



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0096991
(43) 공개일자 2020년08월14일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 33/44</i> (2006.01) <i>A61P 1/16</i> (2006.01)
 <i>A61P 31/14</i> (2006.01) <i>A61P 31/20</i> (2006.01)
 <i>C01B 32/15</i> (2017.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 33/44</i> (2013.01)
 <i>A61P 1/16</i> (2018.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-7022420(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2013년03월15일
 심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2014-7029083
 원출원일자(국제) 2013년03월15일
 심사청구일자 2018년03월14일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2020년08월03일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/GB2013/050673</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2013/136094
 국제공개일자 2013년09월19일</p> <p>(30) 우선권주장
 1204696.7 2012년03월16일 영국(GB)</p> | <p>(71) 출원인
 유씨엘 비즈니스 리미티드
 영국 더블유1티 4티피 런던 토텐햄 코트 로드 97
 더 네트워크 빌딩</p> <p>(72) 발명자
 호웰 캐롤 안젤라
 영국 웨스트 서식스 비엔17 6제이지 리틀햄프턴
 토딩턴 파크 25
 미카로브스키 세르게이 빅토르비치
 영국 이스트 서식스 비엔2 8이디 솔트던 너틀리
 로드 37
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 리엔목특허법인</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 간질환의 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자

(57) 요약

본 발명은, 총 포어 부피 중 20% 이상은 2 내지 200 nm의 평균 직경을 갖는 포어로 구성되고 및/또는 상기 입자는 직경 2 nm 이하의 마이크로포어 및 직경 50 nm 내지 500 nm의 작은 마크로포어를 포함하나, 실질적으로 직경 2 nm를 초과하고 50 nm 미만인 메소포어를 포함하지 않고, 실질적으로 500 nm를 초과하는 직경의 큰 마크로포어를 포함하지 않는, 간질환의 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자를 제공한다.

(52) CPC특허분류

A61P 31/14 (2018.01)

A61P 31/20 (2018.01)

C01B 32/15 (2017.08)

C01P 2004/64 (2013.01)

C01P 2006/16 (2013.01)

(72) 발명자

샌드맨 수잔 레이첼

영국 이스트 서식스 비엔1 8디큐 브라이턴 러스팅
턴 로드 45

잘란 라지브

영국 런던 더블유씨1이 6에이치엑스 체니스 뮤스
69-75 유니버시티 콜리지 런던 인스티튜트 오브 히
파톨로지 디비전 오브 메디슨

맥나우탄 제인

영국 런던 엔더블유6 3피제이 사우스 햄스테드 그
링크로프트 가든즈 126

명세서

청구범위

청구항 1

총 포어 부피(pore volumn) 중 20% 내지 90%는 2 nm 이하의 평균 직경을 갖는 포어로 구성되고 총 포어 부피의 나머지 중 75% 이상은 30 nm 내지 500 nm의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된, 간질환 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자(porous carbon particle).

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 총 포어 부피의 나머지 중 85% 이상은 30 nm 내지 500 nm의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된 것인 간질환 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 총 포어 부피의 나머지 중 90% 이상은 30 nm 내지 500 nm의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된 것인 간질환 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자.

청구항 4

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 총 포어 부피의 나머지 중 75% 이상, 85% 이상, 또는 90% 이상은 50 nm 내지 300 nm의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된 것인 간질환 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자.

청구항 5

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 총 포어 부피의 나머지 중 75% 이상, 85% 이상, 또는 90% 이상은 50 nm 내지 200 nm의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된 것인 간질환 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자.

청구항 6

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 총 포어 부피 중 35% 내지 60%는 2 nm 이하의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된 것인 간질환 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자.

청구항 7

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 총 포어 부피 중 45% 내지 55%는 2 nm 이하의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된 것인 간질환 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자.

청구항 8

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 총 포어 부피는 0.5 내지 $2.5 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ 인 것인 간질환 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자.

청구항 9

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 총 포어 부피는 1.0 내지 $2.0 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ 인 것인 간질환 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자.

청구항 10

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다공성 탄소 입자의 벌크 밀도(bulk density)는 0.10 gcm^{-3} 내지 0.30 gcm^{-3} 인 것인 간질환 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자.

청구항 11

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다공성 탄소 입자의 벌크 밀도는 0.15 gcm^{-3} 내지 0.25 gcm^{-3} 인 것인

간질환 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자.

청구항 12

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 비표면적(specific surface area)은 $700 \text{ m}^2/\text{g}$ 내지 $2000 \text{ m}^2/\text{g}$ 인 것인 간질환 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자.

청구항 13

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 비표면적은 $900 \text{ m}^2/\text{g}$ 내지 $1400 \text{ m}^2/\text{g}$ 인 것인, 간질환 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자.

청구항 14

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 입자는 구형(spherical) 입자의 형태로 존재하는 것인 간질환 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자.

청구항 15

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 입자는 경구 또는 직장(rectally) 투여되는 것인 간질환 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 입자는 자유-유동 형태(free-flowing form) 또는 정제 형태로 경구 투여되는 것인 간질환 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자.

청구항 17

청구항 1 내지 16 중 어느 한 항에 있어서, 상기 간질환은 알코올성 간질환(alcoholic liver disease: ALD), 비-알코올성 간질환, 비-알코올성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis: NASH), 간경변, 및/또는 간경변의 합병증으로부터 선택되는 것인 간질환 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 비-알코올성 간질환은 비-알코올성 지방간질환(non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD)인 것인 간질환 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자.

청구항 19

청구항 1 내지 16 중 어느 한 항에 있어서, ALD, NAFLD 또는 바이러스성 간염과 같은 만성 간질환의 염증 및 섬유증의 치료 또는 예방에서 사용하기 위한 것인 간질환 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자.

청구항 20

청구항 17에 있어서, 상기 간경변의 합병증은 문맥성 고혈압(portal hypertension), 복수(ascites), 신부전, 간성뇌증(hepatic encephalopathy), 및 급만성 간부전(acute-on-chronic liver failure)으로부터 선택되는 것인 간질환 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자.

청구항 21

청구항 1 내지 16 중 어느 한 항에서 정의된 다공성 탄소 입자의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 간질환을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 22

간질환의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에 있어서 청구항 1 내지 16 중 어느 한 항에서 정의된 다공성 탄소 입자의 용도.

청구항 23

장-간 축(gut-liver axis)의 조절(modulation)에 이용하기 위한, 청구항 1 내지 16 중 어느 한 항에서 정의된 다공성 탄소 입자.

청구항 24

청구항 23에 있어서, 상기 장-간 축의 조절은 장내 세균총 불균형(gut dysbiosis) 또는 비만의 조절, 또는 증가된 장 투과성(gut permeability)에 의한 것인 다공성 탄소 입자.

청구항 25

청구항 24에 있어서, 관상동맥 질환, 염증성 장질환, 과민성 대장 증후군, 맹낭염(pouchitis), 고혈압, 뇌졸중, 비만 또는 비만의 합병증으로부터 선택되는 질환 또는 상태의 치료 또는 예방에 이용하기 위한 것인 다공성 탄소 입자.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 상기 질환 또는 상태는 장내 세균총 불균형 및/또는 장 투과성의 변화와 연관된 것인 다공성 탄소 입자.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 직경 2 nm 이하의 마이크로포어 및 직경 30 nm 내지 500 nm의 메소 포어(meso pore)/작은 마크로포어(small macropore)를 포함하나, 실질적으로 2 nm를 초과하고 30 nm 미만인 직경의 메소 포어를 포함하지 않고, 실질적으로 500 nm를 초과하는 직경의 큰 마크로포어를 포함하지 않는, 다공성 탄소 입자를 이용하는 간질환의 치료 또는 예방에 관한 것이다. 또한, 본 명세서의 개시는 총 포어 부피(pore volume) 중 20% 이상은 2 내지 200 nm의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된 다공성 탄소 입자를 이용하는 간질환의 치료 또는 예방이다. 또한, 본 발명은 그와 같은 다공성 탄소 입자를 이용하는, 간질환의 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 미국에서만 간부전으로 해마다 60,000명의 사람들이 사망하는 것으로 추산되는 반면, 기증자 풀(donor pool)은 약 4000명으로 일정하게 유지되나, 대기 목록에 16-18,000명이 있다. 이 목록상에서 대기 중인 개체에 대한 기증자 간의 수여 가능성은 단지 8명 중 1명이고, 여전히 이 환자군의 수명을 연장하기 위하여 이용가능한 효과적인 치료 또는 예방은 존재하지 않는다.

[0003] 간부전은 다장기 기능 이상을 초래하고 사망률은 대략 80%이다. 박테리아-유래 독소 및 아세트알데히드와 같은 독성 대사물질은 질환 발병에 있어서 핵심적인 역할을 수행한다. 예를 들면, 장-유래 내독소혈증 및 박테리아의 전이는 간경변 및 그의 합병증의 발병에서 중심 역할을 수행한다. 그러나, 이들 인자를 표적화하는 치료 옵션은 현재 내성 유기체에 의한 감염의 수반되는 문제를 갖는 장기 항생제에 제한되어 있다.

[0004] 경구 투여된 흡착 다공성 탄소 입자는 주된 부작용 없이 여러 장애의 치료 또는 예방에서 수 세기 동안 이용되었다. 활성화된 탄소는 중독을 치료하는데 널리 이용된다. 마이크로포러스(microporous) 탄소인 AST-120 (일본의 Kureha Corp.로부터 상표명 KREMEZIN® 하에 이용가능)은 신부전을 앓는 환자를 치료하는데 이용된다. 그러나, 간성뇌증의 관리에서 AST-120의 효과를 평가하는 임상 시험은 부정적인 것으로 입증되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 발명의 요약

[0006] 본 발명은 간질환의 치료 또는 예방에 관한 것이다.

