을 수행할 수 있다.
- [8] 리파제의 종류는 매우 다양하지만 CalB(*Candida antarctica* lipase B)는 유기용매상에서 유기합성용 효소로 가장 많이 연구된 리파제이다. 특히 전세계적인 효소회사인 노보자임사가 CalB의 고정화 효소인 Lipozyme 435라는 제품명으로 시장에서 판매되고 있는 고정화 효소이다. CalB의 분자량은 33 kD이며 pI는 6.0, a/b 구조의 Ser-His-Asp catalytic triad를 갖는 전형적인 리파제이지만 불완전한 뚜껑(lid) 구조를 가지고 있기 때문에 일반적인 리파제와 다른 계면 활성화(interfacial activation) 특성을 보인다. Lipozyme 435는 시판 리파제중 가장 안정적이고 지방의 개질 및 유도체 생산, 바이오디젤 생산, 광학이성질체 분리 반응(racemic resolution), 폴리머 축합 또는 분해 반응 등 다양한 반응의 생물촉매로 이용되고 있다. 본 발명자들은 선행연구를 통해 CalB 효소의 개량체인 CalB1422-278 시리즈를 개발하여 중성지방 또는 지방산을 이용한 함유화합물(oleochemical) 생산 기술을 개발한 바 있다(한국특허 10-2225519).

[9]

발명의 상세한 설명 기술적 과제

- [10] 본 발명자들은 우수한 가수분해, 에스테르화 반응 및 아마이드화 반응을 보유하는 리파제 효소를 이용하여 식물성 오일로부터 내인성 카나비노이드 유사체를 제조하였고, 제조한 내인성 카나비노이드의 다양한 생리학적을 검증하여 본 발명을 완성하였다.

[11]

과제 해결 수단

- [12] 본 발명의 하나의 목적은 리파제를 이용하여 가수분해에 의해 2종 이상의 지방산을 제공하는 중성지방 함유 식물성 오일과 C2-6 아미노알코올의 아마이드화 반응을 수행하는 단계를 포함하는, 내인성 카나비노이드 유사체(endocannabinoid analogues)의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 다른 하나의 목적은 본 발명의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체를 유효성분으로 포함하는, 유해세균 생육억제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 본 발명의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체를 유효성분으로 포함하는, 암 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 본 발명의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 본 발명의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체를 유효성분으로 포함하는, 통증억제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [17] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 본 발명의 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [18] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 본 발명의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체를 유효성분으로 포함하는, 사료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [19] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 본 발명의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체를 유효성분으로 포함하는, 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [20] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 본 발명의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체를 유효성분으로 포함하는, 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

[21]

발명의 효과

- [22] 본 발명의 제조방법은 리파제를 이용한 효소 반응에 의해 식물성 오일로부터 내인성 카나비노이드 유사체를 간단한 공정을 통해 높은 전환율로 생산할 수 있을 뿐만 아니라, 이와 같이 제조된 일련의 내인성 카나비노이드 유사체는 암 질환 및/또는 염증성 질환에 대한 치료 효과 및 통증을 감소시키는 효과를 나타낼 뿐만 아니라 경구투여시 독성을 나타내지 않으므로 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[23]

도면의 간단한 설명

- [24] 도 1은 해바라기오일(Sunflower oil, SFO)과 아미노프로파놀(3-amino-1-propanol, AP)을 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [25] 도 2는 해바라기오일과 AP를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [26] 도 3은 해바라기오일과 에타놀아민(ethanolamine, EA)을 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [27] 도 4는 해바라기오일과 EA를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [28] 도 5는 해바라기오일과 모노이소프로파놀아민(monoisopropanolamine, MIPA)을 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [29] 도 6은 해바라기오일과 MIPA를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [30] 도 7는 해바라기오일과 아미노메틸프로파놀(2-amino-2-methyl-1-propanol, AMP)을 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [31] 도 8은 해바라기오일과 AMP를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [32] 도 9은 올리브오일(Olive oil, OLO)과 AP를 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [33] 도 10은 올리브오일과 AP를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [34] 도 11는 올리브오일과 EA를 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [35] 도 12은 올리브오일과 EA를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [36] 도 13은 코코넛오일(Coconut oil, CNO)과 AP를 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [37] 도 14은 코코넛오일과 AP를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [38] 도 15는 코코넛오일과 EA를 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [39] 도 16은 코코넛오일과 EA를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [40] 도 17는 대두유(Soybean oil, SBO)와 AP를 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [41] 도 18는 대두유와 AP를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.

- [42] 도 19은 대두유와 EA를 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [43] 도 20은 대두유와 EA를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [44] 도 21은 포도씨오일(Grapeseed oil, GSO)과 AP를 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [45] 도 22은 포도씨오일과 AP를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [46] 도 23은 달맞이꽃종자오일(Evening primrose oil, EPO)과 AP를 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [47] 도 24는 달맞이꽃종자오일과 AP를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과이다.
- [48] 도 25은 유채씨오일(Rapeseed oil, RSO)과 AP를 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [49] 도 26는 유채씨오일과 AP를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [50] 도 27는 유채씨오일과 EA를 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [51] 도 28은 유채씨오일과 EA를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [52] 도 29은 메도우폼씨오일(Meadowfoam seed oil, MFO)과 AP를 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [53] 도 30은 메도우폼씨오일과 AP를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [54] 도 31는 메도우폼씨오일과 EA를 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [55] 도 32은 메도우폼씨오일과 EA를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [56] 도 33은 아비시니안씨드오일(Abyssinica seed Oil, ABSO)과 AP를 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [57] 도 34은 아비시니안씨드오일과 AP를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [58] 도 35은 햄프씨드오일(Hempseed oil, HSO)과 AP를 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [59] 도 36는 햄프씨드오일과 AP를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [60] 도 37는 아보카도오일(Avocado oil, AVO)과 AP를 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.

- [61] 도 38은 아보카도오일과 AP를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [62] 도 39은 미강유(Rice bran oil, RBO)와 AP를 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [63] 도 40은 미강유와 AP를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [64] 도 41은 시어버터(Shea butter, SHB)와 AP를 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [65] 도 42는 시어버터와 AP를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [66] 도 43은 미세조류오일(Aurantiochytrium oil, ATO)과 AP를 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [67] 도 44는 미세조류오일과 AP를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [68] 도 45는 동백오일(Camellia oil, CAM)과 MIPA를 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [69] 도 46은 동백오일과 MIPA를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [70] 도 47은 홍화씨오일(Safflower oil, SFF)과 MIPA를 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [71] 도 48은 홍화씨오일과 MIPA를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [72] 도 49는 대두유와 AMP를 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [73] 도 50은 대두유와 AMP를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [74] 도 51은 올레산(Oleic acid)과 EA를 이용한 아미드화 반응의 GC 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [75] 도 52는 올레산과 EA를 이용한 아미드화 반응의 전환율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [76] 도 53은 양성대조군 CP55940의 카나비노이드 수용체1(CB1)에 대한 결합효율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [77] 도 54는 양성대조군 CP55940의 카나비노이드 수용체2(CB2)에 대한 결합효율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [78] 도 55는 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-EA의 카나비노이드 수용체1(CB1)에 대한 결합효율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [79] 도 56은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-EA의 카나비노이드 수용체2(CB2)에 대한 결합효율 분석 결과를 나타낸 도이다.

- [80] 도 57은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-AP의 카나비노이드 수용체1(CB1)에 대한 결합효율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [81] 도 58은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-AP의 카나비노이드 수용체2(CB2)에 대한 결합효율 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [82] 도 59는 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-EA의 황색포도균 생육억제효과 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [83] 도 60은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-EA의 대장균 생육억제효과 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [84] 도 61은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-EA의 살모넬라 생육억제효과 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [85] 도 62는 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-EA의 칸디다알비칸스 생육억제효과 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [86] 도 63은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-EA의 녹농균 생육억제효과 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [87] 도 64는 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-AP의 황색포도균 생육억제효과 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [88] 도 65는 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-AP의 대장균 생육억제효과 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [89] 도 66은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-AP의 살모넬라 생육억제효과 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [90] 도 67은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-AP의 칸디다알비칸스 생육억제효과 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [91] 도 68은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-AP의 녹농균 생육억제효과 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [92] 도 69는 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-EA의 NIH/3T3에 대한 세포독성 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [93] 도 70은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-EA의 HaCaT에 대한 세포독성 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [94] 도 71은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-AP의 NIH/3T3에 대한 세포독성 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [95] 도 72는 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-AP의 HaCaT에 대한 세포독성 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [96] 도 73은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-MIPA의 NIH/3T3에 대한 세포독성 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [97] 도 74는 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-MIPA의 HaCaT에 대한 세포독성 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [98] 도 75는 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 CAM-MIPA의 NIH/3T3에 대한 세포독성 분석 결과를 나타낸 도이다.

- [99] 도 76은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 CAM-MIPA의 HaCaT에 대한 세포독성 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [100] 도 77은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFF-MIPA의 NIH/3T3에 대한 세포독성 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [101] 도 78은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFF-MIPA의 HaCaT에 대한 세포독성 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [102] 도 79는 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-EA 및 SFO-AP의 폐암세포 사멸효과를 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [103] 도 80은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-EA 및 SFO-AP의 구강암세포 사멸효과를 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [104] 도 81은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-EA 및 SFO-AP의 전립선암세포 사멸효과를 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [105] 도 82은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-EA 및 SFO-AP의 방광암세포 사멸효과를 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [106] 도 83은 CNR2 siRNA 도입에 의한 폐암세포 사멸억제를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [107] 도 84는 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-EA의 NO 생성억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [108] 도 85는 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-AP의 NO 생성억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [109] 도 86은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-MIPA의 NO 생성억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [110] 도 87은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-AMP의 NO 생성억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [111] 도 88은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-MIPA의 염증성 사이토카인 IL-1 β 생성억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [112] 도 89는 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-MIPA의 염증성 사이토카인 IL-6 생성억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [113] 도 90은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-MIPA의 염증성 사이토카인 TNF- α 생성억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [114] 도 91은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-EA의 항천식 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [115] 도 92는 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-EA의 통증억제효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- [116] 도 93은 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-EA의 농도 의존적 통증억제효과를 단계별로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [117] 도 94는 본 발명의 일 실시예에 따른 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-EA의 동물 증제효과 및 사료효율 증진효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[118]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[119] 본 발명에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.

[120] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[121] 아울러, 본 발명의 명세서 전체에 있어서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[122]

[123] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[124]

[125] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 제1양태는 리파제를 이용하여 가수분해에 의해 2종 이상의 지방산을 제공하는 중성지방 함유 식물성 오일과 C₂₆ 아미노알콜의 아미드화 반응을 수행하는 단계를 포함하는, 내인성 카나비노이드 유사체(endocannabinoid analogues)의 제조방법을 제공한다.

[126]

[127] 본 발명의 용어, "리파제(lipase)"는 지방의 가수분해를 촉매하는 효소의 일종으로, 중성지방(triacylglyceride)을 가수분해하여 지방산(fatty acid)과 글리세롤(glycerol)을 형성하며, 자연계에 존재하는 기질의 다양성으로 인해 리파제는 매우 광범위한 기질 특이성을 갖도록 진화하였다. 일부 리파제는 지방의 가수분해(hydrolysis) 뿐만 아니라 에스테르화 반응(esterification), 산분해(acidolysis), 에스테르 교환(interesterification, transesterification), 아미노분해(aminolysis), 과가수분해(perhydrolysis) 등을 촉진할 수 있는 기능을 보유한 것으로 알려져 있다.

[128] 본 발명의 용어, "아미드화(amidation)"는 아미드 결합을 포함하는 화합물을 제공하는 반응을 의미하는 것으로, 이에 따라 생성되는 화합물은 R-C(=O)-NR'R"으로 표시되는 결합을 갖는 유기 아미드(organic amide) 또는 카르복사미드(carboxamide)라 알려진 화합물일 수 있다. 상기 아미드 결합은 단백질 주쇄의 일부일 때 펩타이드 결합이라고도 한다. 상기 아미드화는 일 화합물의 카르복실산 유도체의 히드록실기가 타 화합물의 아민기와 반응하여 상기 결합을 형성하는 것을 의미할 수 있다.

[129] 본 발명의 용어, "내인성 카나비노이드(endocannabinoid)"는 생체 내에서 생성되는 카나비노이드 수용체를 활성화하는 물질로서, 1988년 최초의 카나비노이드 수용체가 발견된 이래로 이에 대한 내인성 리간드를 발굴하기 시작하였다.

대표적인 내인성 카나비노이드는 아난다미드(anandamide)라 불리는 아라키돈산 에타놀아민(arachidonoyl ethanolamine, AEA)으로 확인된 최초의 화합물이다. 이는 구조적으로 상당히 상이함에도 불구하고 THC와 유사한 약리학을 가지고 있다. 상기 아난다미드는 중앙 및 말초 카나비노이드 수용체(각각 CB1 및 CB2)에 결합하여 부분 작용제(agonist)로 작용한다. 이외의 내인성 카나비노이드의 예로는 2-아라키돈산 글리세릴 에테르(2-Arachidonoyl glyceryl ether, noladin ether), N-아라키돈산 도파민(N-Arachidonoyl dopamine, NADA), 비로다민(Virodhamine, OAE) 등이 있으며, 이들 내인성 카나비노이드는 CB1 및/또는 CB2에 결합하여 작용제로 작용할 수 있다. 이에, 이들 내인성 카나비노이드와 유사하게 일 말단에 지방산을 포함하는 유사한 구조를 갖는 화합물로서, CB1 및/또는 CB2에 결합하여 작용제의 역할을 하는 물질을 내인성 카나비노이드 유사체(endocannabinoid analogues)로 칭한다.

- [130] 예컨대, 본 발명의 제조방법에 따라 제공되는 상기 내인성 카나비노이드 유사체는 지방산의 카르복실기와 C₂₆ 아미노알콜의 아민기 사이의 아미드 결합을 형성하여 제공되는 지방산 아미드(fatty acid amide, FAA)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [131]
- [132] 본 발명의 용어, "식물성 오일(vegetable oils)"은 식물성 기름 또는 식물유(植物油)라고도 불리는 물질로서, 일반적으로 식물로부터 추출한 지방성분, 주로 중성지방(triglycerides 또는 triacylglycerols, TAG)으로 구성될 수 있고, 약간의 디아실글리세롤(diacylglycerols, DAG) 등을 포함할 수 있다. 주로 상기 식물성 오일은 종자(seeds), 견과류(nuts), 곡물(cereal grain), 및 열매(fruits) 등으로부터 얻을 수 있다. 상기 식물성 오일은 좁게는 이들 물질 중 실온에서 액체 상태를 유지하는 기름만을 지칭하기도 하나, 넓게는 물질의 성상과 무관하게 식물로부터 추출한 모든 범위의 중성지방을 의미할 수 있다. 이들 식물성 오일은 다양한 포화 또는 불포화 지방산을 포함하는 혼합물일 수 있으며, 식물의 종류에 따라 이를 구성하는 지방산의 종류 및 함량은 상이할 수 있다.
- [133] 일례로, 해바라기오일, 올리브오일, 및 대두유는 모두 C16 또는 C18의 포화 또는 불포화 지방산인 리놀레산, 올레산, 리놀렌산, 스테아린산, 및 팔미트산 등을 포함한다. 그러나, 해바라기오일의 지방산 조성은 리놀레산 59%, 올레산 30%, 스테아린산 6%, 팔미트산 5%, 올리브오일의 지방산 조성은 올레산 71%, 팔미트산 13%, 리놀레산 12%, 스테아린산 4%, 및 대두유의 지방산 조성은 리놀레산 54%, 올레산 24%, 팔미트산 11%, 리놀렌산 7%, 스테아린산 4%로 각 성분의 함량은 서로 상이하다. 한편, 코코넛오일은 C10, C12, C14, C16의 비교적 짧은 사슬의 포화 또는 불포화 지방산을 포함하며, 지방산 조성은 라우르산 47%, 미리스트산 18%, 팔미트산 9%, 카프르산 6%, 올레산 6%, 스테아린산 3%, 리놀레산 2%이며, 아비시니안씨드오일은 C18, C20, C22의 상대적으로 긴 사슬의 포화 또는 불포

화 지방산을 포함하며, 지방산 조성은 에루스산 63.8%, 올레산 15.1%, 리놀레산 13.2%, 에이코센산 2.4%, 베헨산 2.1%이다.

- [134] 예컨대, 본 발명의 내인성 카나비노이드 유사체 제조방법에 사용할 수 있는 상기 식물성 오일은 해바라기오일(Sunflower oil, SFO), 올리브오일(Olive oil, OLO), 코코넛오일(Coconut oil, CNO), 대두유(Soybean oil, SBO), 포도씨오일(Grapeseed oil, GSO), 달맞이꽃종자오일(Evening primrose oil, EPO), 유채씨오일(Rapeseed oil, RSO), 메도우폼씨오일(Meadowfoam seed oil, MFO), 아비시니아씨드오일(Abyssinica seed Oil, ABSO), 햄프씨드오일(Hempseed oil, HSO), 아보카도오일(Avocado oil, AVO), 미강유(Rice bran oil, RBO), 시어버터(Shea butter, SHB), 미세조류오일(Aurantiochytrium oil, ATO), 동백오일(Camellia oil, CAM), 홍화씨오일(Safflower oil, SFF), 팜유(Palm oil), 마카다미아넛유(Macadamia nut oil), 겨자유(Mustard oil), 및 피마자유(Caster oil)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[135]

- [136] 본 발명의 용어, "중성지방(triglyceride)"은 글리세롤 골격에 에스테르화 결합된 3개 지방산을 포함하는 물질로서, 정확한 화합물명은 트리아실글리세롤(triacylglycerol, TAG)이나, 트리글리세라이드라는 용어로 보다 잘 알려져 있다. 중성지방은 주요 식이지방(dietary fat)으로 장내에서 리파제에 의해 지방산과 모노글리세라이드로 가수분해된다.

- [137] 본 발명의 용어, "지방산(fatty acids)"은 화학, 특히 생화학에서 사용되는 용어로, 포화 또는 불포화된 긴 지방족 사슬(aliphatic chain)을 갖는 카르복실산(carboxylic acid)을 의미한다. 자연적으로 생성되는 대부분의 지방산은 4개로부터 28개까지의 짝수 개의 탄소 원자로 구성된 분자가 없는 직쇄의 사슬 구조를 포함할 수 있다. 이들 지방산은 일반적으로 생물에서 단독으로 존재하기 보다 중성지방, 인지질, 콜레스테릴 에스테르의 3가지 주된 부류의 에스테르 형태로 존재하며, 이들 에스테르 형태에서 지방산은 중요한 에너지원이며 세포를 구성하는 중요한 구조적 구성 성분이다.

- [138] 예컨대, 상기 식물성 오일에 함유된 2종 이상의 지방산은 리놀레산(linoleic acid), 리놀렌산(linolenic acid), 올레산(oleic acid), 스테아린산(stearic acid), 팔미트산(palmitic acid), 미리스트산(myristic acid), 라우르산(lauric acid), 카프로산(capric acid), 에이코센산(eicosenoic acid), 에루스산(erucic acid), 도코사디엔산(docosadienoic acid), 베헨산(behenic acid), 도코사헥사엔산(docosaheptaenoic acid), 에이코사펜타엔산(eicosapentaenoic acid), 아라키돈산(arachidonic acid), 도데칸산(dodecanoic acid), 헥산산(hexanoic acid), 카프로산(caproic acid), 트리팔미틴(tripalmitin), 트리카프로인(Tricaproin), 및 트리카프린(Tricaprin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 둘 이상의 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[139]

- [140] 본 발명의 용어, "아미노알콜(aminoalcohol)"은 알칸(alkane) 골격에 히드록실기(hydroxyl, -OH)와 아미노기(amino, -NH₂, -NHR 또는 -NR₂)를 모두 포함하는 유기 화합물을 지칭한다. 상기 알칸은 직쇄 또는 분지쇄의 구조를 가질 수 있다.
- [141] 예컨대, 상기 C₂₋₆ 아미노알콜은 아미노프로판올(3-amino-1-propanol, AP), 에타놀아민(ethanolamine, EA), 모노이소프로판올아민(monoisopropanolamine, MIPA), 아미노메틸프로판올(2-amino-2-methyl-1-propanol, AMP), 3-아미노-1,2-프로판디올(3-amino-1,2-propandiol), 및 세리놀(serinol, 2-aminopropane-1,3-diol)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [142]
- [143] 예컨대, 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 리파제는 식물성 오일 대비 0.01% 내지 30%(w/v) 비율로 첨가될 수 있다. 구체적으로, 0.01% 내지 10%, 0.1% 내지 10%, 0.05% 내지 5%, 0.1% 내지 5%, 0.5% 내지 5%, 0.5 내지 3%, 또는 0.5 내지 2%의 비율로 첨가될 수 있으나, 상기 반응에 있어서 촉매적 활성을 발휘할 수 있는 한 이에 제한되지 않는다.
- [144]
- [145] 예컨대, 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 C₂₋₆ 아미노알콜은 식물성 오일 대비 1:1 내지 1:3의 물비로 사용할 수 있다. 일반적으로 식물성 오일의 대부분이 가수분해에 의해 단일 분자로부터 3개의 지방산 분자를 제공할 수 있는 트리글리세라이드로 구성되는 점을 고려할 때, 충분한 반응이 이루어질 수 있도록 1:1 이상, 예컨대, 1:3의 물비로 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [146]
- [147] 예컨대, 상기 아미드화 반응은 40°C 내지 70°C에서, 15 내지 200시간 동안 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 아미드화 반응은 리파제에 의한 효소적 촉매작용에 의해 수행되는 바, 이에 적합한 온도에서 수행할 수 있으며, 반응 시간은 기질의 종류, 이외의 반응 조건 등에 따라 조절할 수 있다. 예컨대, 40°C 내지 60°C, 50°C 내지 70°C, 또는 50°C 내지 60°C에서 수행할 수 있고, 10 내지 50시간, 100 내지 200시간, 60 내지 120시간, 또는 80 내지 100시간 동안 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [148]
- [149] 예컨대, 본 발명의 제조방법은 85% 내지 99%, 88% 내지 98%, 또는 90% 내지 97.5%의 전환율로 수행될 수 있다.
- [150]
- [151] 본 발명의 제2양태는 제1양태의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체를 유효성분으로 포함하는, 유해세균 생육억제용 조성물을 제공한다.
- [152]
- [153] 예컨대, 본 발명의 조성물을 이용하여 생육을 억제할 수 있는 상기 유해세균은 황색포도균, 대장균, 살모넬라 또는 칸디다알비칸스일 수 있다. 본 발명의 구체

적인 실시예에서는 본 발명에 따라 제조된 식물성 오일 유래의 내인성 카나비노이드 유사체를 처리하였을 때, 0.1 ppm 이상 또는 1 ppm 이상의 농도에서 황색포도균, 대장균, 살모넬라 및/또는 칸디다알비칸스의 생장을 농도 의존적으로 억제할 수 있는 반면, 테스트한 농도 범위 내에서 녹농균에 대해서는 생장억제 효과를 나타내지 않는 것으로 나타났다.

[154]

[155] 본 발명의 제3양태는 제1양태의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체를 유효성분으로 포함하는, 암 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[156]

[157] 본 발명의 용어, "예방"이란 본 발명의 조성물의 투여로 암 질환의 발생, 확산 및 재발을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명의 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[158]

본 발명의 약학 조성물을 투여하여 예방 또는 치료할 수 있는 암 질환은 폐암(lung cancer), 구강암(oral cancer), 전립선암(prostate cancer), 방광암(bladder cancer), 직장암(colorectal cancer), 결장암(colon cancer), 담관암종(cholangiocarcinoma, bile duct carcinoma), 위암(gastric cancer), 유방암(breast cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 난소암(ovarian cancer), 태반암종(placental cancer), 융모암종(choriocarcinoma), 편평상피세포식도암(esophageal squamous cell cancer), 교아세포종(glioblastomas), 흑색종(melanomas), 신장암(renal carcinomas) 경부편평세포암(cervical squamous cell carcinomas), 간세포암종(hepatocellular carcinomas), 또는 자궁경부상피내종양(cervical intraepithelial neoplasia)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[159]

본 발명의 구체적인 실시예에서는 본 발명의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체가 폐암, 구강암, 전립선암 및/또는 방광암 세포를 사멸시키는 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[160]

[161] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 각각의 사용 목적에 맞게 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁제, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구 제형, 멸균 주사 용액의 주사제 등 다양한 형태로 제형화하여 사용할 수 있으며, 경구 투여하거나 정맥 내, 복강내, 피하, 직장, 국소 투여 등을 포함한 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다. 이러한 조성물에 포함될 수 있는 적합한 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유

등을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[162] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토즈, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화한다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크와 같은 윤활제가 사용될 수 있다.

[163] 경구용 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 예시될 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[164] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액제, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로골, 트윈61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 한편, 주사제에는 용해제, 등장화제, 현탁화제, 유화제, 안정화제, 방부제 등과 같은 종래의 첨가제가 포함될 수 있다.

[165]

[166] 본 발명의 제4양태는 제1양태의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[167]

[168] 본 발명의 용어, "예방"이란 본 발명의 조성물의 투여로 염증성 질환의 발생, 확산 및 재발을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명의 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[169] 본 발명의 약학 조성물을 투여하여 예방 또는 치료할 수 있는 염증성 질환은 감염성 질환, 알러지, 자가면역 질환, 대사성 질환 등의 급성 또는 만성 염증성 질환일 수 있다. 구체적으로, 천식, 관절염, 아토피성 피부염, 건선, 다발성 경화증, ssRNA 및 dsRNA 바이러스 감염증, 패혈증, 다발성 연골염, 경피증, 습진, 통풍, 치주질환, 베체트 증후군, 부종, 맥관염, 가와사키병, 당뇨병성 망막염, 자가 면역 체계장염, 혈관염, 사구체 신염, 급성 및 만성 기관지염, 크론병, 인플루엔자 감염증, 알러지성 천식, 알러지성 비염, 알러지성 점막염, 두드러기 및 아나필락스(anaphylax)를 포함하는 알러지성 질환, 또는 경피증(systemic sclerosis), 피부근염(dermatomyositis) 및 포함체 근육염(inclusion body myositis)을 포함하는 근병증일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[170] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 본 발명의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체가 LPS를 처리하여 염증을 유발한 세포에서 대표적인 염증성 질환의 표지자인 아질산염 생성을 현저히 감소시키고 전염증성

사이토카인 IL-1 β , IL-6, 및/또는 TNF- α 의 생성을 유의미하게 감소시키는 것을 확인하였다. 나아가, 난백알부민을 이용하여 천식을 유도한 실험동물 마우스에서 본 발명의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체가 IL-4, IL-5 및/또는 IL-13의 생성을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였다.

[171]

[172] 본 발명의 제5양태는 제1양태의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체를 유효성분으로 포함하는, 통증억제용 조성물을 제공한다.

[173] 상기 통증은 염증성 통증, 만성 통증, 또는 급성 통증일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[174] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 본 발명의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체가 포르말린 테스트를 통한 급성 염증성 통증 마우스 모델에서 농도 의존적으로 통증을 감소시키는 것을 확인하였다.

[175]

[176] 본 발명의 제6양태는, 제4양태 또는 제5양태의 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[177]

[178] 본 발명의 용어 "개체"란, 상기 암 질환 또는 염증성 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 약학 조성물을 개체에게 투여함으로써 상기 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 기존의 치료제와 병행하여 투여될 수 있다.

[179]

본 발명의 용어 "투여"란, 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내 주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질 알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로 아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제(예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.

- [180] 본 발명에서 유효성분과 결합하여 사용된 "치료학적으로 유효한 양"이란 용어는 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 내인성 카나비노이드 유사체의 양을 의미한다.
- [181] 본 발명의 약학 조성물은 예방 또는 치료하고자 하는 질환의 종류에 따라, 유효 성분으로서 본 발명의 내인성 카나비노이드 유사체 이외의 공지된 각 질환의 예방 또는 치료에 사용되는 공지의 약물을 추가로 포함할 수 있다. 예컨대, 암 질환 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료에 사용되는 경우 유효성분으로서 본 발명의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 이외에 공지된 약물을 추가로 포함할 수 있고, 이들 질환의 치료를 위해 공지된 다른 치료와 병용될 수 있다.
- [182] 이때, 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [183] 예컨대, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [184] 구체적으로, 본 발명의 조성물에서 화합물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg 당 1 내지 100 mg, 바람직하게는 5 내지 60 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [185]
- [186] 본 발명의 제7양태는 제1양태의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체를 유효성분으로 포함하는, 사료용 조성물을 제공한다.
- [187] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 본 발명의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체가 동물모델에 경구투여시 독성을 유발하지 않으면서 체중을 증가시키는 것을 확인하였다.
- [188]
- [189] 상기 사료용 조성물은 사료 첨가제를 포함할 수 있다. 본 발명의 사료첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당한다.

- [190] 본 발명에서 용어, "사료"는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미한다.
- [191] 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [192]
- [193] 본 발명의 제8양태는 제1양태의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체를 유효성분으로 포함하는, 식품 조성물을 제공한다.
- [194]
- [195] 본 발명의 식품 조성물은 다양한 형태의 식품 첨가제 또는 기능성 식품을 제공한다. 구체적으로, 상기 조성물을 포함하는 침출차, 액상차, 음료, 발효유, 치즈, 요구르트, 주스, 생균제제 또는 건강보조식품 등으로 가공될 수 있으며, 그 외 다양한 식품 첨가제의 형태로 사용될 수 있다.
- [196] 본 발명의 식품 조성물은 식품학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [197] 본 발명의 조성물을 포함할 수 있는 식품의 종류에는 별다른 제한이 없으며, 예를 들어 각종 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조식품류 등이 있다. 상기 식품 조성물에는 갱년기 장애 치료 효과에 방해가 되지 않는 다른 성분을 추가할 수 있으며, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 통상의 식품과 같이 여러 가지 생약 추출물, 식품학적으로 허용가능한 식품보조첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [198] 상기 식품보조첨가제는 각 제형의 식품 조성물을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 예를 들어 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 그 종류가 제한되는 것은 아니다.
- [199] 이때, 상기 식품에 포함되는 내인성 카나비노이드 유사체의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 식품 조성물의 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%, 구체적으로는 1 내지 80 중량%로 포함될 수 있다.
- [200] 식품이 음료인 경우에는 100ml를 기준으로 1 내지 30g, 구체적으로는 3 내지 20g의 비율로 포함될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비

타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니솔(BHA), 부틸히드록시톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아조산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 첨가할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용된다.

[201] 본 발명의 식품 조성물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 상기 제조 시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나다.

[202]

[203] 본 발명의 제9양태는 제1양태의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체를 유효성분으로 포함하는, 화장품 조성물을 제공한다.