[0007] 따라서, 본 발명은 총 포어 부피 중 20% 내지 90%는 2 nm 이하의 평균 직경을 갖는 포어로 구성되고 총 포어 부피의 나머지 중 75% 이상은 30 nm 내지 500 nm의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된, 간질환 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자를 제공한다.

- [0008] 또한, 본 발명은 그와 같은 다공성 탄소 입자의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 간질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 간질환의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에 있어서 그와 같은 다공성 탄소 입자의 용도를 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 명세서 전체적으로, 용어 "포함하다(comprise)", 또는 "포함된(comprised)" 또는 "포함하는(comprising)"과 같은 변이체는, 진술된 요소, 정수(integer) 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계의 군의 포함을 의미하나, 기타의 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계의 군의 배제를 의미하지 않는 것으로 이해될 것이다.
- [0011] 본 명세서에서 사용된 용어 "조절된 다공성의 탄소 입자(carbon particle of controlled porosity)"는 "다공성 탄소 입자(porous carbon particle)"와 동등하다.
- [0012] 본 명세서에서 사용된 용어 "마이크로포어(micropore)"는 질소 흡착 및 수은 기공측정(nitrogen adsorption and mercury porosimetry) 방법에 의해 측정되고 IUPAC에 의해 정의된 바와 같은, 2 nm 이하의 직경을 갖는 포어를 의미한다.
- [0013] 본 명세서에서 사용된 용어 "메소포어(mesopore)"는 질소 흡착 및 수은 기공측정 방법에 의해 측정되고 IUPAC에 의해 정의된 바와 같은, 2 nm 초과 및 50 nm 미만의 직경을 갖는 포어를 의미한다.
- [0014] 본 명세서에서 사용된 용어 "마크로포어(macropore)"는 질소 흡착 및 수은 기공측정 방법에 의해 측정되고 IUPAC에 의해 정의된 바와 같은, 50 nm 이상의 직경을 갖는 포어를 의미한다.
- [0015] 본 명세서에서 선행기술에 대한 참조는, 그 선행기술이 호주(Australia) 또는 그 외의 장소에서 일반적인 지식의 일부를 형성한다는 인정 또는 어느 형태의 암시가 아니며 그러한 것으로 간주되어서는 안 된다.
- [0016] 현재, 간질환을 갖는 환자에게 이용가능한 치료 또는 예방의 범위는 제한적이다. 다수의 환자에게 유일한 옵션은 이식이나, 아직 이 환자군의 수명을 연장하기 위해 이용가능한 효과적인 치료법 또는 예방법은 존재하지 않는다. 그러므로, 간질환을 앓는 개체의 상태를 개선시키는데 이용될 수 있는 치료 또는 예방 요법을 찾아야 할 필요성이 존재한다.
- [0017] 장-유래 내독소혈증(gut-derived endotoxaemia)은 만성 간질환 발병의 증추이고 세균 전이(bacterial translocation)의 결과로 발생한다. 내독소혈증은 조기 및 말기 간경변 발생에 연관되어 있고, 급만성 간부전(acute-on-chronic liver failure)의 발병에 핵심적인 역할을 수행하며, 다장기 기능부전(multiple organ failure) 및 높은 사망률과 연관되었다. 이상조절 염증 반응(dysregulated inflammatory response)이 이 효과를 매개하는 것으로 고려된다.
- [0018] 또한, 내독소혈증은 ALD 및 NAFLD와 같은 기타 간질환의 발병, 및 자발성 세균성 복막염(spontaneous bacterial peritonitis), 간신증후군(hepatorenal syndrome), 정맥류 출혈(variceal haemorrhage), 과혈류 순환(hyperdynamic circulation) 및 간성뇌증(hepatic encephalopathy)의 발병에 연관되어 있다. 다수의 증거는 내독소를 증가된 패혈증 비율(sepsis rate)과 임상적으로 관계된 면역 기능이상에 연관시킨다. 알코올성 간질환(alcoholic liver disease: ALD)의 발병은 장내 세균에 의한 에탄올 대사 및 아세트알데히드의 생성을 직접 연관짓는다. 아세트알데히드는 문맥 순환(portal circulation)으로의 세균 전이를 유발하는 정상적인 장 벽(gut barrier) 기능의 붕괴 및 간 염증 및 손상을 초래하는 전신성 내독소의 방출을 유발한다. 비-알코올성 지방간질환(non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD)은 세균 전이 및 관내 세균(intraluminal bacteria)에 의한 내인성 에탄올 생성과 관련되어 있다. 그러므로, 아세트알데히드는 이러한 맥락에서도 점막 손상에서 중요한 역할을 수행할 수 있다.
- [0019] 앞서 강조한 바와 같이, 세균 전이, 내독소혈증 및 연관된 면역/염증 반응은 ALD, NAFLD 및 간경변의 합병증의 진행에 연관되어 있다. 해부학적 및 기능적 장 벽 견고성은 세균 전이를 및 그로 인한 내독소혈증의 핵심 결정 인자이다. 세균-유래 독소, 독성 대사물질 및 국소 사이토카인의 결합은 이론상 점막 손상 및 내독소혈증을 감소시킬 것이다. 이는 간 손상을 감소시키고, 질환의 진행을 늦추고 호중구의 기능을 향상시키는 효과를 가질 것이다. 문맥성 내독소혈증(portal endotoxaemia)을 감소시키는데 빈번하게 이용되는 전략은 구강 항생제를 이용한 선택적 장관 오염제거(selective intestinal decontamination)이다. 이는 간성뇌증, 문맥성 고혈압(portal hypertension), 간신증후군 및 세균성 복막염을 포함한 간 기능이상과 연관된 합병증의 개선을 갖는 우수한 단

기 전략을 나타낸다. 그러나, 항생제 저항성 및 중복 감염(super-infection)의 증가를 입증하는 데이터는 그의 역할을 제한한다.

- [0020] 본 발명자는 조절된 다공성을 갖는 다공성 탄소 입자의 생물 분자를 흡착하는 능력 및 간질환을 치료 또는 예방 하는데 있어서 그의 적용을 조사함으로써, 종래의 항생제를 이용한 치료에 대한 대안적인 전략을 제공한다.
- [0021] 그러므로, 일 양태에서 본 발명은, 직경 2 내지 50 nm의 메소포어 및 직경 50 nm 이상의 작은 마크로포어를 포함하는, 간질환의 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자에 관한 것이다. 다른 구체예에서, 본 발명의 다공성 탄소 입자는 직경 2 nm 이하의 마이크로포어 및 직경 30 nm 내지 500 nm의 메소포어/작은 마크로포어를 포함하나, 실질적으로 2 nm를 초과하고 30 nm 미만인 직경의 메소포어를 포함하지 않고, 실질적으로 500 nm를 초과하는 직경의 큰 마크로포어를 포함하지 않는다.
- [0022] 본 발명자는, 메소 내지 마크로포러스(meso-to-macroporous) 범위, 또는 마이크로- 및 작은 마크로(micro- and small macro) 범위의 포어의 상대적으로 높은 비율을 제공하는 조절된 다공성을 갖는 그와 같은 비-흡수성(non absorbable) 다공성 탄소 입자가, 상기 논의된 병원성 매개자(pathogenic mediator)의 적합한 흡착제(adsorbant)이고, 아마도 톨-유사(toll-like) 수용체 리간드의 전이에서 감소를 통해, 손상을 주는 자유 라디칼을 생성하는 간의 쿠퍼세포(Hepatic Kupffer cell)의 기능을 조절할 수 있다는 것을 밝혀냈다. 다공성 탄소 입자는 비-흡수성이므로 장-벽 계면(gut-barrier interface)에서 국소적으로 그의 영향을 매개한다. 그러나 종래의 비-흡수성 항생제와 달리, 본 발명의 다공성 탄소 입자는 장 생태(gut ecology)를 유지하는데 중요한 세균의 성장에 해로운 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.
- [0023] 종래의 생성된 활성탄 (예를 들면, 입상활성탄)은 일반적으로, 직경 2 nm 미만의 포어를 갖고 (IUPAC 정의), 메소포어 (2-50 nm) 또는 마크로포어 (50 nm 초과) 범위의 포어 부피를 거의 또는 전혀 갖지 않는, 마이크로포러스이다.
- [0024] 본 발명에서 이용되는 다공성 탄소 입자는 총 포어 부피 중 20% 내지 90%는 2 nm 이하의 평균 직경을 갖는 포어 (마이크로포어)로 구성되고, 총 포어 부피의 나머지 중 75% 이상 (즉, 2 nm 초과)의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된 포어 부피)은 30 nm 내지 500 nm의 평균 직경을 갖는 포어 (메소포어/작은 마크로포어)로 구성될 수 있다.
- [0025] 따라서, 이 다공성 탄소 입자는, 총 포어 부피가 마이크로포어 내지 큰 메소포어/작은 마크로포어 범위에 분포되고, 30 nm 미만인 직경의 메소포어 또는 큰 마크로포어가 실질적으로 없는, 포어 크기의 이봉분포(bimodal distribution)를 가질 수 있다. 500 nm를 초과하는 평균 직경의 포어는 입자의 물리적 강도(physical strength)를 감소시키고 흡착에서의 개선을 거의 또는 전혀 제공하지 않을 것이므로, 큰 마크로포어의 존재는 바람직하게는 최소화된다.
- [0026] 일반적으로, 직경 30 nm 미만의 메소포어는 총 포어 부피의 20% 이하, 보다 바람직하게는 15% 이하, 보다 더 바람직하게는 10% 이하를 구성한다. 일반적으로, 큰 마크로포어는 총 포어 부피의 20% 이하, 보다 바람직하게는 15% 이하, 보다 더 바람직하게는 10% 이하를 구성한다. 일반적으로, 직경 30 nm 미만의 메소포어 및 큰 마크로포어는 총 포어 부피의 20% 이하, 바람직하게는 15% 이하, 보다 바람직하게는 10% 이하를 구성한다.
- [0027] 일반적으로, 총 포어 부피의 25% 내지 70%, 바람직하게는 35% 내지 60%, 보다 바람직하게는 45% 내지 55%는 2 nm 이하의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된다.
- [0028] 일반적으로, 총 포어 부피의 나머지 중 80% 이상, 바람직하게는 85% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상은 30 nm 내지 500 nm, 바람직하게는 30 nm 내지 300 nm, 보다 바람직하게는 50 내지 200 nm의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된다.
- [0029] 일반적으로, 질소 흡착에 의해 측정된 총 포어 부피는 0.5 내지 $2.5 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, 바람직하게는 1.0 내지 $2.0 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, 보다 바람직하게는 1.2 내지 $1.8 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ 이다. 일 구체예에서, 질소 흡착에 의해 측정된 총 포어 부피는 1.3 내지 $1.8 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ 이다. 일 구체예에서, 질소 흡착에 의해 측정된 총 포어 부피는 1.3 내지 $1.4 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ 이다.
- [0030] 일반적으로, 2 nm 이하의 평균 직경을 갖는 마이크로포어에 기인하는 포어 부피는 $0.2 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ 이상, 바람직하게는 0.2 내지 $0.5 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ 이상, 보다 바람직하게는 0.3 내지 $0.4 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ 이상이다.
- [0031] 일반적으로, 다공성 탄소 입자의 벌크 밀도(bulk density)는 0.10 g cm^{-3} 이상, 바람직하게는 0.15 g cm^{-3} 이상,

보다 바람직하게는 0.20 gcm^{-3} 이상이다. 보다 높은 벌크 밀도를 갖는 입자는 구강 투여에 요구되는 감소된 탄소의 전체 부피를 유발하여, 예를 들면, 환자의 순응에 있어서 유리하다. 일 구체예에서, 다공성 탄소 입자의 벌크 밀도는 0.10 gcm^{-3} 내지 0.30 gcm^{-3} , 바람직하게는 0.15 gcm^{-3} 내지 0.25 gcm^{-3} , 보다 바람직하게는 0.18 gcm^{-3} 내지 0.22 gcm^{-3} 이다.

- [0032] 대조적으로, 일 구체예에서, 다공성 탄소에서 총 포어 부피의 20% 이상은 2 내지 200 nm의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된다.
- [0033] 바람직하게는, 다공성 탄소 입자의 총 포어 부피 중 20% 이상은 20 내지 200 nm, 바람직하게는 30 내지 200 nm, 바람직하게는 30 내지 150 nm, 보다 바람직하게는 50 내지 120 nm, 또는 60 내지 100 nm의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된다. 총 포어 부피에 대한 이 크기의 포어의 기여(contribution)는 바람직하게는 25%를 초과하고, 보다 바람직하게는 30%를 초과한다. 적합하게는, 전술된 크기의 포어는 총 포어 부피의 25 내지 75%, 바람직하게는 30 내지 60%, 바람직하게는 30 내지 50%, 보다 바람직하게는 총 포어 부피의 30 내지 40%를 구성한다.
- [0034] 또한, 본 발명에서 이용되는 다공성 탄소 입자는 0.6 내지 2 nm의 평균 직경을 갖는 마이크로포어를 포함할 수 있다. 그와 같은 마이크로포어의 총 포어 부피에 대한 기여는 50% 이하, 예를 들면, 5 내지 30%일 수 있다.
- [0035] 또한, 다공성 탄소 입자는 200 nm를 초과하는, 예를 들면, 500 nm를 초과하는 직경을 갖는 보다 큰 매크로포어를 포함할 수 있다. 총 포어 부피에 대한 200 nm를 초과하는 직경을 갖는 그와 같은 매크로포어의 기여는 74% 이하, 예를 들면 25 내지 70%일 수 있다.
- [0036] 바람직하게는, 30 내지 150 nm의 평균 직경을 갖는 포어의 총 부피는 $0.2 \text{ 내지 } 2.0 \text{ cm}^3/\text{g}$, 바람직하게는 $0.5 \text{ 내지 } 1.5 \text{ cm}^3/\text{g}$ 이다.
- [0037] 추가적으로 입자가 마이크로포어를 포함할 경우, 0.6 내지 2 nm의 평균 직경을 갖는 마이크로포어의 총 부피는 바람직하게는 $0.01 \text{ 내지 } 1.5 \text{ cm}^3/\text{g}$ 이다.
- [0038] 추가적으로 입자가 더 큰 매크로포어를 포함할 경우, 200 nm를 초과하는 평균 직경을 갖는 매크로포어의 총 부피는 바람직하게는 $0.2 \text{ 내지 } 2.0 \text{ cm}^3/\text{g}$, 바람직하게는 $0.2 \text{ 내지 } 1.0 \text{ cm}^3/\text{g}$ 이다.
- [0039] 특히 바람직한 일 구체예에서, 본 발명에서 이용되는 다공성 탄소 입자는 하기 설정된 특성을 갖는다.
- [0040] 마이크로포어 포어 크기 0.5-2nm
- [0041] BET 표면적 700 내지 2000, 바람직하게는 $1000-1500 \text{ m}^2/\text{g}$
- [0042] 마이크로포어 포어 부피 $0.1 \text{ 내지 } 1.1 \text{ cm}^3/\text{g}$, 바람직하게는 $0.3 \text{ 내지 } 1.0 \text{ cm}^3/\text{g}$
- [0043] 메소/작은 매크로포어 크기 30-500 nm, 바람직하게는 50-300 nm
- [0044] 메소/작은 매크로포어 부피 $0.8 \text{ 내지 } 2.5 \text{ cm}^3/\text{g}$
- [0045] 총 포어 부피 $0.9 \text{ 내지 } 3.5 \text{ cm}^3/\text{g}$, 바람직하게는 $1.1 \text{ 내지 } 2.0 \text{ cm}^3/\text{g}$
- [0046] 마이크로포어의 비율 (%부피) 27% 내지 29%
- [0047] 일 구체예에서, 본 발명에 따라서 이용되는 다공성 탄소 입자는, 20 nm 내지 200 nm의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된, 총 포어 부피 중 20% 이상의 다공성 탄소 입자를 갖고, 총 포어 부피 중 20% 내지 90%는 2 nm 이하의 평균 직경을 갖는 포어로 구성되나, 총 포어 부피의 나머지 중 75% 미만은 30 nm 내지 500 nm의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된다.
- [0048] 일 구체예에서, 본 발명에서 이용되는 다공성 탄소 입자는, 2 nm 이하의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된 총 포어 부피 중 20% 내지 90%, 및 30 nm 내지 500 nm의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된 총 포어 부피의 나머지 중 75% 이상을 가지나, 다공성 탄소 입자의 총 포어 부피 중 80% 이상은 20 내지 200 nm의 평균 직경을 갖지 않는 포어로 구성된다.
- [0049] 탄소의 다공성은 수은 기공측정법 (예: PoreMaster® 수은 침투 기공측정기 (Quantachrome Instruments)와 같

은 자동 수은 침투 기공측정기를 이용) 및/또는 가스 수착(sorption) 분석법 (예: Autosorb 가스 수착 분석기 (Quantachrome Instruments)를 이용)을 이용하여 측정될 수 있다.