[204]

[205] 본 발명에 있어서, 상기 화장품 조성물은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양화장수, 유연 화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 헤팅액, 유탕액, 페이스트, 겔, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탕액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패취 및 스프레이로 구성된 군에서 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[206] 본 발명의 상기 화장품 조성물은 일반 피부 화장품에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면 유분, 물, 계면 활성제, 보습제, 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[207] 본 발명의 화장품 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체는 화장품 조성물의 제형에 따라 다양하다.

[208] 본 발명의 제형이 연고, 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는, 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

- [209] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는, 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실케이트, 폴리아미드 파우더 등이 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로하이드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [210] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제 등이 이용될 수 있으며, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일 등이 이용될 수 있고, 특히, 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종 오일, 올리브 오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [211] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타하이드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [212] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [213] 본 발명의 화장품 조성물에는 상기 필수 성분과 더불어 필요에 따라 통상 화장품에 배합되는 다른 성분을 배합해도 된다. 구체적으로, 첨가해도 되는 배합 성분으로서의 유지 성분, 보습제, 에몰리엔트제, 계면 활성제, 유기 및 무기 안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조정제, 알콜, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 정제수 등을 들 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[214]

발명의 실시를 위한 형태

[215] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[216]

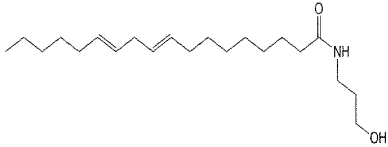
[217] 실시예 1: 중성지방의 효소전환을 통한 내인성 카나비노이드 유사체의 제조

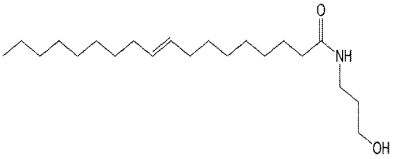
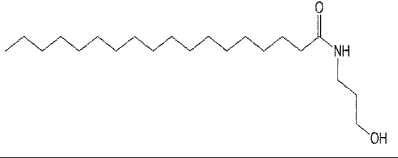
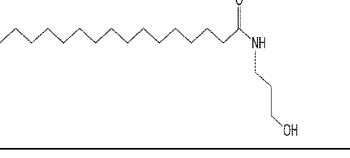
[218]

[219] **1-1. 해바라기오일과 아미노프로파놀을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체 (SFO-AP)의 제조**

[220] 1 M의 해바라기오일(Sunflower oil, SFO)과 3 M의 아미노프로파놀(3-amino-1-propanol, AP)을 55°C로 장착된 이중 자켓 반응조에 넣어 혼합한 후, 고정화 리파제 효소 1%(w/v)를 투입하여 89시간 동안 아미드화(amidation) 반응을 수행하였다. 반응 중 시간별로 샘플을 취하여 GC 크로마토그래피를 이용하여 전환과정을 분석하였다(도 1). 사용한 GC는 7890a 기체 크로마토그래피/불꽃이온화 검출기(Gas Chromatography/Flame Ionization Detector, GC/FID) 시스템(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 사용하였고 컬럼은 HP-5 컬럼(30 m length, 0.320 mm diameter, 0.25 µm film thickness)를 사용하였다. 효소 반응액 50 µL를 클로로포름 950 µL와 혼합하여 최종 1 µL를 사용하여 GC 분석하였다. GC 오븐 온도는 80°C에서 300°C까지 30°C/분의 속도로 증가시켰다. 수송가스(Carrier gas)는 헬륨가스를 30 mL/분으로 유지하였고 산소와 수소가스를 각각 분당 400 mL와 60 mL를 유지하였다. FID 검출기 온도는 270°C를 사용하였다. 해바라기오일의 지방산 조성은 리놀레산(linoleic acid) 59%, 올레산(oleic acid) 30%, 스테아린산(stearic acid) 6%, 팔미트산(palmitic acid) 5% 등으로 구성되어 있으며 AP 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 팔미트산 AP 아미드(RT 7.9분)를 제외한 나머지 3개의 탄소길이가 같은 지방산 아미드(스테아린산 AP 아미드, 올레산 AP 아미드 및 리놀레산 AP 아미드)는 동일한 피크(RT 8.5분)에서 확인되었다(도 1). 해바라기오일의 AP 아미드의 최종 전환율은 89시간 동안 96.3%이었으며(도 2) 생성된 지방산 AP 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 1에 개시하였다.

[221] [표1]

지방산 A P 아미드	구조	화학식	분자 량(Da)	함량 (%)
Linoleamide-AP		C ₂₁ H ₃₉ NO ₂	337.55	~59

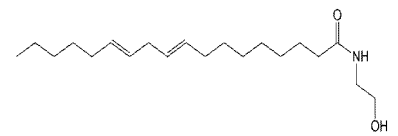
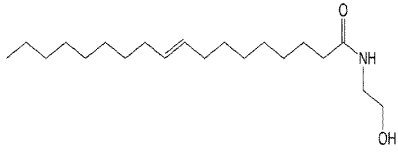
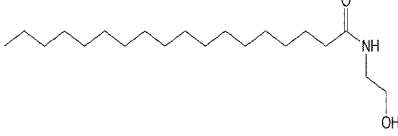
Oleamide-AP		$C_{21}H_{41}NO_2$	339.56	~30
Stearamide-AP		$C_{21}H_{43}NO_2$	341.58	~6
Palmitamide-AP		$C_{19}H_{39}NO_2$	313.53	~5

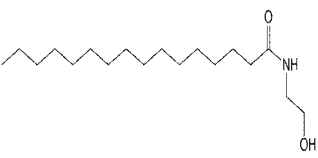
[222]

[223] **1-2. 해바라기오일과 에타놀아민을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체(SFO-EA)의 제조**

[224] 아미노프로파놀(AP) 대신 에타놀아민(ethanolamine, EA)을 사용하여 42시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-1과 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. EA 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 팔미트산 EA 아미드(RT 7.9분)를 제외한 나머지 3개의 탄소길이가 같은 지방산 아미드(스테아린산 EA 아미드, 올레산 EA 아미드 및 리놀레산 EA 아미드)는 동일한 피크(RT 8.2분)에서 확인되었다(도 3). 해바라기오일의 EA 아미드의 최종 전환율은 41시간 동안 97%이었으며(도 4) 생성된 지방산 EA 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 2에 개시하였다.

[225] [표2]

지방산 E A 아미드	구조	화학식	분자 량(Da)	함량 (%)
Linoleamide-EA		$C_{20}H_{37}NO_2$	323.52	~59
Oleamide-EA		$C_{20}H_{39}NO_2$	325.54	~30
Stearamide-EA		$C_{20}H_{41}NO_2$	327.55	~6

Palmitamide-EA		$C_{18}H_{37}NO_2$	299.50	~5
----------------	---	--------------------	--------	----

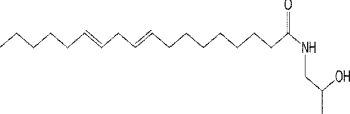
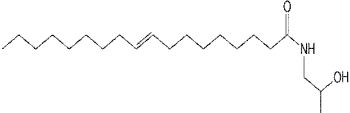
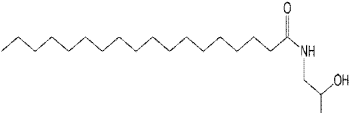
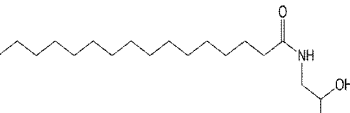
[226]

[227] **1-3. 해바라기오일과 모노이소프로파놀아민을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체(SFO-MIPA)의 제조**

[228] 아미노프로파놀(AP) 대신 모노이소프로파놀아민(monoisopropanolamine, MIPA)을 사용하여 66시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-1과 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. MIPA 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 팔미트산 MIPA 아미드(RT 7.7분)를 제외한 나머지 3개의 탄소길이가 같은 지방산 아미드(스테아린산 MIPA 아미드, 올레산 MIPA 아미드 및 리놀레산 MIPA 아미드)는 동일한 피크(RT 8.2분)에서 확인되었다(도 5). 해바라기오일의 MIPA 아미드의 최종 전환율은 65시간 동안 97.5%이었으며(도 6) 생성된 지방산 MIPA 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 3에 개시하였다.

[229]

[표3]

지방산 MIPA 아미드	구조	화학식	분자량(Da)	함량(%)
Linoleamide-MIPA		$C_{21}H_{39}NO_2$	337.55	~59
Oleamide-MIPA		$C_{21}H_{41}NO_2$	339.56	~30
Stearamide-MIPA		$C_{21}H_{43}NO_2$	341.58	~6
Palmitamide-MIPA		$C_{19}H_{39}NO_2$	313.53	~5

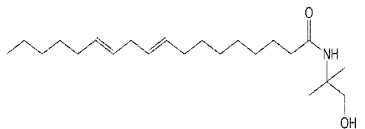
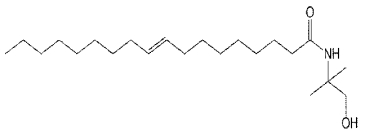
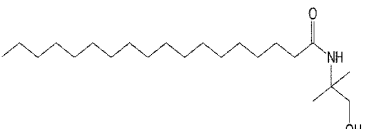
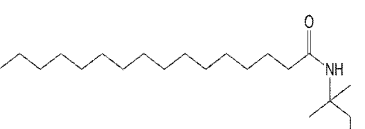
[230]

[231] **1-4. 해바라기오일과 아미노메틸프로파놀을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체(SFO-AMP)의 제조**

[232] 아미노프로파놀(AP) 대신 아미노메틸프로파놀(2-Amino-2-Methyl-1-Propanol, AMP)을 사용하여 150시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-1과

유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. AMP 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 팔미트산 AMP 아미드(RT 7.8분)를 제외한 나머지 3개의 탄소 길이가 같은 지방산 아미드(스테아린산 AMP 아미드, 올레산 AMP 아미드 및 리놀레산 AMP 아미드)는 동일한 피크(RT 8.29분)에서 확인되었다(도 7). 해바라기 오일의 AMP 아미드의 최종 전환율은 192시간 동안 96.5%이었으며(도 8) 생성된 지방산 AMP 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 4에 개시하였다.

[233] [표4]

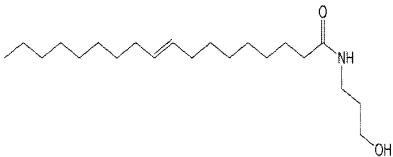
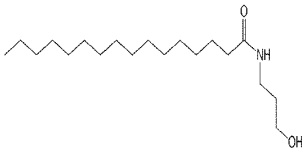
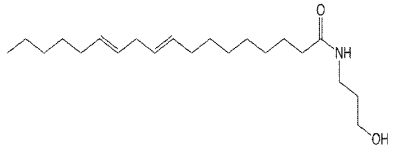
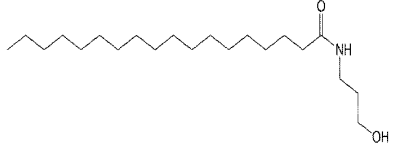
지방산 A MP 아미드	구조	화학식	분자 량(Da)	함량 (%)
Linoleam ide-AMP		$C_{22}H_{41}NO_2$	351.57	~59
Oleamide-AMP		$C_{22}H_{43}NO_2$	353.59	~30
Stearamide-AMP		$C_{22}H_{45}NO_2$	355.35	~6
Palmitam ide-AMP		$C_{20}H_{41}NO_2$	327.55	~5

[234]

[235] **1-5. 올리브오일과 아미노프로판올을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체 (OLO-AP)의 제조**

[236] 해바라기오일(SFO) 대신 올리브오일(Olive oil, OLO)을 사용하여 96시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-1과 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. 올리브오일의 지방산 조성은 올레산(oleic acid) 71%, 팔미트산(palmitic acid) 13%, 리놀레산(linoleic acid) 12%, 스테아린산(stearic acid) 4% 등으로 구성되어 있으며 AP 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 팔미트산 AP 아미드(RT 7.7분)를 제외한 나머지 3개의 탄소 길이가 같은 지방산 아미드(스테아린산 AP 아미드, 올레산 AP 아미드 및 리놀레산 AP 아미드)는 동일한 피크(RT 8.2분)에서 확인되었다(도 9). 올리브오일의 AP 아미드의 최종 전환율은 96시간 동안 95.3%이었으며(도 10) 생성된 지방산 AP 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 5에 개시하였다.

[237] [표5]

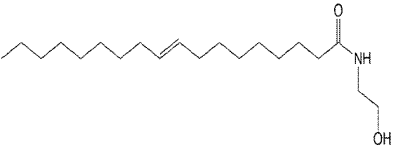
지방산 A P 아미드	구조	화학식	분자 량(Da)	함량 (%)
Oleamide-AP		$C_{21}H_{41}NO_2$	339.56	~71
Palmitamide-AP		$C_{19}H_{39}NO_2$	313.53	~13
Linoleamide-AP		$C_{21}H_{39}NO_2$	337.55	~12
Stearamide-AP		$C_{21}H_{43}NO_2$	341.58	~4

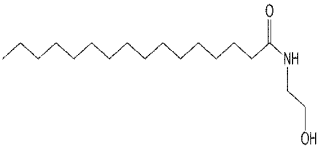
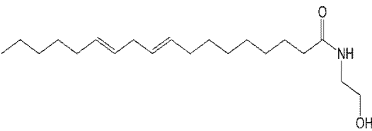
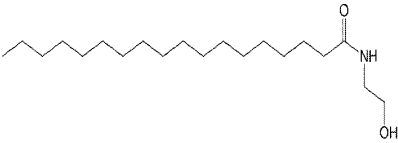
[238]

[239] **1-6. 올리브오일과 에타놀아민을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체(OLO-EA)의 제조**

[240] 해바라기오일(SFO) 대신 올리브오일(OLO)을 사용하여 17시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-2와 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. EA 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 팔미트산 EA 아미드(RT 7.69분)를 제외한 나머지 3개의 탄소길이가 같은 지방산 아미드(스테아린산 EA 아미드, 올레산 EA 아미드 및 리놀레산 EA 아미드)는 동일한 피크(RT 8.18 분)에서 확인되었다(도 11). 올리브오일의 EA 아미드의 최종 전환율은 17시간 동안 94.7%이었으며(도 12) 생성된 지방산 EA 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 6에 개시하였다.

[241] [표6]

지방산 E A 아미드	구조	화학식	분자 량(Da)	함량 (%)
Oleamide-EA		$C_{20}H_{39}NO_2$	325.54	~71

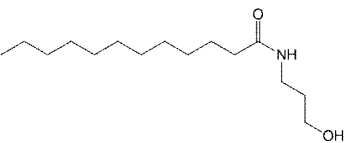
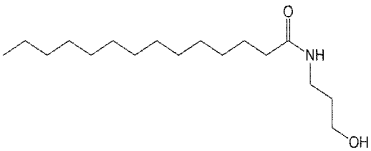
Palmitamide-EA		$C_{18}H_{37}NO_2$	299.50	~13
Linoleamide-EA		$C_{20}H_{37}NO_2$	323.52	~12
Stearamide-EA		$C_{20}H_{41}NO_2$	327.55	~4

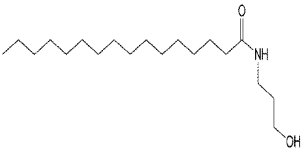
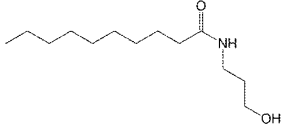
[242]

[243] **1-7. 코코넛오일과 아미노프로파놀을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체 (CNO-AP)의 제조**

[244] 해바라기오일(SFO) 대신 코코넛오일(Coconut oil, CNO)을 사용하여 96시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-1과 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. 코코넛오일의 지방산 조성은 라우르산(lauric acid) 47%, 미리스트산(myristic acid) 18%, 팔미트산(palmitic acid) 9%, 카프르산(capric acid) 6%, 올레산(oleic acid) 6%, 스테아린산(stearic acid) 3%, 리놀레산(linoleic acid) 2% 등으로 구성되어 있으며 AP 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 라우르산 AP 아미드(RT 6.9분), 미리스트산 AP 아미드(RT 7.46분), 팔미트산 AP 아미드(RT 7.8분) 등으로 나타났다(도 13). 코코넛오일의 AP 아미드의 최종 전환율은 88시간 동안 96.5%이었으며(도 14) 생성된 지방산 AP 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 7에 개시하였다.