- [0050] 수은 기공측정법은 2 nm를 초과하는 포어, 특히 20 nm를 초과하는 포어를 측정하고, 가스 수착 분석법은 마이크로포어 및 메소포어를 측정하는데 이용되며 통상적으로 0.5 nm 내지 50 nm의 평균 직경을 갖는 포어에 대한 효율적인 다공성의 측정을 제공하므로, 특히 전술된 이봉 다공성(bimodal porosity)을 갖는 입자를 측정하기 위해 두 방법을 이용하는 것이 필요할 수 있다. 질소 기법에 의해 수득된 상기 50nm 결과는 수은 기법에 의해 수득된 결과와 일치하지 않을 수 있다. 50 nm를 초과하는 평균 직경의 포어에 대한 결과에서 불일치가 있는 경우, 수은에 의해 수득된 결과가 이용되어야 한다.
- [0051] 도 2는 수은 기공측정법에 의해 제공된, 본 발명에 따른 입자의 보다 큰, 작은 매크로포어에서 포어 부피의 측정을 나타낸다. 수은 기공측정법은 2 nm를 초과하는 포어를 측정하므로 도 2에서 마이크로포어는 보이지 않는다. 도 1은 TE7 탄소에 대한 <2nm 및 50-500nm 포어 범위의 질소 포어 부피의 발생(evolution)을 번 오프(burn off)의 함수로 나타낸다 (활성화의 정도).
- [0052] 활성화에 의한 수은 포어 부피의 변화는 도 4에 나타난다. 수은 포어 부피가 $\text{cm}^3 \text{gm}^{-1}$ 기반으로 보고될 경우, 활성화에 의한 포어 부피에서의 명백히 큰 증가가 존재한다. 그러나 이것은 주로 밀도가 활성화에 의해 감소한다는 것을 반영한다. 구조 변화의 우수한 반영인 부피에 기초하여, 작은 매크로포어 부피는 모든 활성화 수준에 대해 일정하게 유지된다. 즉, 마이크로포어 부피만이 활성화에 의해 증가한다.
- [0053] 수은 기공측정법에 의해 수득된 결과는 다공성 탄소 입자 간 빈 공간(void)에 해당하는 더 높은 포어 직경에서의 결과를 나타낼 수 있고, 탄소 입자 내 포어의 크기를 반영하지 않는다. 따라서, 빈 공간의 크기가 비드 크기의 ~20%인, 빈 공간에 기인하는 비드의 부피 중 ~35%와 동등한, 효과적인 매크로포어 부피가 존재할 것이다. 그러므로, 비드 크기의 15% 이상, 예를 들면, 비드 크기의 20% 이상의 수은 기공측정법 결과는, 다공성을 고려할 경우 무시될 수 있다. 예를 들면, 크기가 250-500 μm 인 탄소 입자는 약 50-100 μm 의 수은 데이터에서 반영된 입자 간 빈 공간 크기를 가질 수 있다.
- [0054] 일반적으로, 수은 기공측정법에 의해 결정된 중량 기반의 큰 메소포어/작은 매크로포어 부피는 0.60 $\text{cm}^3 \text{gm}^{-1}$ 이고, 바람직하게는 1.1 $\text{cm}^3 \text{gm}^{-1}$ 를 초과하며 보다 바람직하게는 1.5 $\text{cm}^3 \text{gm}^{-1}$ 를 초과한다.
- [0055] 마이크로포어를 측정하는데 이용되는 가스 수착 분석 기법은 일반적으로 질소 수착 기법이다.
- [0056] 탄소 내 마이크로포어는 활성화에 의해 증가될 수 있고 활성화에 의한 표면적과 포어 부피에서의 변화가 표 2에서 나타난다. 바람직하게는, 다공성 탄소 입자는 BET (Brunauer-Emmett-Teller) 방법에 의해 측정된 700 m^2/g 이상의 비표면적(specific surface area)을 갖는다. 비표면적은 900 m^2/g 를 초과하고, 일반적으로 1000 m^2/g 를 초과할 수 있다. 일 구체예에서, 비표면적은 1200 m^2/g 를 초과한다. 적합한 비표면적은 1000 내지 2500 m^2/g , 바람직하게는 1400 내지 2000 m^2/g 의 범위에 존재한다. 일 구체예에서, 비표면적은 700 m^2/g 내지 2000 m^2/g , 일반적으로 900 m^2/g 내지 1400 m^2/g , 바람직하게는 1000 m^2/g 내지 1200 m^2/g 이다. 다른 구체예에서, 비표면적은 1200 m^2/g 이하, 예를 들면, 700 내지 1200 m^2/g , 900 내지 1200 m^2/g 또는 1000 내지 1200 m^2/g 이다.
- [0057] 바람직하게는, 다공성 탄소 입자는 2 내지 2000 μm , 예를 들면, 50 내지 2000 μm , 200 내지 1600 μm , 또는 100 내지 1000 μm 의 평균 직경을 갖는다. 따라서, 적합한 입자는 예를 들면, 200 내지 600 μm , 바람직하게는 250 내지 500 μm 의 평균 직경을 가질 수 있다. 다른 적합한 입자는 1000 내지 2000 μm , 바람직하게는 1000 내지 1500 μm 의 평균 직경을 가질 수 있다. 그러나, 1000 μm 이하의 평균 직경을 갖는 입자가 바람직하다. 입자 크기는 레이저 회절을 이용하여 (예: 맬버른 측정기(Malvern instrument)를 이용) 측정될 수 있다.
- [0058] 바람직하게는, 다공성 탄소 입자는 구형 입자의 형태로 존재한다.
- [0059] 일 구체예에서, 다공성 탄소 입자는 생물 분자에 대한 그의 흡착 용량을 변화시키기 위하여 표면-개질된(surface-modified) 것일 수 있다.
- [0060] 다공성 탄소 입자는 미코팅(uncoated) 입자의 형태로 존재할 수 있다. 그와 같은 미코팅 다공성 탄소 입자는 입증된 생체적합성을 갖는다. 대안적으로, 입자는 그의 방출 및 흡착 특성을 조절하기 위하여 코팅될 수 있다. 예를 들면, 입자는 대장(large bowel)으로의 우세한 방출을 가능하게 할 필름(film)에 의해 코팅될 수 있다.

- [0061] 본 발명에 이용되는 다공성 탄소 입자는 적합한 방법에 의해 제조될 수 있다. 적합한 방법은 예를 들면, WO 02/12380에 기술되어 있다.
- [0062] 또한, 본 발명은 총 포어 부피 중 20% 이상이 2 내지 200 nm의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된 다공성 탄소 입자의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 간질환을 치료 또는 예방하는 방법, 및 다공성 탄소 입자는 바람직하게는 전술된 바와 같은 것인, 간질환의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에서 총 포어 부피 중 20% 이상이 2 내지 200 nm의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된 다공성 탄소 입자의 용도에 관한 것이다.
- [0064] **이봉 다공성을 갖는 페놀 수지 유래 구형 탄소 비드의 제조**
- [0065] 본 발명과 관련하여, 두 가지 타입의 마크로포어가 존재한다. 마크로포러스 비드에서 마크로포어는 비드 내에 위치하고 포어 형성제(pore-former)에 의해 형성된다. 그 크기는 일반적으로 30-500nm, 바람직하게는 50 - 300 nm이다.
- [0066] 높은 다공성은 에틸렌 글리콜과 조합된 우레아와 같은 첨가제(additive)의 사용을 통해 달성될 수도 있으나, 일반적으로, 유의한 비율의 포어 형성제, 예를 들면, 100 부(part)의 수지-형성(resin-forming) 성분에 대한 250 부의 에틸렌 글리콜 또는 기타 포어 형성제를 포함하는 전구물질 수지 제제(precursor resin formulation)가 이용된다.
- [0067] 그의 개시가 본 명세서에 참조에 의해 포함되는 US2008025907A1 (Tennison 등)은, 디올(예: 에틸렌 글리콜), 디올 에테르, 사이클릭 에스테르, 치환된 사이클릭 에스테르, 치환된 선형 아미드, 치환된 사이클릭 아미드, 아미노 알코올 및 물과 상기 어느 것과의 혼합물의 존재하에서, 페놀 화합물 또는 페놀축합 프리폴리머(phenol condensation prepolymer)를 포함하는 친핵성 성분을 포름알데히드, 파라포름알데히드, 푸르푸랄(furfural) 및 헥사메틸렌 테트라민으로부터 선택되는 하나 이상의 친전자성 가교제와 축합하여 수지를 형성하는 것에 의한 메소포러스 수지의 제조를 개시한다. 포어-형성제는 수지에 마크로다공성(macroporosity)을 부여하는데 효과적인 양으로 존재하고 (예를 들면, 총 수지 형성 성분, 즉, 친핵성 성분 플러스(plus) 친전자성 성분의 100 중량부(parts by weight)를 용해시키는데 이용되는 포어 형성제의 150 중량부 이상), 물에 의한 연속 세척(cascade washing) 또는 진공 건조에 의한 축합 후 다공성 수지로부터 제거된다.
- [0068] 결과로 얻어진 수지는 불활성 대기 중에서 600℃ 이상의 온도로 가열함으로써 탄화되어, 마이크로포어 및 메소포어 또는 마크로포어를 포함하는, 질소 흡착에 의해 추정되는 포어 구조인, 이봉 분포의 포어를 갖는 물질을 제공할 수 있다. 메소포어에 대한 포어 반경의 로그 대비 포어 부피의 차이 (dV/dlogR)에 대한 값은 적어도 20-500 Å 범위인 포어 크기의 일부 값(some value)에 있어서 0.2보다 크다. 메소포러스 탄소는 활성화 없이 250-700m²/g의 BET 표면적을 가질 수 있다. 그것은 이산화탄소, 증기 또는 그의 혼합물의 존재하에서 고온에서 가열함으로써, 예를 들면, 800℃를 초과하는 온도에서 이산화탄소 중에 가열함으로써 활성화될 수 있다. 그 후, 그것은 2000 m²/g 이하 및 보다 더 큰, 예를 들면, 1000-2000m²/g의 표면적을 가질 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "BET 표면적(BET surface area)"은 ASTM D1993-91에 따른 Brunauer, Emmett, 및 Teller (BET) 방법에 의해 결정되며, 또한 ASTM D6556-04를 참조한다. 본 발명의 목적상, 이산화탄소를 이용하는 것이 바람직하다.
- [0070] **페놀성 수지 - 친핵성 성분**
- [0071] 탄소질(carbonaceous) 물질을 제조하기 위한 수지는 US2008025907A1에 개시된 임의의 출발 물질로부터 제조될 수 있다. 친핵성 성분은 페놀, 비스페놀 A, 알킬 페놀, 예를 들면, 크레솔, 디페놀, 예를 들면, 레조르시놀(resorcinol) 및 하이드로퀴논 및 아미노페놀, 예를 들면, m-아미노-페놀을 포함할 수 있다.
- [0072] 친핵성 성분으로 페놀성 노볼락(novolac), 또는 이미 부분적으로 중합되므로 원하는 수지로의 중합을 더 낮은 발열성(exothermic)으로 만들고 그에 의해 보다 조절가능한 반응을 만드는 기타 유사한 올리고머성 출발 물질을 이용하는 것이 바람직하다. 바람직한 노볼락은 가교 전 300 내지 3000 범위의 평균 분자량(average molecular weights: AMW)을 갖는다 (약 3-30의 페놀의 측면에서 DP에 해당). 노볼락 수지가 이용될 경우, 이 수지는 100℃ 부근(region)의 용점을 갖는 고체일 수 있다. 2000 미만 및 바람직하게는 1500 미만의 MW를 갖는 노볼락 수지는, 탄화(carbonisation) 후 보다 적은 양의 포어 형성제를 이용하여 원하는 포어 크기 분포를 갖는 탄소를 생성하는 경향이 있는 가교된 수지를 형성한다. 노볼락은, 구조적 변화없이 반복적으로 가열되어 녹을 수 있고 냉각되어 굳어질 수 있다는 점에서 열에 대해 안정하다. 노볼락은 가교제의 첨가 및 가열에 의해 경화된다. 완

전히 경화된 수지는 불용해성(infusible) 및 불용성이다.

- [0073] 상용 노블락은 주로 페놀 및 포름알데히드를 이용하여 생산되는 반면, 여러 개질 시약(modifying reagent)이 다양한 상이한 산소 및 질소 작용기(functionality) 및 가교 부위를 도입하기 위해 프리-폴리머 형성 단계에서 이용될 수 있다. 이것은 하기를 포함하나 이에 한정되지 않는다:
- [0074] (a) 디히드릭 페놀, 예를 들면, 레조르시놀 및 하이드로퀴논. 이들은 페놀보다 반응성이 높고 프리-폴리머 생성 단계에서 부분적인(some) 가교를 유발할 수 있다. 또한, 가교 단계에서 이들 화합물을 도입하여 상이한 가교 통로(cross-linking path)를 제공하는 것이 가능하다. 이들은 또한 수지의 산소 작용기를 증가시킨다.
- [0075] (b) 중축합 반응에서 활성화 상태인 질소 함유 화합물, 예를 들면, 우레아, 방향족 (아닐린, m-아미노 페놀) 및 헤테로방향족 (멜라민) 아민. 이들은 초기 폴리머 및 최종 탄소로의 특정 타입의 질소 작용기의 도입을 가능하게 하고 수지 및 최종 탄소의 메소포러스 구조의 발달에 영향을 미친다. 하이드로퀴논 및 레조르시놀과 같이, 이용될 수 있는 모든 질소 함유 친핵성 개질 시약은 두 개 이상의 활성 부위를 갖고 축합 반응에서 페놀 또는 노블락보다 더 반응성이 높다. 이는, 그들이 먼저, 인 시투에서 2차 가교제를 형성하는 1차 가교제와 반응한다는 것을 의미한다.
- [0076] 친핵성 성분은 단독으로 또는, 노블락과 혼합될 수 있는 약한 유기산일 수 있고 및/또는 포어 형성제, 예를 들면, 살리실산, 옥살산 또는 프탈산에서 가용성일 수 있는 중합 촉매와 함께 제공될 수 있다. 이들이 본 발명에서 이용될 수 있는 반면, 보다 많은 친수성 부위의 농도를 최소화하기 위해 페놀 단독의 사용이 바람직하다.
- [0077] 포어 형성제에서 노블락의 농도는, 동일한 포어 형성제 중 가교제의 용액과 혼합될 경우 (노블락 + 가교제)에 대한 포어 형성제의 전체 중량비는 중량 기준 150:100 이상일 정도가 될 수 있다. 노블락:포어 형성제 및 가교제:포어 형성제의 실제 비율은 조작의 편의성에 따라, 예를 들면, WO 2008/043983 (Tennison)에 개시된 방법의 경우 비드 생산 플랜트의 공정 요구(operational requirement)에 의해 설정되고, 펌핑될 수 있게(pumpable) 유지되도록 노블락:포어 형성제 용액의 점성에 의해 및 가교제가 플랜트 전체에서 용액 중에 남도록 가교제:포어 형성제의 비율에 의해 조절된다.
- [0079] **페놀성 수지를 위한 가교제**
- [0080] 가교제는 통상적으로 친핵성 성분, 예를 들면 노블락의 100 중량부 당 5 내지 40 중량부(parts by weight: pbw)의 양으로 이용된다. 예를 들면, 가교제는 알데히드, 예를 들면, 포름알데히드 또는 푸르푸랄일 수 있고 헥사메틸렌테트라민 (헥사민), 또는 하이드로메틸화 멜라민(hydroxymethylated melamine)일 수 있다.
- [0081] 바람직하게는 헥사민은 가교제로 이용된다. 그것은 바람직하게는 100 pbw의 노블락 당 10 내지 25 pbw, 예를 들면, 약 15 내지 20 pbw의 헥사민의 비율로 노블락 수지를 가교시키는데 이용된다. 이것은 최대의 가교 정도를 갖는 고체 수지의 형성을 보장하고 후속의 포어 형성제의 제거 동안 마크로포어 구조의 안정성을 보장한다.
- [0083] **포어-형성제**
- [0084] 포어 형성제는 또한 용매로 작용한다. 따라서, 포어 형성제는 바람직하게는 수지 시스템의 성분을 용해시키기 충분한 양으로 이용되고, 수지 시스템의 총 성분에 대한 포어 형성제의 중량비가 바람직하게는 1.5:1 이상이다. 이 수준 미만에서 결과로 얻어진 수지는 필연적으로 마크로다공성을 갖지 않는다.
- [0085] 적합한 포어 형성제에 대한 세부 사항은 US2008025907A1 (Tennison)에서 제공된다. 포어 형성제는 예를 들면, 디올, 디올-에테르, 사이클릭 에스테르, 치환된 사이클릭 또는 선형 아미드 또는 아미노 알코올, 예를 들면, 에틸렌 글리콜, 1,4-부틸렌 글리콜, 디에틸렌 글리콜, 트리에틸렌 글리콜, γ-부티로락톤, 프로필렌 카보네이트, 디메틸포름아미드, N-메틸-2-피롤리딘 및 모노에탄올아민, 에틸렌 글리콜이 바람직할 수 있고, 또한, 경화 공정에서 이용되는 온도에서 끓거나 과도한 증기압을 갖지 않아야 하므로 선택은 용매의 열 특성에 의해서도 제한된다.
- [0086] 메소- 및 마크로포어 생성 기전은, 가교 반응 동안 발생하는 상 분리 과정에 기인하는 것으로 고려된다. 포어 형성제의 부재하에서, 프리-폴리머의 직쇄가 가교를 겪음에 따라 그의 분자량은 초기에 증가한다. 잔여의 저분자량 성분은 더 높은 분자량 영역에서 불용성이 되어, 더 낮은 분자량의 연속 상(continuous phase) 내에 가교된 높은 분자량 도메인으로의 상 분리를 유발한다. 또한, 성장하는 도메인의 외측으로의 가벼운(light) 성분의

축합은, 가교된 상이 필연적으로 도메인 사이에 포획된 잔여의 더 낮은 분자량의 프리-폴리머와 연속될 때까지 일어난다. 낮은 수준의 포어 형성제의 존재하에서, 포어 형성제는 가교된 수지 도메인, (예를 들면, 노볼락-헥사민-에틸렌 글리콜 반응 시스템의 경우, <120 부/100 부 Novolac)과 양립가능하고, 그 안에 남아있는 반면, 나머지는 도메인 사이의 부분적으로 가교된 폴리머와의 용액을 형성한다. 가교된 수지의 용량을 초과하는 더 높은 수준의 포어 형성제의 존재하에서, 포어 형성제는 낮은 MW의 폴리머 분획에 첨가되어, 메소다공성 및/마크로다공성을 가져오는 도메인 사이의 빈 공간 내 물질의 부피를 증가시킨다. 일반적으로, 포어 형성제 함량이 더 높을수록, 메소포어가 마크로포어까지 더 넓어질수록, 포어 부피는 더 커진다.

[0087] 이 상 분리 기전은 가교된 수지 구조 중 포어 발달을 조절하는 여러 방식을 제공한다. 이들은 포어 형성제의 화학 조성 및 농도를 포함한다; 가교성 친전자성 제제의 화학 조성 및 양, 개질 친핵성 제제의 존재, 화학적 성질 및 농도, 페놀성 친핵성 성분 (페놀, 노볼락)의 화학 조성, 용매 내의 물의 존재 및 존재할 경우 경화 촉매의 농도.

[0089] 비드 형태의 수지 전구물질 및 탄소의 생성

[0090] US2008025907A1에서, 분말 및 비드 형태의 수지의 생성이 개시된다. 비드 형태는 부분적으로 가교된 프리-폴리머의 용액을 분산제를 함유하는 미네랄 오일과 같은 고온의 액체로 붓고 혼합물을 교반함으로써 생성될 수 있다. 프리-폴리머 용액은 초기에는 액체이고, 그 후 경화가 진행됨에 따라 고체로 되는 비드로 형성된다. 평균 비드 입자의 크기는 교반기 타입 및 속도, 오일 온도 및 점도, 프리-폴리머 용액 점도 및 오일에 대한 용액의 부피비를 포함하는 여러 공정 변수에 의해 조절되고, 평균 크기는 5 내지 2000 μm 로 조정될 수 있다. 그 후 비드는 오일로부터 여과될 수 있다. 예비 실시예에서, 산업용 노볼락 수지는 상승된 온도에서 에틸렌 글리콜과 혼합되고, 헥사민과 혼합되고, 가열되어, 건조 오일을 함유하는 미네랄 오일로 부어지는 점성 용액을 제공하고, 그 후 혼합물을 더 가열하여 경화를 가져온다. 경화의 완료 후, 반응 혼합물은 냉각되고, 그 후 결과로 얻어진 다공성 수지는 여과되고, 고온의 물로 세척되어 포어 형성제를 제거한다. 경화된 비드는 상기된 바와 같이 포어 구조를 갖는 다공성 탄소 비드로 탄화되고, 상기된 바와 같이 활성화될 수 있다. 비드는 좁은 입자 크기 분포, 예를 들면, 10보다 우수한 및 바람직하게는 5보다 우수한 D90:D10로 생성될 수 있다.