[245] [표7]

지방산 A P 아미드	구조	화학식	분자 량(Da)	함량 (%)
Lauramide-AP		$C_{15}H_{31}NO_2$	285.47	~47
Myristamide-AP		$C_{17}H_{35}NO_2$	285.47	~18

Palmitamide-AP		$C_{19}H_{39}NO_2$	313.53	~9
Capramide-AP		$C_{13}H_{27}NO_2$	229.36	~6

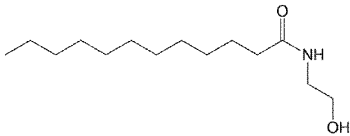
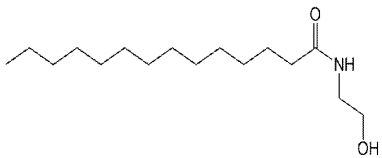
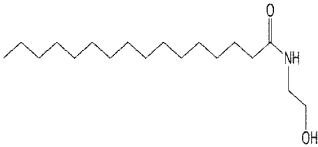
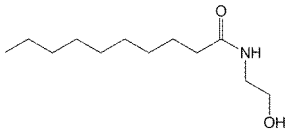
[246]

[247] **1-8. 코코넛오일과 에타놀아민을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체(CNO-EA)의 제조**

[248] 아미노프로파놀(AP) 대신 에타놀아민(EA)을 사용하여 96시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-7과 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. EA 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 라우르산 EA 아미드(RT 6.57분), 미리스트산 EA 아미드(RT 7.15분), 팔미트산 EA 아미드(RT 7.7분) 등으로 나타났다(도 15). 코코넛오일의 EA 아미드의 최종 전환율은 96시간 동안 96.4%이었으며(도 16) 생성된 지방산 EA 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 8에 개시하였다.

[249]

[표8]

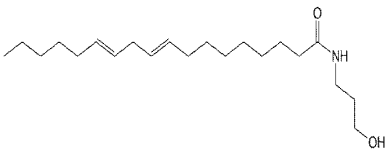
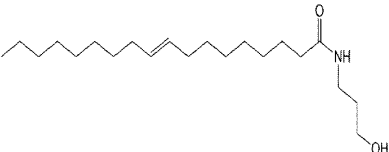
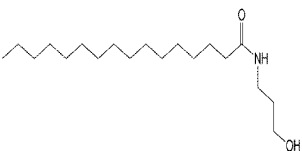
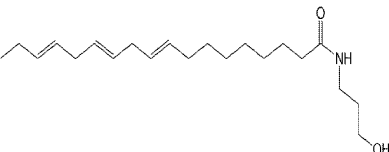
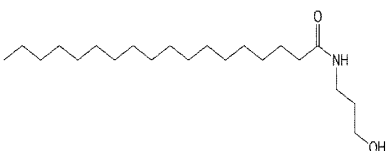
지방산 E A 아미드	구조	화학식	분자 량(Da)	함량 (%)
Lauramide-EA		$C_{14}H_{29}NO_2$	243.39	~47
Myristamide-EA		$C_{16}H_{33}NO_2$	271.44	~18
Palmitamide-EA		$C_{18}H_{37}NO_2$	299.50	~9
Capramide-EA		$C_{12}H_{25}NO_2$	215.34	~6

[250]

[251] **1-9. 대두유과 아미노프로파놀을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체(SBO-AP)의 제조**

[252] 해바라기오일(SFO) 대신 대두유(Olive oil, OLO)을 사용하여 96시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-1과 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. 대두유의 지방산 조성은 리놀레산(linoleic acid) 54%, 올레산(oleic acid) 24%, 팔미트산(palmitic acid) 11%, 리놀렌산(linolenic acid) 7%, 스테아린산(stearic acid) 4% 등으로 구성되어 있으며 AP 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 팔미트산 AP 아미드 RT 7.97분에서, 3개의 탄소길이가 같은 지방산 아미드(스테아린산 AP 아미드, 올레산 AP 아미드 및 리놀레산 AP 아미드)는 동일한 피크, RT 8.45분에서, 그리고 리놀렌산 AP 아미드는 RT 8.48분에서 확인되었다(도 17). 대두유의 AP 아미드의 최종 전환율은 72시간 동안 96.9%이었으며(도 18) 생성된 지방산 AP 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 9에 개시하였다.

[253] [표9]

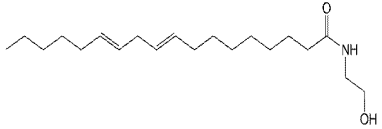
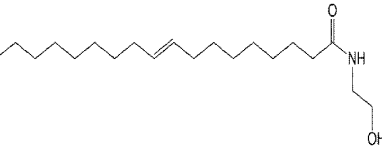
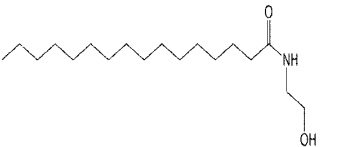
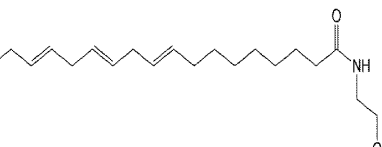
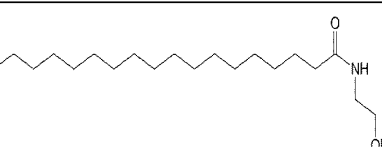
지방산 A P 아미드	구조	화학식	분자 량(Da)	함량 (%)
Linolea mide-AP		$C_{21}H_{39}NO_2$	337.55	~54
Oleamide-AP		$C_{21}H_{41}NO_2$	339.56	~24
Palmita mide-AP		$C_{19}H_{39}NO_2$	313.53	~11
Linolena mide-AP		$C_{21}H_{37}NO_2$	335.53	~7
Stearamide-AP		$C_{21}H_{43}NO_2$	341.58	~4

[254]

[255] **1-10. 대두유과 에타놀아민을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체(SBO-EA)의 제조**

[256] 아미노프로파놀(AP) 대신 에타놀아민(EA)을 사용하여 96시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-9와 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. EA 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 팔미트산 EA 아미드 RT 7.7분에서, 3개의 탄소길이가 같은 지방산 아미드(스테아린산 EA 아미드, 올레산 EA 아미드 및 리놀레산 EA 아미드)는 동일한 피크, RT 8.2분에서, 그리고 리놀렌산 EA 아미드는 RT 8.24분에서 확인되었다(도 19). 대두유의 EA 아미드의 최종 전환율은 120시간 동안 95.2%이었으며(도 20) 생성된 지방산 AP 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 10에 개시하였다.

[257] [표10]

지방산 E A 아미드	구조	화학식	분자 량(Da)	함량 (%)
Linoleamide-EA		$C_{20}H_{37}NO_2$	323.52	~54
Oleamide-EA		$C_{20}H_{39}NO_2$	325.54	~24
Palmitamide-EA		$C_{18}H_{37}NO_2$	299.50	~11
Linolenamide-EA		$C_{20}H_{35}NO_2$	321.50	~7
Stearamide-EA		$C_{20}H_{41}NO_2$	327.55	~4

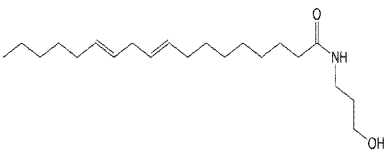
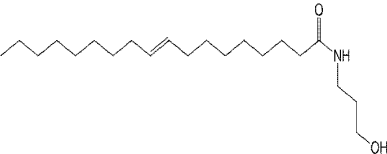
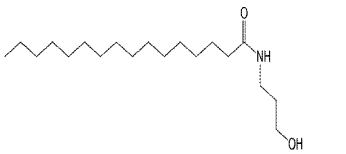
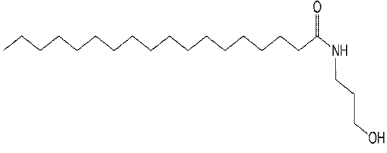
[258]

[259] **1-11 포도씨오일과 아미노프로파놀을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체(GSO-AP)의 제조**

[260] 해바라기오일(SFO) 대신 포도씨오일(Grapeseed oil, GSO)을 사용하여 96시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-1과 유사한 방법으로 아미드

화 반응을 수행하고 분석하였다. 포도씨오일의 지방산 조성은 리놀레산(linoleic acid) 73%, 올레산(oleic acid) 15%, 팔미트산(palmitic acid) 8%, 스테아린산(stearic acid) 4% 등으로 구성되어 있으며 AP 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 팔미트산 AP 아미드 RT 7.63분에서, 3개의 탄소길이가 같은 지방산 아미드(스테아린산 AP 아미드, 올레산 AP 아미드 및 리놀레산 AP 아미드)는 RT 8.13분에서, 그리고 리놀렌산 AP 아미드는 RT 8.16분에서 확인되었다(도 21). 포도씨오일의 AP 아미드의 최종 전환율은 140시간 동안 97%이었으며(도 22) 생성된 지방산 AP 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 11에 개시하였다.

[261] [표11]

지방산 A P 아미드	구조	화학식	분자 량(Da)	함량 (%)
Linoleamide-AP		$C_{21}H_{39}NO_2$	337.55	~73
Oleamide-AP		$C_{21}H_{41}NO_2$	339.56	~15
Palmitamide-AP		$C_{19}H_{39}NO_2$	313.53	~8
Stearamide-AP		$C_{21}H_{43}NO_2$	341.58	~4

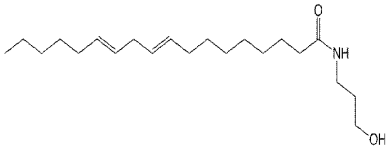
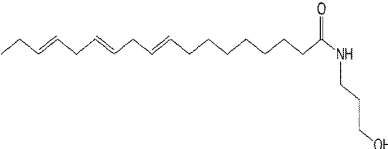
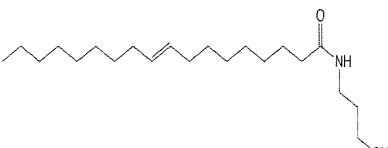
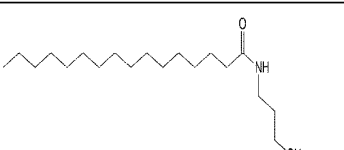
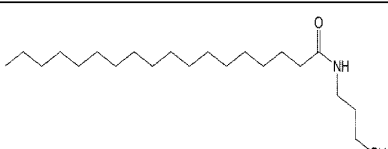
[262]

[263] **1-12. 달맞이꽃종자오일과 아미노프로파놀을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체(EPO-AP)의 제조**

[264] 해바라기오일(SFO) 대신 달맞이꽃종자오일(Evening primrose oil, EPO)을 사용하여 96시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-1과 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. 달맞이꽃종자오일의 지방산 조성은 리놀레산(linoleic acid) 74%, 리놀렌산(linolenic acid) 9.3%, 올레산(oleic acid) 7%, 팔미트산(palmitic acid) 6.4%, 스테아린산(stearic acid) 2% 등으로 구성되어 있으며 AP 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 팔미트산 AP 아미드 RT 7.60분에서, 3개의 탄소길이가 같은 지방산 아미드(스테아린산 AP 아미드, 올레산 AP 아미드

및 리놀레산 AP 아미드는 RT 8.11분에서, 그리고 리놀렌산 AP 아미드는 RT 8.18 분에서 확인되었다(도 23). 달맞이꽃종자오일의 AP 아미드의 최종 전환율은 120 시간 동안 95%이었으며(도 24) 생성된 지방산 AP 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 12에 개시하였다.

[265] [표12]

지방산 A P 아미드	구조	화학식	분자 량(Da)	함량 (%)
Linoleamide-AP		$C_{21}H_{39}NO_2$	337.55	~74
Linolena mide-AP		$C_{21}H_{37}NO_2$	335.53	~9.3
Oleamide-AP		$C_{21}H_{41}NO_2$	339.56	~7.0
Palmitamide-AP		$C_{19}H_{39}NO_2$	313.53	~6.4
Stearamide-AP		$C_{21}H_{43}NO_2$	341.58	~2.0

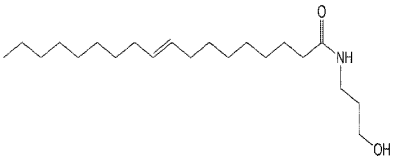
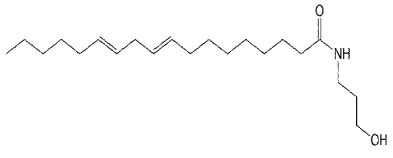
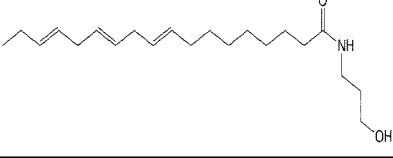
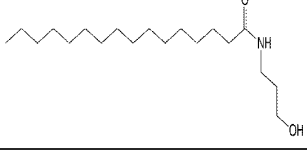
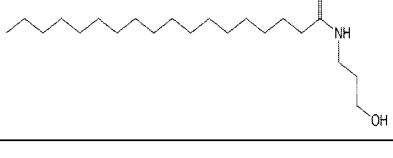
[266]

[267] **1-13. 유채씨오일과 아미노프로파놀을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체 (RSO-AP)의 제조**

[268] 해바라기오일(SFO) 대신 유채씨오일(Rapeseed oil, RSO)을 사용하여 96시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-1과 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. 유채씨오일의 지방산 조성은 올레산(oleic acid) 61.2%, 리놀레산(linoleic acid) 18.8%, 리놀렌산(linolenic acid) 10.8%, 팔미트산(palmitic acid) 4.2%, 스테아린산(stearic acid) 1.7% 등으로 구성되어 있으며 AP 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 팔미트산 AP 아미드 RT 8.02분에서, 3개의 탄소 길이가 같은 지방산 아미드(스테아린산 AP 아미드, 올레산 AP 아미드, 리놀레

산 AP 아미드, 및 리놀렌산 AP 아미드)는 RT 8.39분에서 확인되었다(도 25). 유채
씨오일의 AP 아미드의 최종 전환율은 65시간 동안 97%이었으며(도 26) 생성된
지방산 AP 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 13에 개시하였다.