[0091] US2010/0086469 A1 (Tennison)은 폴리머성 물질, 예를 들면, 다공성 구조를 갖는 페놀성 수지의 별개 고체 비드를 생산하는, 빠르게 축적되고 생산을 방해하는 수지의 응집 없이 산업용 규모로 수지 비드를 생산할 수 있는 방법을 기술하고 청구한다. 이 방법은 하기 단계를 포함한다: (a) 제1 극성 유기 액체, 예를 들면, 에틸렌 글리콜 중에 용해된 가교제로서 중합가능한 액체 전구물질 예를 들면, 노볼락 및 헥사민의 스트림(stream)을, 액체 전구물질이 실질적으로 또는 전혀 혼합되지 않는 제2 비극성 유기 액체인 액체 현탁 매질, 예를 들면 건조 오일을 함유하는 변압기 오일(transformer oil)의 스트림과 혼합하는 단계; (b) 중합가능한 액체 전구물질을 현탁 매질 중 액적(droplet)으로 분산시키기 위해 혼합된 스트림을 예를 들면, 관내 고정식(in-line static) 믹서를 이용하여 혼합하는 단계; (c) 액적이 현탁 매질의 층류(laminar flow) 중에 중합화되어 뭉쳐질 수 없는 별개의 고체 비드를 형성하도록 하는 단계; 및 (d) 현탁 매질로부터 비드를 회수하는 단계.

[0093] 분산 매질

[0094] 비드 생성에 있어서, 포어 형성제는, 주로 또는 완전히 혼합될 수 없는 조합을 형성하기 위해 비극성 유기 액체인 분산 매질과 조합으로 선택된 극성 유기 액체, 예를 들면 에틸렌 글리콜을 포함하고, 분산된 상을 형성하는 포어 형성제와 분산 매질 간 양립불가능성이 더 클수록, 포어 형성제가 분산 매질로 더 적게 추출된다. 포어 형성제는 바람직하게는 분산 매질보다 더 큰 밀도를 갖고, 그에 의해 용해된 수지-형성 성분을 함유하는 포어 형성제의 액적이 컬럼 내 분산 매질의 하향류(descending flow)보다 더 신속하게 컬럼을 통과해 내려갈 수 있도록 이용되는 것이 의도된다. 유기 화합물의 상이한 분류 중 양성자성 및 비양성자성 용매는 이 요구사항에 부합하고, 개별적으로 또는 혼합되어 포어 형성제로 이용될 수 있다. 반응성 성분 및 촉매를 용해시키는 것 이외에, 포어 형성제는 또한, 페놀성 수지의 경우 물 및/또는, 중합화가 진행됨에 따라 제거에 의해 형성되는 기타 소수의 축합 생성물 (예를 들면, 암모니아)과 양립가능하여야 하고, 포어 형성제는 바람직하게는 물과 잘 혼합될 수 있어서 세척에 의해 중합된 수지 비드로부터 즉시 제거될 수 있다.

[0095] 분산 매질은, 주위 압력에서 끓지 않고 분해 없이 경화가 수행될 수 있는 온도, 예를 들면 160°C까지 가열될 수 있고, 에틸렌 글리콜 및 에틸렌 글리콜 중 용해된 성분과 혼합될 수 없는 액체이다. 그것은 정제된 미네랄 오일

이고 석유의 증류의 부산물인 탄화수소-기반의 변압기 오일일 수 있다. 그것은 C15-C40 알칸 및 사이클로알칸으로 주로 구성되고 등급에 따라 0.8-0.9의 밀도를 가지며, 또한 등급에 따라 주위 압력에서 260-330℃의 끓는점을 가질 수 있다. 변압기 오일은 일반적인 경화 온도인 150℃에서 약 0.5 포아즈(poise)의 점도를 갖는다. 변압기 오일 또는 기타 분산 매질은 친핵성 전구물질과 가교제의 혼합된 스트림의 부피의 3 내지 10배, 예를 들면, 약 5배의 부피로 이용될 수 있다.

[0097] **분산제**

[0098] 액적 융합(droplet coalescence)을 지연시키기 위해 매질이 매질 내 분산될 반응 혼합물과 접촉하기 전 분산 매질에 용해되는 바람직한 분산제는, 건조 오일, 예를 들면, 데니쉬 오일(Danish oil)로 판매되거나, 부분적으로 산화시키는 자연 발생 전구 물질, 예를 들면, 텅오일(tung oil), 아마인 오일(linseed oil) 등에 의해 생성된다. 분산제는 반응이 진행됨에 따라 소비되어, 분산 매질이 재사용될 경우, 재사용 오일 스트림 중 분산제는 보충되어야 한다. 분산제는 분산 매질, 예를 들면, 변압기 오일에서 용액 중 스트림으로, 및 예를 들면, 데니쉬 오일이 이용될 경우, 저농도의 활성 성분을 함유하여 분산 매질 중 분산제의 최종 농도 0.2 - 1% v/v를 제공하는 5-10%v/v의 양으로 편리하게 공급된다. 산화된 식물성 오일의 경우 더 높은 분산제 농도가 이용될 것이다.

[0100] **수지 비드 및 입자상 물질(granular material)로부터 용매 제거**

[0101] 전술된 바와 같이 형성된 수지 비드 또는 입자는 우선, 포어 형성제가 제거되도록 처리된 후 탄화되고 활성화되어야 한다. 포어 형성제는 물 세척 또는 진공 건조에 의해 제거될 수 있다. 비드는 직접 처리될 수 있다. 물 세척이 이용될 경우, 바람직하게는 ~80℃의 고온수를 사용하는 2단계 이상의 과정을 이용한다. 이는 바람직하게는 상대적으로 낮은 수준의 포어 형성제를 함유하는 제2 단계로부터의 물이 제1 세척 단계에 재사용되는 연속 세척 과정을 이용하여 수행된다. 높은 수준의 포어 형성제를 함유하는 제1 단계로부터의 폐수(waste water)는 폐기될 수 있고 또는 포어 형성제는 증류에 의해 회수될 수 있다. 진공 건조는, 고정 트레이 시스템보다 교반되는 또는 이동식 베드를 이용하는 것이 바람직하나, 상용 진공 건조기를 이용하여 수행될 수 있다.

[0103] **수지 구조의 탄화 및 활성화**

[0104] US 2010/0098615A1 (Tennison, 그의 개시가 본 명세서에 참조에 의해 포함)에서, 비드 또는 입상 폴리머 물질 및 특히, 탄화 및 활성화시키는 온도를 유지하고, 회전할 때 물질을 진행시키는(progress) 하향 구배를 가지며, 이산화탄소 또는 증기의 역류에 의해 제공되는 산소가 없는 대기를 갖고, 킬른을 따라 난 간격에 환상 위어(annular weir)가 제공되어 물질의 진행을 조절하는, 외연(externally fired) 로터리 킬른(rotary kiln)에 물질을 공급하는 단계를 포함하는, US2010/0086469의 방법으로부터 얻어진 폴리머 물질의 고체 비드를 탄화 및 활성화시키는 방법이 제공된다.

[0105] 대안적으로, 수지 비드는 배치로(batch furnace)를 이용하여 보다 작은 규모로 탄화 및 활성화될 수 있다. 여기서, 탄화 및 활성화는, 탄화가 ~800℃의 이산화탄소에서 일어나고 활성화가 850 내지 950℃의 이산화탄소 또는 700 내지 850의 증기에서 일어나는, 별도의 단계로 수행될 수 있다.

[0106] 본 발명의 목적상, 이산화탄소를 활성화 매질로 이용하는 것이 바람직하며, 기타 매질을 이용하는 것도 가능하다.

[0108] **간질환의 치료에서 다공성 탄소 입자의 이용**

[0109] 전술된 다공성 탄소 입자는 간질환의 치료 또는 예방에 유용하다. 간부전은 간질환의 최종 단계이다. 간부전은 발병 신속도(rapidity of onset)에 따라 유형이 나누어진다. 급성 간부전은 신속하게 발달하나, 만성 간부전은 발달에 수 개월 또는 수년이 걸릴 수 있다. 정의상, 간부전은, 간이 심하게 병들고, 매우 저조하게 기능하여, 뇌병증(encephalopathy)이 분명할 경우 발생한다. 진행성 간질환은 간부전을 초래할 수 있다; 예시는 하기를 포함한다: 아세트아미노토펜 독성(acetaminotophen toxicity), 간경변, 바이러스성 간염, 및 전이성 간염. 기타 간질환의 징후, 예를 들면, 황달, 복수, 간성구취(fetor hepaticus), 및 응고 장애(failure of

coagulation)는, 간이 정상적인 생리학적 임무(physiological duty)를 수행하는데 어려움을 겪고 있으나, 정신 상태의 변화가 나타날 때까지는 간부전이라고 지칭되지 않는다.

[0110] 간질환을 앓는 환자에 대한 진단은 그 상태가 여러 원인을 가지므로 추정하기 어렵다.

[0111] 따라서, 본 발명은 간이 대상부전되거나(decompensated) 간성뇌증을 나타내는 개체의 치료 또는 예방에 관한 것일 수 있다. 개체의 간은 보상성 간경변(compensated state)일 수 있다. 개체는 만성 간질환을 가질 수 있다. 개체는 예를 들면, 알코올성 간염(alcoholic hepatitis)을 갖거나 갖지 않는 간경변을 가질 수 있다. 개체는 급성 간부전을 가질 수 있다. 개체는 간성뇌증을 가질 수 있다.