[표13]

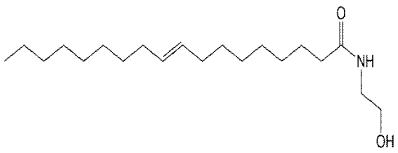
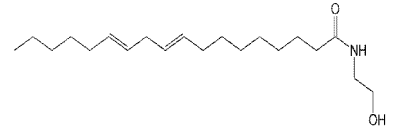
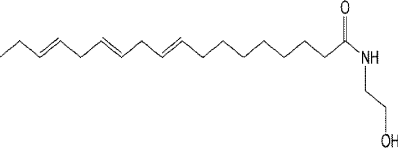
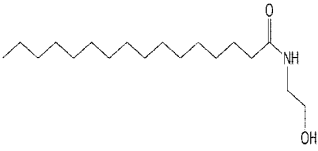
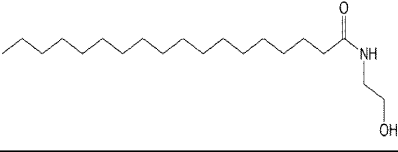
지방산 A P 아미드	구조	화학식	분자 량(Da)	함량 (%)
Oleamide-AP		$C_{21}H_{41}NO_2$	339.56	~61.2
Linoleamide-AP		$C_{21}H_{39}NO_2$	337.55	~18.8
Linolenamide-AP		$C_{21}H_{37}NO_2$	335.53	~10.8
Palmitamide-AP		$C_{19}H_{39}NO_2$	313.53	~4.2
Stearamide-AP		$C_{21}H_{43}NO_2$	341.58	~1.7

[270]

[271] **1-14. 유채씨오일과 에타놀아민을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체(RSO-
EA)의 제조**

[272] 아미노프로파놀(AP) 대신 에타놀아민(EA)을 사용하여 96시간 동안 반응시키
는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-13과 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행
하고 분석하였다. EA 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 팔미트산 EA 아미드
RT 7.7분에서, 3개의 탄소길이가 같은 지방산 아미드(스테아린산 EA 아미드, 올
레산 EA 아미드 및 리놀레산 EA 아미드)는 동일한 피크, RT 8.21분에서, 그리고
리놀렌산 EA 아미드는 RT 8.24분에서 확인되었다(도 27). 유채씨오일의 EA 아미
드의 최종 전환율은 96시간 동안 97%이었으며(도 28) 생성된 지방산 AP 아미드
의 특성 및 조성은 하기 표 14에 개시하였다.

[273] [표14]

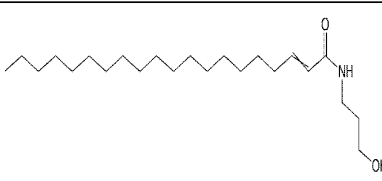
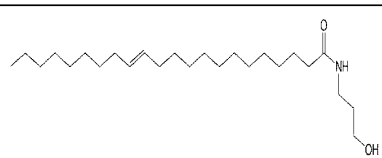
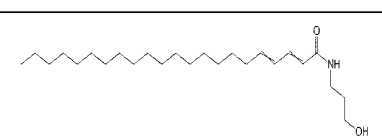
지방산 E A 아미드	구조	화학식	분자 량(Da)	함량 (%)
Oleamide-EA		$C_{20}H_{39}NO_2$	325.54	~61.2
Linoleamide-EA		$C_{20}H_{37}NO_2$	323.52	~18.8
Linolena mide-EA		$C_{20}H_{35}NO_2$	321.50	~10.8
Palmitamide-EA		$C_{18}H_{37}NO_2$	299.50	~4.2
Stearamide-EA		$C_{20}H_{41}NO_2$	327.55	~1.7

[274]

[275] **1-15. 메도우폼씨오일과 아미노프로파놀을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체(MFO-AP)의 제조**

[276] 해바라기오일(SFO) 대신 메도우폼씨오일(Meadowfoam seed oil, MFO)을 사용하여 96시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-1과 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. 메도우폼씨오일의 지방산 조성은 에이코센산(eicosenoic acid) 60%, 에루스산(erucic acid) 18%, 도코사디엔산(docosadienoic acid) 18% 등으로 구성되어 있으며 AP 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 에이코센산 AP 아미드(RT 7.29분), 에루스산 AP 아미드(RT 7.82분), 도코사디엔산 AP 아미드(RT 7.94분) 등으로 확인되었다(도 29). 메도우폼씨오일의 AP 아미드의 최종 전환율은 96시간 동안 97%이었으며(도 30) 생성된 지방산 AP 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 15에 개시하였다.

[277] [표15]

지방산 AP 아미드	구조	화학식	분자량(Da)	함량(%)
Eicosenamide-AP		$C_{23}H_{45}NO_2$	367.62	~60.0
Erucamide-AP		$C_{25}H_{49}NO_2$	395.67	~18.0
Docosadienamide-AP		$C_{25}H_{47}NO_2$	393.66	~18.0

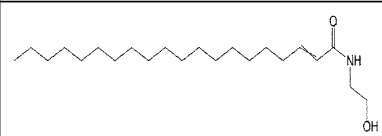
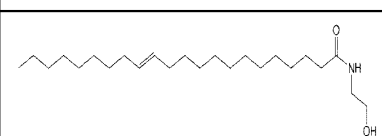
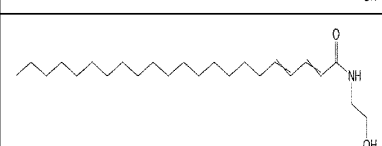
[278]

[279] **1-16. 메도우폼씨오일과 에타놀아민을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체 (MFO-EA)의 제조**

[280] 아미노프로파놀(AP) 대신 에타놀아민(EA)을 사용하여 96시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-15와 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. EA 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 에이코센산 EA 아미드(RT 8.67분), 에루스산 EA 아미드(RT 9.19분), 도코사디엔산 EA 아미드(RT 9.32분) 등으로 확인되었다(도 31). 메도우폼씨오일의 EA 아미드의 최종 전환율은 84시간 동안 96.5%이었으며(도 32) 생성된 지방산 EA 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 16에 개시하였다.

[281]

[표16]

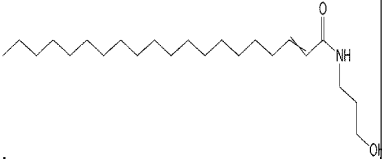
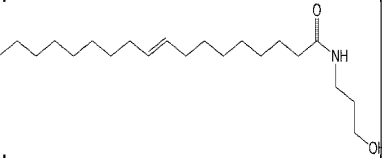
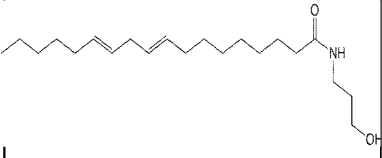
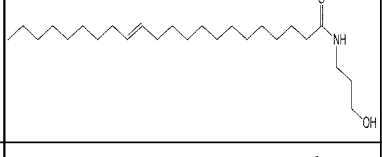
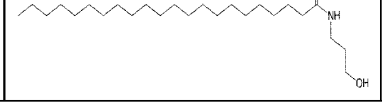
지방산 EA 아미드	구조	화학식	분자량(Da)	함량(%)
Eicosenamide-EA		$C_{22}H_{43}NO_2$	353.59	~60.0
Erucamide-EA		$C_{24}H_{47}NO_2$	381.64	~18.0
Docosadienamide-EA		$C_{24}H_{45}NO_2$	379.63	~18.0

[282]

[283] **1-17. 아비시니아씨드오일과 아미노프로판올을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체(ABSO-AP)의 제조**

[284] 해바라기오일(SFO) 대신 아비시니아씨드오일(Abyssinica seed Oil, ABSO)을 사용하여 96시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-1과 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. 아비시니아씨드오일의 지방산 조성은 에루스산(erucic acid) 63.8%, 올레산(oleic acid) 15.1%, 리놀레산(linoleic acid) 13.2%, 에이코센산(eicosenoic acid) 2.4%, 베헨산(behenic acid) 2.1% 등으로 구성되어 있으며 AP 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 올레산 AP 아미드 및 리놀레산 AP 아미드(RT 8.46분), 에루스산 AP 아미드, 에이코센산 AP 아미드, 및 베헨산 AP 아미드(RT 9.79분) 등으로 확인되었다(도 33). 아비시니아씨드오일의 AP 아미드의 최종 전환율은 183시간 동안 95.5%이었으며(도 34) 생성된 지방산 AP 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 17에 개시하였다.

[285] [표17]

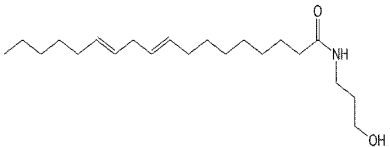
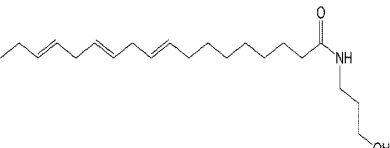
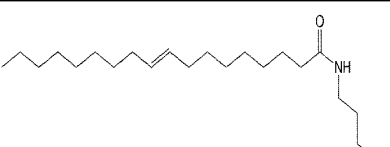
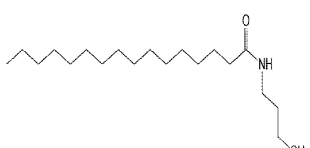
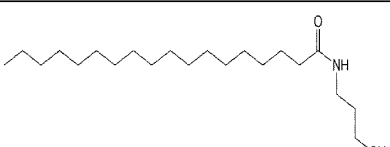
지방산 AP 아미드	구조	화학식	분자 량(Da)	함량 (%)
Eicosenamide-AP		$C_{23}H_{45}NO_2$	367.62	~63.8
Oleamide-AP		$C_{21}H_{41}NO_2$	339.56	~15.1
Linoleamide-AP		$C_{21}H_{39}NO_2$	337.55	~13.2
Erucamide-AP		$C_{25}H_{49}NO_2$	395.67	~2.4
Behenamide-AP		$C_{25}H_{51}NO_2$	397.69	~2.1

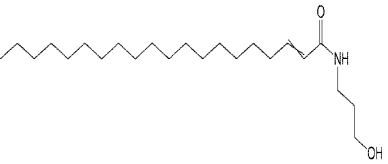
[286]

[287] **1-18. 헴프씨드오일과 아미노프로파놀을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체 (HSO-AP)의 제조**

[288] 해바라기오일(SFO) 대신 헴프씨드오일(Hempseed oil, HSO)을 사용하여 96시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-1과 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. 헴프씨드오일의 지방산 조성은 리놀레산(linoleic acid) 56%, 리놀렌산(linolenic acid) 24%, 올레산(oleic acid) 9%, 팔미트산(palmitic acid) 6%, 스테아린산(stearic acid) 2.5%, 에이코센산(eicosenoic acid) 2.5% 등으로 구성되어 있으며 AP 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 리놀레산 AP 아미드, 리놀렌산 AP 아미드, 올레산 AP 아미드 및 스테아린산 AP 아미드(RT 8.47분), 팔미트산 AP 아미드(RT 7.98분), 에이코센산(RT 9.05분) 등으로 확인되었다(도 35). 헴프씨드오일의 AP 아미드의 최종 전환율은 113시간 동안 97.2%이었으며 (도 36) 생성된 지방산 AP 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 18에 개시하였다.

[289] [표18]

지방산 A P 아미드	구조	화학식	분자 량(Da)	함량 (%)
Linoleamide-AP		$C_{21}H_{39}NO_2$	337.55	~56.0
Linolenamide-AP		$C_{21}H_{37}NO_2$	335.53	~24.0
Oleamide-AP		$C_{21}H_{41}NO_2$	339.56	~9.0
Palmitamide-AP		$C_{19}H_{39}NO_2$	313.53	~6.0
Stearamide-AP		$C_{21}H_{43}NO_2$	341.58	~2.5

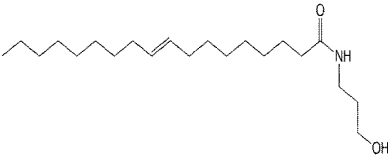
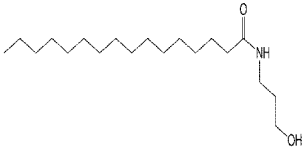
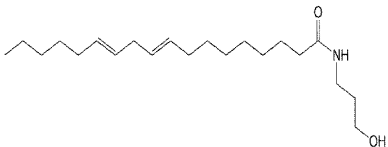
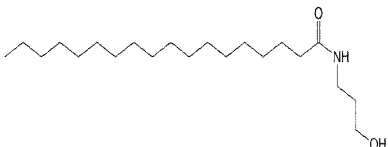
Eicosena mide-AP		$C_{23}H_{45}NO_2$	367.62	~2.5
---------------------	---	--------------------	--------	------

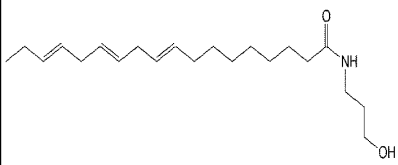
[290]

[291] **1-19. 아보카도오일과 아미노프로파놀을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체 (AVO-AP)의 제조**

[292] 해바라기오일(SFO) 대신 아보카도오일(Avocado oil, AVO)을 사용하여 96시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-1과 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. 아보카도오일의 지방산 조성은 올레산(oleic acid) 51.0%, 팔미트산(palmitic acid) 28.2%, 리놀레산(linoleic acid) 13.0%, 스테아린산(stearic acid) 0.7%, 리놀렌산(linolenic acid) 0.6% 등으로 구성되어 있으며 AP 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 올레산 AP 아미드, 리놀레산 AP 아미드, 스테아린산 AP 아미드, 및 리놀렌산 AP 아미드(RT 8.12분), 팔미트산 AP 아미드(RT 7.64분) 등으로 확인되었다(도 37). 아보카도오일의 AP 아미드의 최종 전환율은 116시간 동안 96%이었으며(도 38) 생성된 지방산 AP 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 19에 개시하였다.

[293] [표19]

지방산 A P 아미드	구조	화학적식	분자 량(Da)	함량 (%)
Oleamide-AP		$C_{21}H_{41}NO_2$	339.56	~51.0
Palmitamide-AP		$C_{19}H_{39}NO_2$	313.53	~28.2
Linoleamide-AP		$C_{21}H_{39}NO_2$	337.55	~13.0
Stearamide-AP		$C_{21}H_{43}NO_2$	341.58	~0.7

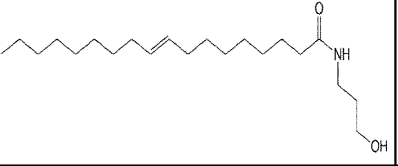
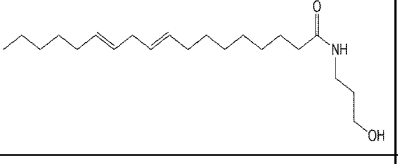
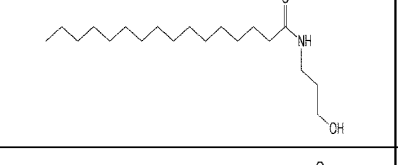
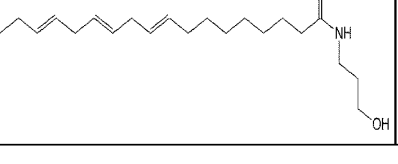
Linolenamide-AP		$C_{21}H_{37}NO_2$	335.53	~0.6
-----------------	---	--------------------	--------	------

[294]

[295] **1-20. 미강유와 아미노프로파놀을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체(RBO-AP)의 제조**

[296] 해바라기오일(SFO) 대신 미강유(Rice bran oil, RBO)를 사용하여 96시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-1과 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. 미강유의 지방산 조성은 올레산(oleic acid) 49.1%, 리놀레산(linoleic acid) 33.2%, 팔미트산(palmitic acid) 16.0%, 리놀렌산(linolenic acid) 1.7% 등으로 구성되어 있으며 AP 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 올레산 AP 아미드, 리놀레산 AP 아미드, 및 리놀렌산 AP 아미드(RT 8.16분), 팔미트산 AP 아미드(RT 7.68분) 등으로 확인되었다(도 39). 미강유의 AP 아미드의 최종 전환율은 114시간 동안 97.2%이었으며(도 40) 생성된 지방산 AP 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 20에 개시하였다.