[0112] 급성 및 만성 간질환의 발병은 외인성 화합물 원인(xenobiotic cause)에 기인된 것일 수 있다. 예를 들면, 개체는 화학물질, 약물 또는 간손상을 유발하는 기타 제제에 노출되었을 수 있다. 개체는 간손상을 유발하는, 처방전 없이 살 수 있는(over-the-counter), 처방형(prescriptive) 또는 "기분전환성(recreational)" 약물에 대한 반응을 가질 수 있다. 개체는 RezulinTM (트로글리타존(troglitazone); Parke-Davis), SerzoneTM (네파조돈(nefazodone); Bristol-Myers Squibb) 또는 간손상을 유발하는 것으로 생각되는 기타 약물을 복용해왔을 수 있다. 개체는 특정 약물의 과다 복용을 가졌거나 간손상을 유발할 가능성이 있는 약물의 권고 용량을 초과했던 개체일 수 있다. 예를 들면, 개체는 파라세타몰(paracetamol)을 과다 복용했을 수 있다. 개체는 예를 들면, 그의 일터에서 간손상을 유발할 수 있는 화학물질에 노출되었을 수 있다. 예를 들면, 개체는 산업 또는 농업적 배경에서 그와 같은 화학물질에 노출되었을 수 있다. 개체는 간손상을 유발할 수 있는 화합물을 함유하는 식물을 소비했을 수 있고, 특히 이는 개체가 조식동물과 같은 동물인 경우일 수 있다. 예를 들면, 개체는 금방망이(ragwort)와 같은 피롤리지딘 알칼로이드를 함유하는 식물을 소비했을 수 있다. 개체는 간질환을 유발하는 것으로 생각되는 환경 독소에 노출되었을 수 있다.

[0113] 약물-관련 간 독성은 급성 간질환 (급성 간부전)을 갖는 경우 중 50%를 초과하는 경우를 포함한다. 아세트아미노펜-(파라세타몰 및 N-아세틸-p-아미노페놀로도 알려짐) 독성은 미국과 영국에서 급성 간부전의 가장 일반적인 원인이다. 치료상 또는 다소 과량으로 아세트아미노펜을 복용하는 장기간 중도 내지 중증 알코올 섭취자는, 중증 간손상 및 가능하게는 급성 간부전의 위험을 갖는다. 알코올 섭취는 아세트아미노펜의 독성 효과를 강화시킨다. 또한, 특이체질 약물 독성(idiosyncratic drug toxicity)이 급성 간부전의 원인이 된다. 특이체질 약물 독성은, 개체가 약물에 약학적으로 비정상적인 방식으로 반응하는 과민반응인 것으로 고려된다. 이 비정상 반응은 급성 간부전을 초래할 수 있다.

[0114] 급성 간부전 또는 만성 간질환은 병원체에 의한 감염에 의해 유발될 수 있다. 예를 들면, 간질환은 바이러스의 감염에 기인할 수 있다. 특히, 개체는 간염을 유발하는 바이러스에 의해, 감염될 수 있거나, 감염되었을 수 있다. 개체는 만성 바이러스성 간염을 가질 수 있다. 바이러스는, 예를 들면, B, C 또는 D형 간염 바이러스일 수 있다. 일부 경우, 및 특히 개체가 바이러스성 간염을 갖는 경우, 개체는 또한 HIV-I 또는 II에 의해 감염될 수 있다. 개체는 AIDS를 가질 수 있다. 개체가, 간질환을 유발하는 기타 유기체 및 특히 생애 주기의 특정 단계 동안 간에 존재하는 유기체에 의해 감염되었었거나, 또는 감염될 가능성이 있다. 예를 들면, 개체는 간질(liver fluke)을 갖거나, 가졌을 수 있다.

[0115] 개체는 만성 간질환의 위험을 유발하거나 증가시키는 유전성 질환을 가질 수 있다. 예를 들면, 개체는 간 혈액소침착증(hepatic hemochromatosis), 윌슨병(Wilson's disease) 또는 알파-1-항트립신 결핍(α -1-antitrypsin deficiency) 중 하나 이상을 가질 수 있다. 개체는 간 섬유증의 가능성을 증가시키는, 간에서 특정 종류의 구조상 또는 기능상 이상을 유발하는 유전성 질환을 가질 수 있다. 개체는 간을 손상시켜, 간 섬유증의 원인이 될 수 있는 자가면역 질환을 유전적으로 발달하게 만들 수 있다.

[0116] 만성 간질환은 알코올에 의해 유도된 것일 수 있다. 치료될 남성 또는 여성은 알코올 중독자(alcoholic)이거나, 알코올 중독자였을 수 있다. 그 또는 그녀는 주당 평균 50 유닛(unit) 이상의 알코올, 주당 60 유닛 이상의 알코올, 주당 75 유닛 이상의 알코올 및 주당 100 유닛 이상의 알코올까지도 소비하거나, 소비했을 수 있다. 그 또는 그녀는, 주당 평균 100 유닛 이하의 알코올, 주당 150 유닛 이하의 알코올 및 주당 200 유닛 이하의 알코올까지도 소비하거나, 소비했을 수 있다. 1 유닛의 알코올 측정은 나라별로 상이하다. 본 명세서에서, 1 유닛은 영국 기준에 따라 8 그램의 에탄올과 동일하다.

[0117] 그 또는 그녀는 5년 이상, 10년 이상, 15년 이상 또는 20년 이상 그와 같은 수준의 알코올을 소비해왔을 수 있다. 개체는 10년 이하, 20년 이하, 30년 이하 및 40년 이하까지도 그와 같은 수준의 알코올을 소비해왔을 수 있다. 알코올-유도성 간경변의 경우, 개체는, 예를 들면, 25세 이상, 35세 이상, 45세 이상 및 60세 이상일 수도

있다.

- [0118] 개체는 남성 또는 여성일 수 있다. 여성은 남성보다 알코올의 역효과(adverse effect)에 더 감수성을 가질 수 있다. 여성은 남성보다 짧은 시간 내에 및 보다 적은 양의 알코올로부터 알코올성 만성 간질환을 발달시킬 수 있다. 여성에서의 알코올성 간손상에 대한 증가된 감수성을 설명하는 단일 인자는 존재하지 않는 것으로 보이나, 알코올 대사에 대한 호르몬의 효과가 중요한 역할을 수행할 수 있다.
- [0119] 따라서, 개체는 알코올성 간염을 앓고 있을 수 있다. 알코올성 간염은 비정상적인 실험실 검정(laboratory test)이 질환의 유일한 표시인 경증 간염에서부터, 합병증, 예를 들면, 황달 (빌리루빈 보유에 의해 유발되는 황색 피부), 간성뇌증, 복수, 식도 정맥류(bleeding esophageal varice), 비정상적 혈액 응고 및 혼수상태를 갖는 중증 간 기능이상에 이를 수 있다.
- [0120] 개체는 간손상, 예를 들면, 원발 담즙성 간경변(primary biliary cirrhosis), 자가면역 만성 활성 간염(autoimmune chronic active hepatitis), 및/또는 주혈흡충증(schistosomiasis) (기생충 감염)을 유발하는 것으로 알려진 하나 이상의 기타 여러가지 상태를 가질 수 있다. 개체는 담관 폐색(bile duct blockage)을 갖거나 가졌을 수 있다. 일부의 경우, 간질환의 기저 원인은 알려지지 않았을 수 있다. 예를 들면, 개체는 잠복성 간경변(cryptogenic cirrhosis)을 갖는 것으로 진단되었을 수 있다. 따라서, 개체는 본 명세서에 열거된 상태를 갖는 것으로 의심될 수 있다.
- [0121] 급성 간부전 및 간성뇌증과 같은 간질환을 진단하는 방법은 당해 분야 및 특히 전문 분야의 의사 및 수의사에게 잘 알려져 있다. 바람직하게는, 개체는, 예를 들면, 전문 의료진 또는 수의사에 의해 간질환 및 간성뇌증을 갖는 것으로 진단되었을 것이다. 개체는 간질환과 연관된 하나 이상의 증상, 예를 들면, 황달, 복수, 피부 변화, 체액 저류(fluid retention), 네일 변화(nail change), 쉽게 타박상을입음(easy bruising), 코피, 식도정맥류 중 하나 이상을 나타낼 수 있고, 남성 개체에서 유방의 확대를 가질 수 있다. 개체는 탈진, 피로, 식욕 부진, 구역, 쇠약(weakness) 및/또는 체중 손실을 나타낼 수 있다. 또한, 개체는 간성뇌증과 연관된 하나 이상의 증상, 예를 들면, 혼돈(confusion), 방향 상실, 치매, 혼미, 혼수상태, 뇌부종, 다장기 기능부전 (호흡기 부전, 심혈관 부전 또는 신부전), 근육 긴장/경직, 발작 또는 언어 장애 중 하나 이상을 나타낼 수 있다. 치료될 개체는 간질환을 치료하는 기타 약물을 복용하거나 복용하지 않을 수 있다. 치료될 개체는 간성뇌증 발달의 위험을 가질 수 있다.
- [0122] 간질환은 초음파와 같은 기법을 포함한 신체 검사에 의해 확인되었거나 확인될 수 있다. 간 생검은 섬유증, 사멸 세포(necrotic cell), 세포 변성 및/또는 염증 및 간질환의 기타 특징의 증가(build up)를 찾기 위해 행해졌을 수 있다. 간기능은 이것이 개체의 면역반응을 무력화시키는지(compromised) 여부를 결정하기 위해 개체에서 평가되었을 수 있다. 간질환의 성질 및 기저 원인은 규명될 수 있다. 간질환의 원인 물질에 대한 노출 히스토리가 결정될 수 있다.
- [0123] 치료될 개체는 간성뇌증 삽화(episode), 예를 들면, 간이식을 기다리고 있는 환자, 수술 및/또는 문맥성 고혈압 환자의 위험을 가질 수 있다. 간성뇌증 삽화의 위험을 갖는 사람은 간성뇌증 삽화를 겪지 않았거나 확장 주기(약 12주 이상) 동안 간성뇌증 삽화를 겪지 않은 사람이지만, 간성뇌증 삽화의 위험을 생성하는 장애 또는 의학 상태를 갖는 사람이다. 간성뇌증 삽화는 간질환 또는 기능 이상을 갖는 환자에서 뇌 기능 이상의 존재에 의해 특징지어지는 임상적 상태이다. 주된 영향이 삶의 질의 감소인 최소의 것에서부터, 혼수상태 및 궁극적으로 사망을 초래하는 명시적인 것에 이르는 간성뇌증에서 넓은 스펙트럼의 정신 장애(mental disturbance)가 존재한다.
- [0124] 본 발명의 방법이 수행되는 개체는 간 이식 환자, 예를 들면, 간 이식 후 이식물에서 재관류 손상(reperfusion injury)을 앓는 개체, 또는 다-기관 기능부전 발달의 위험이 있거나 발달했던 환자일 수 있다.
- [0125] 바람직하게는, 간질환은 알코올성 간질환 (ALD), 비-알코올성 간질환 (예를 들면, 비-알코올성 지방간질환 (NAFLD)), 비-알코올성 지방간염 (NASH), 간경변 및/또는 간경변의 합병증 (예를 들면, 문맥성 고혈압, 복수, 신부전, 간성뇌증 또는 급만성 간부전)으로부터 선택된다. 본 발명은 만성 간질환, 예를 들면, ALD, NAFLD 또는 바이러스성 간염에서 염증 및 섬유증의 치료 또는 예방에 관한 것일 수 있다.
- [0126] 또한, 전술된 다공성 탄소 입자는 장-간 축의 조절에 유용할 수 있다. 따라서, 입자는 또한 장 전이(gut translocation)가 중요한 기타 상태, 예를 들면, 관상동맥 질환, 염증성 장질환, 과민성 대장 증후군 및 맹장염에서 용도를 발견할 수 있다. 또한, 고혈압 및 그로 인한 뇌졸중을 치료 또는 예방, 및 비만 또는 비만의 합병증을 치료 또는 예방하는데 유용할 수 있다.
- [0127] 따라서 본 발명은 또한, 본 명세서 기술된 다공성 탄소 입자의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 장-간 축을