[297] [표20]

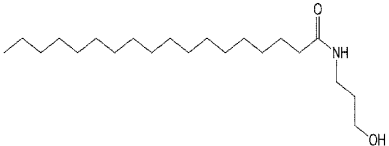
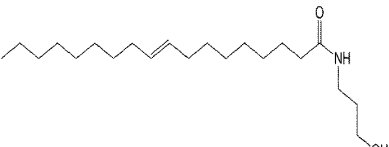
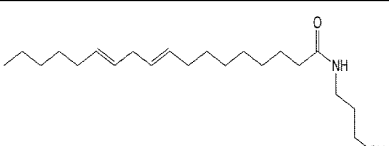
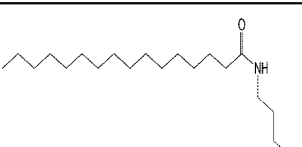
지방산 A P 아미드	구조	화학식	분자 량(Da)	함량 (%)
Oleamide-AP		$C_{21}H_{41}NO_2$	339.56	~49.1
Linoleamide-AP		$C_{21}H_{39}NO_2$	337.55	~33.2
Palmitamide-AP		$C_{19}H_{39}NO_2$	313.53	~16.0
Linolena mide-AP		$C_{21}H_{37}NO_2$	335.53	~1.7

[298]

[299] **1-21. 시어버터와 아미노프로파놀을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체(SHB-AP)의 제조**

[300] 해바라기오일(SFO) 대신 시어버터(Shea butter, SHB)를 사용하여 96시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-1과 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. 시어버터의 지방산 조성은 스테아린산(stearic acid) 52.4%, 올레산(oleic acid) 36.3%, 리놀레산(linoleic acid) 5.4%, 팔미트산(palmitic acid) 3.0% 등으로 구성되어 있으며 AP 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 스테아린산 AP 아미드, 올레산 AP 아미드, 및 리놀레산 AP 아미드(RT 8.24분), 팔미트산 AP 아미드(RT 7.7분) 등으로 확인되었다(도 41). 시어버터의 AP 아미드의 최종 전환율은 114시간 동안 97.2%이었으며(도 42) 생성된 지방산 AP 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 21에 개시하였다.

[301] [표21]

지방산 A P 아미드	구조	화학식	분자 량(Da)	함량 (%)
Stearamide-AP		$C_{21}H_{43}NO_2$	341.58	~52.4
Oleamide-AP		$C_{21}H_{41}NO_2$	339.56	~36.3
Linoleamide-AP		$C_{21}H_{39}NO_2$	337.55	~5.4
Palmitamide-AP		$C_{19}H_{39}NO_2$	313.53	~3.0

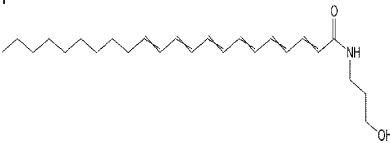
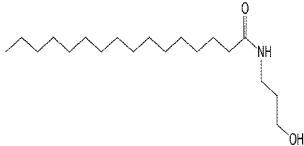
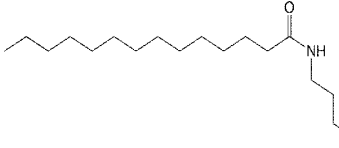
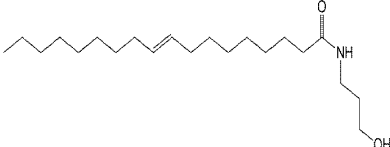
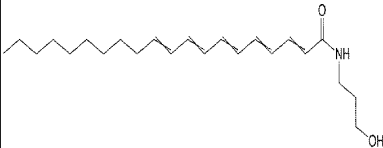
[302]

[303] **1-22. 미세조류오일과 아미노프로파놀을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체(ATO-AP)의 제조**

[304] 해바라기오일(SFO) 대신 미세조류오일(Aurantiochytrium oil, ATO)을 사용하여 96시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-1과 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. 미세조류오일의 지방산 조성은 도코사헥사엔산(docosahexaenoic acid) 54.0%, 팔미트산(palmitic acid) 37.0%, 미리스트산

(myristic acid) 5.0%, 올레산(oleic acid) 2.0%, 에이코사펜타엔산(eicosapentaenoic acid) 2.0% 등으로 구성되어 있으며 AP 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 도코사헥사엔산 AP 아미드(RT 9.52분), 팔미트산 AP 아미드(RT 7.99분) 등으로 확인 되었다(도 43). 미세조류오일의 AP 아미드의 최종 전환율은 88시간 동안 96%이었으며(도 44) 생성된 지방산 AP 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 22에 개시하였다.

[305] [표22]

지방산 AP 아미드	구조	화학식	분자 량(Da)	함량 (%)
Docosahexa enamide-AP		C ₂₅ H ₃₉ NO ₂	385.59	~54.0
Palmitamide-AP		C ₁₉ H ₃₉ NO ₂	313.53	~37.0
Myristamide-AP		C ₁₇ H ₃₅ NO ₂	285.47	~5
Oleamide-AP		C ₂₁ H ₄₁ NO ₂	339.56	~2.0
Eicosapenta enamide-AP		C ₂₃ H ₃₇ NO ₂	359.55	~2.0

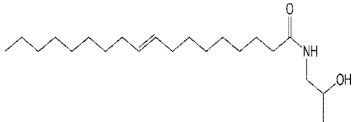
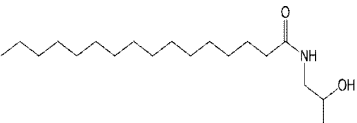
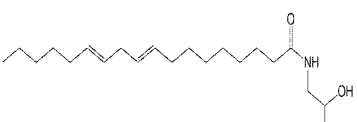
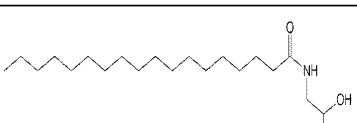
[306]

[307] 1-23. 동백오일과 모노이소프로파놀아민을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체(CAM-MIPA)의 제조

[308] 해바라기오일(SFO) 대신 동백오일(Camellia oil, CAM)을 사용하여 48시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-3과 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. 동백오일의 지방산 조성은 올레산(oleic acid) 78.2%, 팔미트산(palmitic acid) 9.6%, 리놀레산(linoleic acid) 9.1%, 스테아린산(stearic acid) 2.0% 등으로 구성되어 있으며 MIPA 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 올레산

MIPA 아미드, 리놀레산 MIPA 아미드, 및 스테아린산 MIPA 아미드(RT 8.2분), 팔미트산 MIPA 아미드(RT 7.7분) 등으로 확인되었다(도 45). 동백오일의 MIPA 아미드의 최종 전환율은 68시간 동안 96%이었으며(도 46) 생성된 지방산 MIPA 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 23에 개시하였다.

[309] [표23]

지방산 MIPA 아미드	구조	화학식	분자량(Da)	함량(%)
Oleamide-MIPA		$C_{21}H_{41}NO_2$	339.56	~78.2
Palmitamide-MIPA		$C_{19}H_{39}NO_2$	313.53	~9.6
Linoleamide-MIPA		$C_{21}H_{39}NO_2$	337.55	~9.1
Stearamide-MIPA		$C_{21}H_{43}NO_2$	341.58	~2.0

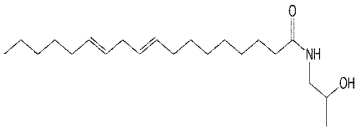
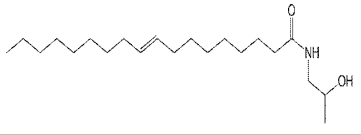
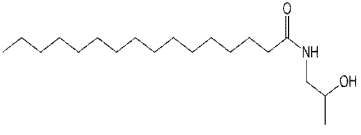
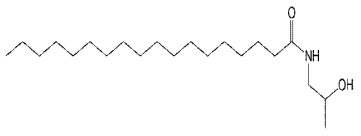
[310]

[311] **1-24. 홍화씨오일과 모노이소프로파놀아민을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체(SFF-MIPA)의 제조**

[312] 해바라기오일(SFO) 대신 홍화씨오일(Safflower oil, SFF)을 사용하여 48시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-3과 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. 홍화씨오일의 지방산 조성은 리놀레산(linoleic acid) 79.2%, 올레산(oleic acid) 10.8%, 팔미트산(palmitic acid) 6.2%, 스테아린산(stearic acid) 2.0% 등으로 구성되어 있으며 MIPA 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 리놀레산 MIPA 아미드, 올레산 MIPA 아미드, 및 스테아린산 MIPA 아미드(RT 8.19 분), 팔미트산 MIPA 아미드(RT 7.7분) 등으로 확인되었다(도 47). 홍화씨오일의 MIPA 아미드의 최종 전환율은 68시간 동안 96.5%이었으며(도 48) 생성된 지방산 MIPA 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 24에 개시하였다.

[313] [표24]

지방산 MIPA 아미드	구조	화학식	분자량(Da)	함량(%)
--------------	----	-----	---------	-------

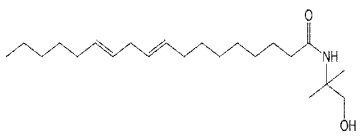
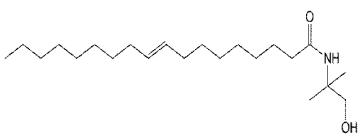
Linoleamide-MIPA		$C_{21}H_{39}NO_2$	337.55	~79.2
Oleamide-MIPA		$C_{21}H_{41}NO_2$	339.56	~10.8
Palmitamide-MIPA		$C_{19}H_{39}NO_2$	313.53	~6.2
Stearamide-MIPA		$C_{21}H_{43}NO_2$	341.58	~2.0

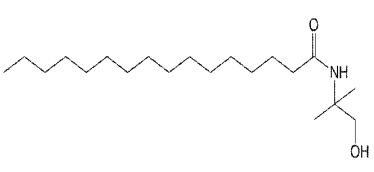
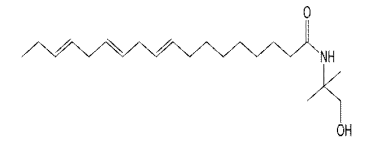
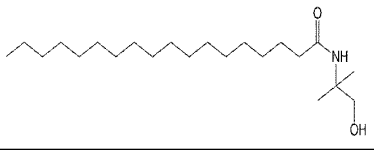
[314]

[315] **1-25. 대두유와 아미노메칠프로파놀을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체 (SBO-AMP)의 제조**

[316] 해바라기오일(SFO) 대신 대두유(SBO)를 사용하여 48시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-4와 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. AMP 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 팔미트산 AMP 아미드(RT 7.81분), 3개의 탄소길이가 같은 지방산 아미드(스테아린산 AMP 아미드, 올레인산 AMP 아미드 및 리놀레산 AMP 아미드, RT 8.29분) 및 리놀렌산 AMP 아미드(RT 8.33분)가 확인되었다(도 49). 대두유의 AMP 아미드의 최종 전환율은 165시간 동안 95%이었으며(도 50) 생성된 지방산 AMP 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 25에 개시하였다.

[317] [표25]

지방산 AMP 아미드	구조	화학식	분자량(Da)	함량(%)
Linoleamide-AMP		$C_{22}H_{41}NO_2$	351.57	~54
Oleamide-AMP		$C_{22}H_{43}NO_2$	353.59	~24

Palmitamide-AMP		$C_{20}H_{41}NO_2$	327.55	~11
Linolenamide-AMP		$C_{22}H_{39}NO_2$	349.56	~7
Stearamide-AMP		$C_{22}H_{45}NO_2$	355.35	~4

[318]

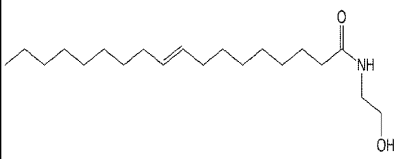
[319] 실시예 2. 지방산을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체 제조

[320]

[321] **2-1. 올레산과 에타놀아민을 이용한 내인성 카나비노이드 유사체(Oleamide-EA)의 제조**

[322] 해바라기오일(SFO) 대신 단일 지방산, 올레산(Oleic acid)을 사용하여 동일 농도의 에타놀아민과 48시간 동안 반응시키는 것을 제외하고는 상기 실시예 1-2와 유사한 방법으로 아미드화 반응을 수행하고 분석하였다. EA 아미드화 반응 후 나타난 GC 피크는 올레산 EA 아미드(RT 8.2분)로 확인되었다(도 51). 올레산의 EA 아미드의 최종 전환율은 200시간 동안 90%이었으며(도 52) 생성된 올레산 EA 아미드의 특성 및 조성은 하기 표 26에 개시하였다.

[323] [표26]

지방산 E A 아미드	구조	화학식	분자 량(Da)	함량 (%)
Oleamide-EA		$C_{20}H_{39}NO_2$	325.54	~90

[324]

[325] 실시예 3: 내인성 카나비노이드 유사체의 기능성 확인

[326]

[327] **3-1. 카나비노이드 수용체에 대한 결합효율 확인**

[328] 상기 본 발명의 실시예에 따라 생산된 내인성 카나비노이드 유사체의 기능성 확인을 위해 카나비노이드 수용체 1(CB1)과 수용체 2(CB2)를 대상으로 작용제(agonist) 효과를 확인하였다. 해바라기유와 아민알콜을 이용하여 제조한 내인성 카나비노이드 유사체, SFO-EA 및 SFO-AP를 시료로 사용하였으며, 효과 확

인은 시료가 수용체와 결합하면 단계적 신호전달에 의해 활성화되는 알파-G단백질(G-protein alpha) 및 이를 통해 활성화되는 아데닐릴 고리화효소(Adenylyl cyclase)에 의해 아데노신삼인산(ATP)로부터 생성되는 고리형아데노실일인산(cAMP)의 양을 측정하여 수행하였다. 측정된 데이터의 분석은 유로핀스 디스커버X(Eurofins DiscoverX)에 의뢰하였다.

[329] 분석결과, 하기 표 27에 정리된 바와 같이 양성대조군 CP55940의 CB1 및 CB2에 대한 반수효과량(effective concentration 50, EC50)은 0.222 nM(도 53), 1.019 nM(도 54) 수준으로 확인되었고, 이로부터 CB2보다 CB1에 대한 결합효율이 높은 것을 확인할 수 있었다.

[330] 상기 일련의 실시예에 따라 생산된 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-EA 및 SFO-AP는 모두 처리한 농도에 비례하여 CB1 및 CB2에 대한 결합효율이 향상되었으며, 각각의 반수효과량은 SFO-EA/CB1의 경우 512 nM(도 55), SFO-EA/CB2의 경우 1017 nM(도 56), SFO-AP/CB1의 경우 329 nM(도 57), SFO-AP/CB2의 경우 1632 nM(도 58)로 양성대조군과 마찬가지로 CB2보다 CB1에 대한 결합효율이 높은 것을 확인할 수 있었다.

[331] [표27]

시료	수용체	결과유형	결과값(nM)	그래프	
				최소	최대
CP55940	CB1	EC50	0.222	6.4389	101.75
	CB2	EC50	1.019	5.4524	102.07
SFO-EA	CB1	EC50	511.691	9.5913	102.88
	CB2	EC50	1017.157	8.985	83.249
SFO-AP	CB1	EC50	329.454	5	107.12
	CB2	EC50	1632.091	9.1835	93.997

[332]

[333] 3-2. 유해 미생물에 대한 생장억제효과 확인

[334] 상기 본 발명의 실시예에 따라 생산된 내인성 카나비노이드 유사체의 유해 미생물에 대한 생육억제효과를 확인하기 위하여, 식품의약품안전처의 미생물한도시험법에 특정된 5종의 미생물, 황색포도균(*Staphylococcus aureus*, Sa), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*, Pa), 대장균(*Escherichia coli*, Ec), 살모넬라(*Salmonella enteritidis*, Se), 칸디다알비칸스(*Candida albicans*, Ca)를 대상으로 테스트하였다. 생육억제효과 확인을 위해 전배양된 각 미생물을 600 nm에서의 흡광도 0.1이 되는 농도로 실험배지에 접종하였으며, 실험배지는 상기 실시예에 따라 생산된 내인성 카나비노이드 유사체 SFO-EA와 SFO-AP를 0에서 10 ppm의 농도로 첨가하여 실험에 사용하였다. 배양하는 동안 20분 간격으로 마이크로플레이트리더를

이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 세포성장도를 측정하고, 이로부터 생육억제효과를 확인하였다.

[335] 분석결과, SFO-EA를 배지에 첨가하였을 때, 황색포도균에 대하여 1 ppm(도 59), 대장균에 대하여 1 ppm(도 60), 살모넬라에 대하여 1 ppm(도 61), 칸디다알비칸스에 대하여 1 ppm(도 62) 이상의 농도에서 생육저해효과를 나타내었으며, 녹농균에 대해서는 테스트한 전체 농도 범위에서 생육억제효과를 나타내지 않는 것으로 나타났다(도 63).

[336] 한편, SFO-AP를 배지에 첨가한 경우에는, 황색포도균에 대하여 1 ppm(도 64), 대장균에 대하여 1 ppm(도 65), 살모넬라에 대하여 0.1 ppm(도 66), 칸디다알비칸스에 대하여 1 ppm(도 67) 이상의 농도에서 생육저해효과를 나타내었으며, 녹농균에 대해서는, SFO-EA와 마찬가지로, 테스트한 전체 농도 범위에서 생육억제효과를 나타내지 않는 것으로 나타났다(도 68).

[337]

[338] 3-3. 동물세포에 대한 세포독성 확인

[339] 상기 본 발명의 실시예에 따라 생산된 내인성 카나비노이드 유사체의 동물세포에 대한 독성 확인은 마우스 유래 섬유아세포인 NIH/3T3와 인간 유래 각질형성 세포인 HaCaT 세포주를 이용하여 수행하였다. 상기 각 세포주를 페니실린과 스트렙토마이신을 각각 100 IU/mL, 100 µg/mL의 농도로 포함하고 FBS(Fetal bovine serum)를 10% 함유하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지를 이용하여 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기에서 37°C의 조건으로 배양하였다. 살아있는 미토콘드리아 내에서 발현되는 탈수소효소작용에 의해 노란색을 띠는 기질인 MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)가 적자색을 띠는 포르마잔(formazan, 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan)으로 환원되는 원리를 이용한 MTT 어세이를 적용하여 세포독성을 확인하였다.

[340] 계대배양된 세포를 100 µL DMEM 배지가 포함된 96-웰 플레이트에 1×10^5 cells/well의 농도로 접종하고 48시간 동안 배양하였다. 이후 배지를 FBS를 포함하지 않은 무혈청배지(serum free media)로 교체한 뒤, 상기 준비한 내인성 카나비노이드 유사체(SFO-EA, SFO-AP, SFO-MIPA, CAM-MIPA, 및 SFF-MIPA)를 0.05에서 300 µM의 농도까지 각각 첨가하여 48시간 동안 추가 배양하였다. 48시간 배양 후 DoGenBio사의 MTT 어세이 용액인 EZ-Cytox를 각 웰에 10 µL 씩 첨가하고 2시간 안치한 뒤 450 nm에서 흡광도를 측정하여 살아있는 세포의 수를 계수하고, 그 값을 무처리군과 비교하여 세포독성을 분석하였다. 획득한 값은 무처리군과 유의성을 확인하기 위해 GraphPad 소프트웨어를 이용하여 unpaired *t*-test를 수행하였다.

[341] 실험결과, SFO-EA의 경우, 3T3에 대하여 테스트한 농도 범위에서는 세포독성이 나타나지 않은 반면(도 69), HaCaT에 대하여는 최고 농도인 303 µM에서 독성을 나타내기 시작하였다(도 70). SFO-AP의 경우, SFO-EA와 유사하게, 3T3에 대하여 테스트한 농도 범위에서는 세포독성이 나타나지 않았으며(도 71), HaCaT

에 대하여는 최고 농도인 303 μM 에서 독성을 나타내기 시작하였다(도 72). 한편, SFO-MIPA의 경우에는, 3T3와 HaCaT 모두에 대해 최고 농도인 303 μM 에서 독성을 나타내었다(도 73 및 74). 마찬가지로, CAM-MIPA의 경우에도, 3T3와 HaCaT 모두에 대해 최고 농도인 303 μM 에서 독성을 나타내었다(도 75 및 76). 또한, SFF-MIPA의 경우에도, 3T3와 HaCaT에 대해 최고 농도인 303 μM 에서 독성을 나타내었으며(도 77), HaCaT에 대하여는 34 μM 부터 세포독성을 나타내는 것이 확인되었다(도 78).

[342]

[343] **3-4. 인간 암세포에 대한 사멸효과 확인**

[344] 인간 폐암세포(lung-cancer cell) A549(ATCC catalog number: CCL-185)와 인간 비소세포폐암(non-small cell lung cancer) 세포 H1975(ATCC catalog number: CRL-5908)를 ATCC(American Type Tissue Collection)로부터 확보하였다. 세포배양을 위해 DMEM 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Thermo Fisher Scientific, Catalog number 11995-073)에 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Thermo Fisher Scientific, Catalog number 10437-036)을 첨가하여 사용하였다. 각각의 암세포(5×10^5 cells)를 6-웰 플레이트에 접종하고 24시간 동안 배양한 후 무처리군(DMSO), DMSO에 용해시킨 SFO-EA와 SFO-AP를 각각 100 μM 과 200 μM 씩 처리한 후 37°C에서 48시간 동안 추가 배양하고 세포사멸 여부를 현미경(Nikon Eclipse TE2000-S)으로 확인하였다(도 79). 실험결과, 100 μM 의 SFO-EA와 SFO-AP 처리군에서는 특별한 변화가 관찰되지 않았으나 200 μM 처리군에서는 SFO-EA와 SFO-AP 모두에 의해 세포의 사멸이 확인되었으며, 특히 비소세포폐암 세포 H1975에서 사멸효과가 보다 분명하게 나타났다.

[345] 또한, 인체 구강암세포(Human Head and Neck Squamous Carcinoma, HNSCC) 2종 SCC-1과 SCC22B를 시그마(Sigma)사로부터 구입하고, 세포배양을 위해 DMEM배지에 10% 소태아혈청(FBS)을 첨가하여 사용하였다. 전술한 폐암세포와 유사하게, 상기 2종 구강암세포(5×10^5 cells)를 배양하고, SFO-EA 또는 SFO-AP를 처리하여 추가 배양한 후 세포사멸 여부를 현미경(Nikon Eclipse TE2000-S)으로 확인하였다(도 80). 폐암세포에서와 마찬가지로, 구강암세포의 경우에도 100 μM 의 SFO-EA와 SFO-AP 처리군에서는 특별한 변화가 관찰되지 않았으나, 200 μM 처리군에서는 SFO-EA와 SFO-AP 모두에 의해 세포의 사멸이 확인되었다.

[346] 나아가, 인간 전립선암세포(Human prostate cancer cell line C4-2B)를 ATCC(CRL-3315)로부터 구입하고, 세포배양을 위해 DMEM 배지에 10% 소태아혈청(FBS)을 첨가하여 사용하였다. 전술한 암세포들과 유사하게, 상기 2종 전립선암세포(5×10^5 cells)를 배양하고, SFO-EA 또는 SFO-AP를 처리하여 추가 배양한 후 세포사멸 여부를 현미경(Nikon Eclipse TE2000-S)으로 확인하였다(도 81). 앞선 암세포에서와 마찬가지로, 전립선암세포의 경우에도 100 μM 의 SFO-EA와

SFO-AP 처리군에서는 특별한 변화가 관찰되지 않았으나, 200 μ M 처리군에서는 SFO-EA와 SFO-AP 모두에 의해 세포의 사멸이 확인되었다.

- [347] 마지막으로, 인간 방광암세포(Human urinary bladder cancer cell line) T24를 ATCC(HTB-4)로부터 구입하고, 세포배양을 위해 DMEM 배지에 10% 소태아혈청(FBS)을 첨가하여 사용하였다. 전술한 암세포들과 유사하게, 상기 2종 방광암 세포(5×10^5 cells)를 배양하고, SFO-EA 또는 SFO-AP를 처리하여 추가 배양한 후 세포사멸 여부를 현미경(Nikon Eclipse TE2000-S)으로 확인하였다(도 82). 방광암 세포의 경우에도 100 μ M의 SFO-EA와 SFO-AP 처리군에서는 특별한 변화가 관찰되지 않았으나, 200 μ M 처리군에서는 SFO-EA와 SFO-AP 모두에 의해 세포의 사멸이 확인되었다.
- [348] 테스트한 대부분의 암세포에서 사멸 정도의 차이는 있으나 100~200 μ M 처리 시 사멸효과가 확인되었다. 따라서, 이러한 내인성 카나비노이드 유사체(SFO-EA 및 SFO-AP)가 암세포를 사멸시키는 효과가 카나비노이드 수용체를 통한 신호전달(signaling)과 이를 통해 발생하는 세포사멸사(apoptosis) 때문인지 확인하기 위하여 2가지 CB2(CNR2) siRNA(5'-CUCAUCAACUCCAUGGUCA[dT][dT]-3', 5'-CUGUUAUCGCCUUCUCU[dT][dT]-3')와 대조군 siRNA(Universal Negative Control #1, SIC001)를 시그마사로부터 구입하였다. 인간 비소세포폐암 세포 H1975(5×10^5 cells)를 60 mm 조직배양플레이트에 접종한 후 24시간 동안 배양하였다. 이후 세포에 상기 준비한 각각의 siRNA 100 nM을 Lipofectamine RNAiMAX 시약(Thermo Fisher Scientific, Cat#13778150)과 혈청축소배지(Reduced Serum Medium, Opti-MEM™, TFS, catalog# 31985070)를 사용하여 48시간 동안 형질감염(transfection)시켰다. 이후 다시 DMSO, SFO-EA를 50 μ M과 100 μ M을 처리하여 차이를 비교하였다(도 83). 실험결과, 상기 2종의 siRNA를 처리한 경우, SFO-EA에 의한 세포의 사멸효과가 현저히 경감됨을 확인하였다. 이러한 결과는 본 발명의 실시예에 따라 제조된 내인성 카나비노이드 유사체가 인간 카나비노이드 수용체를 통해 세포내 신호전달을 하고 이를 통해 암세포의 사멸을 유도함을 나타내는 것이다.

[349]

[350] **3-5. 내인성 카나비노이드 유사체의 항염효과 확인(NO 생성 억제)**

- [351] 상기 실시예에 따라 해바라기유로부터 제조된 4가지 내인성 카나비노이드 유사체(SFO-EA, SFO-AP, SFO-MIPA, 및 SFO-AMP)를 이용하여 항염효과를 확인하였다. 대식세포(Macrophage)에 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)를 처리하여 염증 인자 생성을 유도하고, 본 발명의 실시예에 따라 제조된 4가지 내인성 카나비노이드 유사체를 처리하여 염증생성을 억제하는지 여부를 확인하였다. 구체적으로, RAW 264.7 세포를 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank)에서 구입하였고 세포배양을 위하여 DMEM 배지와 항생제(페니실린/스트렙토마이신, Penicillin/streptomycin), 우태아 혈청(Fetal bovine serum, FBS)을 사용하였다. 그

리스 시약(Griess reagent)을 이용하여 세포 배양액에 존재하는 NO_2^- 의 발현 정도를 측정하였다. 세포독성평가를 위하여 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 시약, DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 사용하였으며, NO 함량 측정을 위하여 LPS, 그리스 시약을 사용하였다. 분석기기로는 마이크로플레이트 리더를 사용하여 흡광도를 측정한 후 항염증 효능평가 분석을 수행하였다. RAW 264.7 세포를 24-웰 플레이트에 1.5×10^5 cells/well로 분주하였다. 24시간 동안 전 배양한 뒤, 시료를 농도별로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 24-웰 플레이트로부터 상층액 100 μL 를 취하여 96-웰 플레이트에 옮긴 후 그리스 시약 100 μL 를 첨가하여 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 세포에서 시료를 처리하여 NO 생성을 얼마나 억제할 수 있는지 평가하기 위해, 그리스 시약을 사용하여 세포 배양 배지 속에 축적된 NO의 생성량을 아질산염 형태로 측정하였다. 실험결과, SFO-EA(도 84), SFO-AP(도 85), SFO-MIPA(도 86), 및 SFO-AMP(도 87)는 5ppm(14 μM), 10ppm(28 μM), 20ppm(56 μM)에서 농도 의존적인 NO 생성억제 효과가 확인되었고 양성대조군으로 사용한 L-NIL(40 μM)보다 우수한 항염효과를 발휘하는 것이 확인되었다. 특히 SFO-MIPA의 경우 가장 강한 항염활성이 확인되었으며 SFO-AMP의 경우에는 항염활성이 강하지만 세포독성도 어느 정도 나타나는 것으로 확인되었다.

[352]

[353] **3-6. 내인성 카나비노이드 유사체의 항염효과 확인(염증성 사이토카인 생성 억제)**

[354] 상기 실시예 3-5에서 강한 항염효과를 보인 SFO-MIPA를 이용하여 전염증성 사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α) 생성을 억제하는지 조사하기 위해 ELISA 키트를 사용하여 전염증성 사이토카인의 생성량 변화를 확인하였다. RAW 264.7 세포를 24-웰 플레이트에 1.5×10^5 cells/well로 분주한 후, 24시간 동안 배양한 뒤, 세포 독성이 없는 농도의 시료와 LPS(1 $\mu\text{g/mL}$)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 세포 배양액을 5,000 rpm으로 5분 동안 원심 분리한 후, 상등액을 취해 ELISA 키트로 제조사의 방법에 따라 IL-1 β (도 88), IL-6(도 89), TNF- α (도 90)의 함량을 측정하였다. 실험결과, SFO-MIPA는 LPS에 의해 유도된 전염증성 사이토카인의 생성을 유의하게 감소시켰다. NF- κB 특이적 억제제인 APDTC는 L-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성을 각각 45.39%, 47.12%, 20.28% 감소시킨 반면, 테스트 샘플인 SFO-MIPA는 최고농도인 20 ppm에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성을 각각 53.15%, 65.06%, 24.62% 감소시킨 것을 확인할 수 있었다.

[355]

[356] **3-7. 내인성 카나비노이드 유사체의 항천식 효과 확인**

[357] 상기 실시예 3-5 및 3-6에서 확인한 바와 같이, 본 발명의 실시예에 따라 제조한 내인성 카나비노이드 유사체가 항염효과를 나타냄이 확인되었는 바, 이들 화

합물의 전형적인 염증질환인 천식 치료제로서의 적용 가능성을 확인하기 위하여 천식 마우스 모델을 이용하여 항천식 효과를 확인하였다. 평균 체중 20 g 내외의 6주령 Balb/c 암컷 생쥐를 1주간 적응기간을 가진 후에 산화알루미늄(Alum, A8222, Sigma)과 난백알부민(OVA, A5503, sigma)을 현탁한 인산완충용액 200 μ L를 복강에 감작시켰다(0일차; 30 μ g OVA/30mg Alum 및 7일차; 30 μ g OVA/30mg Alum). 11일부터 13일까지 3일 동안 1% 난백알부민을 초음파분무기를 이용하여 60분 동안 흡입시켰다. 양성대조군과 내인성 카나비노이드(SFO-EA) 투여는 9일부터 13일까지 진행되었다. 15일에 기관지 절개를 실시하여 총 1.4 mL의 생리식염수를 기관지 폐포 세척을 실시한 뒤 검체를 수거하였다.

- [358] 정상 대조군(NC)으로 난백알부민을 비투여 및 비흡입한 군, 천식 유도군(OVA)으로 난백알부민을 투여 및 흡입하여 기관지 천식을 유도한 군, 비교군으로 난백알부민 흡입 1시간 전에 덱사메타손(Dexamethasone, DEX, 1 mg/kg, p.o.)을 경구투여한 군, 본 발명의 실시예에 따라 제조한 내인성 카나비노이드 유사체를 경구투여 또는 비강투여한 군(0.625%, 1.25%, 2.5%, p.o. 또는 i.n.)을 준비하였다. 기관지 폐포에 존재하는 Th2 사이토카인을 측정하기 위하여 샌드위치형 면역효소반응 방법을 사용하였다. 수득한 각 실험구의 기관지 폐포 세척액을 사이토카인 항체가 붙어 있는 96-웰 플레이트에 넣어 2시간 동안 실온에서 항원-항체 반응을 유도하였다. IL-4, IL-5, 및 IL-13의 함량을 측정하기 위하여 ELISA 키트(R&D System)를 사용하였으며 제조사의 방법에 따라 각 사이토카인의 함량을 측정하였다. 실험결과, 도 91에 나타난 바와 같이, 본 발명의 실시예에 따라 제조한 내인성 카나비노이드 유사체를 경구투여한 생쥐에서 IL-4와 IL-5 생성 억제효과(0.625% 와 2.5%)가 나타났으며 비강투여는 IL-4, IL-5와 IL-13 모두에 대해 전반적으로 우수한 생성 억제효과를 나타내었다.

[359]

[360] **3-8. 내인성 카나비노이드 유사체의 통증억제효과 확인**

- [361] 해바라기유로 제조된 내인성 카나비노이드 유사체(SFO-EA)의 통증억제효과를 확인하기 위하여 생후 5~6주의 체중이 25g 정도인 수컷 ICR 마우스를 이용하였다. 급성 염증성 통증 마우스 모델로 알려진 포르말린(formalin) 테스트의 통증반응 분석을 통하여 SFO-EA의 통증억제 효능을 확인하였다. 포르말린 테스트는 마우스의 발바닥 내에 포름알데하이드 용액을 주사하여 급성 염증성 통증을 유발시키는 모델이며, 본 발명에서는 2.5% 농도의 포름알데하이드 용액을 20 μ L 용량으로 주사하였다. 이때, CB1 수용체의 내인성 길항제로 알려진 아난다미드(Anandamide) 0.1 μ g/20 μ L 투여군을 양성 대조군으로 사용하였으며, SFO-EA는 농도 의존적 효과를 확인하기 위하여 각각 0.1 μ g/20 μ L(low), 0.3 μ g/20 μ L(mid), 1 μ g/20 μ L(high) 용량으로 투여하였다. 각각의 시험 물질은 포르말린 투여 20분 전에 마우스의 발바닥 내에 투여하였다. 포르말린 주사 후, 총 1시간 동안 주사한 발을 씹고 물어 뜯거나 핥는(chewing, biting, licking) 반응을 나타내는 시간을 5분

간격으로 나누어 측정하여 통증을 느끼는 시간(licking time)을 분석하였고 그 결과를 도 92 및 도 93에 나타내었다.

[362] 실험결과, SFO-EA를 mid 및 high 농도로 투여한 마우스의 경우, 급성 염증성 통증이 유발된 마우스와 대비하여 통증을 느끼는 정도가 감소하는 것을 확인하였으며, 통증 개선 정도가 양성대조군으로 사용한 아난다미드를 투여한 마우스에서의 통증 개선 효과와 비슷한 수준으로 나타나는 것을 확인하였다. 이는 SFO-EA가 통증 개선 효과를 나타냄을 시사하는 것이다.

[363]

[364] **3.9. 내인성 카나비노이드 유사체의 동물 증체 효과 확인**

[365] 내인성 카나비노이드 SFO-EA를 이용한 동물 증체 효과를 확인하기 위하여 이 유자돈 체중 kg 당 100 mg의 SFO-EA를 첨가한 사료를 3주간 급여하였다. 대조군과 실험군 별로 이 유자돈 10마리를 이용하여 시작체중과 종료체중을 2회 반복 측정하여 평균증체량과 사료섭취량을 비교하여 사료요구율을 산출하였다(표 28).

[366] [표28]

일령		대조군			실험군		
		H1-21	H1-31	평균	H1-1	H1-11	평균
시작 체중	1	7.1	5.6		7.1	5.6	
	2	6.6	5.6		6.8	5.5	
	3	6.5	5.5		6.4	5.5	
	4	6.2	5.5		6.4	5.5	
	5	6.0	5.4		6.3	5.4	
	6	6.0	5.4		6.1	5.1	
	7	6.0	5.1		6.0	5.1	
	8	5.9	4.9		6.0	5.1	
	9	5.8	4.9		5.9		
	10		4.7		5.8		
	평균	6.23	5.26	5.75	6.28	5.35	5.82
종료 체중	1	13.0	7.9		10.6	12.4	
	2	9.8	8.9		11.1	11.0	
	3	9.8	7.9		13.5	12.0	
	4	8.6	9.3		13.1	10.0	
	5	10.4	9.9		12.3	10.0	

	6	8.3	9.5		11.3	8.9	
	7	10.7	10.6		10.3	11.8	
	8	9.6	7.6		9.3	8.7	
	9	14.1	10.5		8.7		
	10		10.6		10.5		
	평균	10.48	9.27	9.87	11.07	10.60	10.84
	시작 표준 편차	0.42	0.33	0.38	0.41	0.21	0.31
	종료 표준 편차	1.92	1.16	1.54	1.54	1.42	1.48
	두 수	9	10	9.5	10	8	9
	급여 기간	21	21	21	21	21	21
		70.0	70.0	140.0	70.0	70.0	140.0
	총 섭 취량 (두)	7.78	7.00	7.39	7.00	8.75	7.88
	일당섭 취량 (두/일)	0.37	0.333	0.35	0.333	0.417	0.38
증체 량(kg)	총 증 체량 (두)	4.24	4.01	4.13	4.79	5.25	5.02
	일당증 체량 (두/일)	0.202	0.191	0.20	0.228	0.250	0.24
사료요구율		1.832	1.746	1.79	1.461	1.667	1.56

[367] 분석 결과는, 도 94에 요약한 바와 같이, 대조군 대비 증체량이 21.5 %로 확인되었고, 사료요구율은 14.7% 감소하여 내인성 카나비노이드 유사체인 SFO-EA 급이시 증체효과가 있었고 사료첨가제로서의 유효한 기능이 확인되었다.

[368]

[369] **3-10. 내인성 카나비노이드 유사체의 경구투여 독성 분석**

- [370] 해바라기유로 제조된 4종의 내인성 카나비노이드 유사체(SFO-EA, SFO-AP, SFO-MIPA, 및 SFO-AMP)에 대한 경구투여에 따른 독성분석을 위하여 (주)바이오톡스텍에 의뢰하여 단회 경구투여 독성시험을 실시하였다. 구체적으로, 암수 ICR 마우스를 이용하여 시험물질인 SFO-EA, SFO-AP, SFO-MIPA, 및 SFO-AMP를 각각 5,000mg/kg 단회 경구투여하여 독성반응을 관찰하였다.
- [371] 개체별 투여액량은 투여당일의 투여 전(절식 후) 체중을 기준으로 산출하였다. 조제물을 50°C이내의 온도에서 중탕으로 녹여 사용하였다. 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기를 이용하여 위내에 강제 투여하였다. 모든 동물은 투여 전에 약 16시간 음수는 자유섭취 시키면서 절식시키고, 최종투여 후 약 4시간에 사료를 급여하였다. 투여 당일(투여 1일)에 투여 후 30분까지 1회 이상, 1, 2, 4 및 6 시간째에 일반상태(독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기등) 및 사망유무를 관찰하고 이후, 3일간(투여 2일부터 4일까지) 매일 1회 일반증상을 관찰하였다.
- [372] 실험결과, 4종의 엔도카나비노이드 유사체(SFO-EA, SFO-AP, SFO-MIPA, 및 SFO-AMP)를 5000mg/kg 용량으로 투여한 경우 사망례는 전혀 관찰되지 않았으며, 체중변화는 하기 표 29 내지 32에 각각 나타내었다. 결과적으로, 4종의 내인성 카나비노이드 유사체(SFO-EA, SFO-AP, SFO-MIPA, 및 SFO-AMP)는 경구투여시 유효한 독성이 관찰되지 않았다.

[373] [표29]

용량 (mg/kg)	성별	실험동물 ID	일자별 체중(g)		
			1일	2일	4일
5,000	수컷	1101	204.0	209.5	244.6
	암컷	2101	135.9	147.2	166.1

[374] [표30]

용량 (mg/kg)	성별	실험동물 ID	일자별 체중(g)		
			1일	2일	4일
5,000	수컷	1101	175.6	192.1	222.6
	암컷	2101	134.7	148.2	161.1

[375] [표31]

용량 (mg/kg)	성별	실험동물 ID	일자별 체중(g)		
			1일	2일	4일
5,000	수컷	1101	217.5	209.6	246.1
	암컷	2101	134.8	142.4	161.2

[376] [표32]

용량	성별	실험동물 ID	일자별 체중(g)
----	----	---------	-----------

(mg/kg)			1일	2일	4일
5,000	수컷	1101	171.4	183.8	210.7
	암컷	2101	169.8	173.9	201.1

[377]

[378] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

- [청구항 1] 리파제를 이용하여 가수분해에 의해 2종 이상의 지방산을 제공하는 중성 지방 함유 식물성 오일과 C₂₋₆ 아미노알콜의 아미드화 반응을 수행하는 단계를 포함하는, 내인성 카나비노이드 유사체(endocannabinoid analogues)의 제조방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 내인성 카나비노이드 유사체는 지방산의 카르복실기와 C₂₋₆ 아미노알콜의 아민기 사이의 아미드 결합을 형성하여 제공되는 지방산 아미드(fatty acid amide, FAA)인 것인, 제조방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 식물성 오일은 해바라기오일(Sunflower oil, SFO), 올리브오일(Olive oil, OLO), 코코넛오일(Coconut oil, CNO), 대두유(Soybean oil, SBO), 포도씨오일(Grapeseed oil, GSO), 달맞이꽃종자오일(Evening primrose oil, EPO), 유채씨오일(Rapeseed oil, RSO), 메도우폼씨오일(Meadowfoam seed oil, MFO), 아비시니아씨드오일(Abyssinica seed Oil, ABSO), 햄프씨드오일(Hempseed oil, HSO), 아보카도오일(Avocado oil, AVO), 미강유(Rice bran oil, RBO), 시어버터(Shea butter, SHB), 미세조류오일(Aurantiochytrium oil, ATO), 동백오일(Camellia oil, CAM), 홍화씨오일(Safflower oil, SFF), 팜유(Palm oil), 마카다미아넛유(Macadamia nut oil), 겨자유(Mustard oil), 및 피마자유(Caster oil)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 제조방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 2종 이상의 지방산은 리놀레산(linoleic acid), 리놀렌산(linolenic acid), 올레산(oleic acid), 스테아린산(stearic acid), 팔미트산(palmitic acid), 미리스트산(myristic acid), 라우르산(lauric acid), 카프르산(capric acid), 에이코센산(eicosenoic acid), 에루스산(erucic acid), 도코사디엔산(docosadienoic acid), 베헨산(behenic acid), 도코사헥사엔산(docosahexaenoic acid), 에이코사펜타엔산(eicosapentaenoic acid), 아라키돈산(arachidonic acid), 도데칸산(dodecanoic acid), 헥산산(hexanoic acid), 카프로산(caproic acid), 트리팔미틴(tripalmitin), 트리카프로인(Tricaproin), 및 트리카프린(Tricaprin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 둘 이상의 혼합물인 것인, 제조방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 C₂₋₆ 아미노알콜은 아미노프로판올(3-amino-1-propanol, AP), 에타놀아민(ethanolamine, EA), 모노이소프로판올아민(monoisopropanolamine, MIPA), 아미노메틸프로판올(2-amino-2-methyl-1-propanol, AMP), 3-아미노-1,2-프로판디올(3-amino-1,2-propandiol), 및 세리놀(serinol, 2-

- aminopropane-1,3-diol)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 제조방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 리파제는 식물성 오일 대비 0.01% 내지 30%(w/v) 비율로 첨가되는 것인, 제조방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 C₂₋₆ 아미노알콜은 식물성 오일 대비 1:1 내지 1:3의 물비로 사용하는 것인, 제조방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 아미드화 반응은 40°C 내지 70°C에서, 15 내지 200시간 동안 수행하는 것인, 제조방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
85% 내지 99%의 전환율로 수행되는 것인, 제조방법.
- [청구항 10] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체를 유효성분으로 포함하는, 유해세균 생육억제용 조성물.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 유해세균은 황색포도균, 대장균, 살모넬라 또는 칸디다알비칸스인 것인, 유해세균 생육억제용 조성물.
- [청구항 12] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체를 유효성분으로 포함하는, 암 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 암 질환은 폐암(lung cancer), 구강암(oral cancer), 전립선암(prostate cancer), 방광암(bladder cancer), 직장암(colorectal cancer), 결장암(colon cancer), 담관암중(cholangiocarcinoma, bile duct carcinoma), 위암(gastric cancer), 유방암(breast cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 난소암(ovarian cancer), 태반암중(placental cancer), 융모암중(choriocarcinoma), 편평상피세포식도암(esophageal squamous cell cancer), 교아세포종(glioblastomas), 흑색종(melanomas), 신장암(renal carcinomas) 경부편평세포암(cervical squamous cell carcinomas), 간세포암중(hepatocellular carcinomas), 또는 자궁경부상피내종양(cervical intraepithelial neoplasia)인 것인, 암 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 14] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,

상기 염증성 질환은 천식, 관절염, 아토피성 피부염, 건선, 다발성 경화증, ssRNA 및 dsRNA 바이러스 감염증, 패혈증, 다발성 연골염, 경피증, 습진, 통풍, 치주질환, 베체트 증후군, 부종, 백관염, 가와사키병, 당뇨병성 망막염, 자가 면역 췌장염, 혈관염, 사구체 신염, 급성 및 만성 기관지염, 크론병, 인플루엔자 감염증, 알러지성 천식, 알러지성 비염, 알러지성 점막염, 두드러기, 아나필락스(anaphylax), 경피증(systemic sclerosis), 피부근염(dermatomyositis) 또는 포함체 근육염(inclusion body myositis)인 것인, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

- [청구항 16] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체를 유효성분으로 포함하는, 통증억제용 조성물.
- [청구항 17] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체를 유효성분으로 포함하는, 사료용 조성물.
- [청구항 18] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 식물성 오일 유래 내인성 카나비노이드 유사체를 유효성분으로 포함하는, 식품 조성물.