조절하는 방법, 및 장-간 축의 조절을 위한 의약의 제조에 있어서 본 명세서에 기술된 다공성 탄소 입자의 용도에 관한 것이다. 또한, 본 발명은, 본 명세서에 기술된 다공성 탄소 입자의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 관상동맥 질환, 염증성 장질환, 과민성 대장 증후군, 맹장염, 고혈압, 뇌졸중, 비만 또는 비만의 합병증을 치료 또는 예방하는 방법, 및 관상동맥 질환, 염증성 장질환, 과민성 대장 증후군, 맹장염, 고혈압, 뇌졸중, 비만 또는 비만의 합병증의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에 있어서 본 명세서에 기술된 다공성 탄소 입자의 용도에 관한 것이다.

- [0128] 본 발명의 다공성 탄소 입자는 여러 투여 형태로 투여될 수 있다. 따라서, 다공성 탄소 입자는 경구, 예를 들면, 정제, 트로키(troches), 로젠지(lozenges), 수성 또는 유성 현탁액, 분산성(dispersible) 분말 또는 과립으로 투여될 수 있다. 또한, 다공성 탄소 입자는 피하, 정맥, 근육 내, 흉골 내(intrasternally), 경피, 또는 주입(infusion) 기법에 의해, 비경구 투여될 수 있다. 또한, 다공성 탄소 입자는 예를 들면, 좌약 형태로 직장 투여될 수 있다. 의사는 각 특정 환자에게 요구되는 투여 경로를 결정할 수 있을 것이다. 바람직하게는, 다공성 탄소 입자는 경구 또는 직장 투여된다. 경구 또는 직장 투여될 경우, 다공성 탄소 입자는 흡수되지 않으므로, 장에서 관내(intraluminally) 작용한다. 바람직하게는, 다공성 탄소 입자는 예를 들면, 자유-유동 형태 (적합하게는 봉지(sachet) 내에 제공되는) 또는 정제 형태로 경구 투여된다.
- [0129] 다른 구체예에서, 다공성 탄소 입자는, 혈액을 체외로 처리하는 방법에서 체내로 되돌려지기 전 탄소 입자를 함유하는 의료 장치를 통해, 간질환을 갖는 개체로부터의 혈액을 통과시킴으로써, 이용될 수 있다. 이 방법은 적합한 수단에 의해 달성될 수 있다. 이 방식으로 처리된 혈액은 치료 목적으로 개체에게 되돌려질 수 있거나, 다른 목적으로 이용될 수 있다. 예를 들면, 혈액은 상이한 개체의 수혈 전 이 방식으로 처리될 수 있다.
- [0130] 다공성 탄소 입자의 제형화는 작용제(exact agent)의 성질, 약학적 용도 또는 수의학적 용도를 의도하는지 여부 등과 같은 인자에 따라 다를 것이다. 간질환을 치료하는데 이용되는 제제는 동시, 별개 또는 순차적 사용을 위해 제제화될 수 있다.
- [0131] 다공성 탄소 입자는 일반적으로 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제와 함께 본 발명에서의 투여를 위해 제제화된다. 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제는, 예를 들면, 등장액일 수 있다. 예를 들면, 고체 경구 제형은, 활성 화합물과 함께, 희석제, 예를 들면, 락토오스, 텍스트로스, 사카로스, 셀룰로스, 옥수수 전분 또는 감자 전분; 윤활제, 예를 들면, 실리카, 탈크, 스테아르산, 마그네슘 또는 칼슘 스테아레이트, 및/또는 폴리에틸렌 글리콜; 결합제; 예를 들면, 전분, 아라비아 고무(gum arabic), 젤라틴, 메틸셀룰로스, 카르복시메틸셀룰로스 또는 폴리비닐 피롤리돈; 비응집제(disaggregating agent), 예를 들면, 녹말, 알긴산, 알기네이트 또는 소듐 전분 글리콜레이트; 포화제(effervescing mixture); 염료(dyestuff); 감미료; 습윤제, 예를 들면, 레시틴, 폴리소르베이트, 라우릴설페이트; 및 일반적으로, 약학적 제형에 사용되는 무독성 및 약학적으로 불활성인 물질을 포함할 수 있다. 그와 같은 약학적 제제는 알려진 방식으로, 예를 들면, 혼합, 과립화, 정제화, 당 코팅(sugar-coating), 또는 필름-코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0132] 경구 투여를 위한 액상 분산제는 시럽, 에멀전 또는 현탁액일 수 있다. 시럽은 담체로, 예를 들면, 사카로스 또는 글리세린 및/또는 만니톨 및/또는 소르비톨을 갖는 사카로스를 포함할 수 있다.
- [0133] 현탁액 및 에멀전은 담체로, 예를 들면, 천연 검(gum), 아가, 소듐 알기네이트, 펙틴, 메틸셀룰로스, 카르복시메틸셀룰로스, 또는 폴리비닐 알코올을 포함할 수 있다. 근육주사를 위한 현탁액 또는 용액은, 활성 화합물과 함께, 약제학적으로 허용가능한 담체, 예를 들면, 멸균수, 올리브유, 에틸 올레산염, 글리콜, 예를 들면, 프로필렌 글리콜, 및 바람직한 경우, 적합한 양의 리도카인 하이드로클로리드를 포함할 수 있다.
- [0134] 경구 투여를 위한 제제는 조절된 방출 제형으로 제제화될 수 있고, 예를 들면, 대장(large bowel) 내에서 조절된 방출을 위해 제제화될 수 있다.
- [0135] 정맥 투여 또는 투입을 위한 용액은 담체로, 예를 들면, 멸균수를 포함할 수 있거나, 바람직하게는 멸균된, 수성, 등장염 용액의 형태로 존재할 수 있다.
- [0136] 다공성 탄소 입자의 투여량은 여러 파라미터에 따라, 특히 사용되는 물질에 따라; 치료될 환자의 연령, 체중 및 상태; 투여 경로; 및 요구되는 치료법에 따라 결정될 수 있다.
- [0137] 또한, 의사는 특정 환자에게 요구되는 투여 경로 및 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 일반적인 일일 투여량은, 치료될 개체의 연령, 체중 및 상태, 퇴행의 유형 및 중증도 및 투여 빈도 및 경로에 따라, 체중 kg 당 약 0.1 내지 2 g이다. 일일 투여량 수준은, 예를 들면, 0.5 내지 15 g, 바람직하게는 1 내지 10 g일 수 있거나, 적절한

경우 보다 높은 일일 투여량 예를 들면, 0 내지 100 g, 바람직하게는 20 내지 80 g이 이용될 수 있다.

[0138] 본 명세서에서 언급된 모든 문헌 및 특허 출원은 본 발명이 속하는 분야의 통상의 기술자의 수준을 나타낸다.

[0139] 모든 문헌 및 특허 출원은, 각 개별 문헌 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 참조에 의해 포함되었던 것과 같은 동일한 정도로 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0140] 진술된 발명이 이해의 목적을 위한 설명 및 예시로서 다소 상세하게 기술되었기는 하나, 첨부된 청구항의 범위 내에서 특정한 변화 및 변형이 실시될 수 있다는 것은 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0141] 하기 예시는 본 발명을 설명한다:

[0143] **본 발명의 특정 양태**

[0144] 본 발명의 특정 양태는 하기에 개시된다.

[0145] 1. 총 포어 부피 중 20% 이상이 2 내지 200 nm의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된, 간질환의 치료 또는 예방용 다공성 탄소 입자.

[0146] 2. 총 포어 부피 중 20% 이상이 30 내지 150 nm의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된, 양태 1에 따른 다공성 탄소 입자.

[0147] 3. 총 포어 부피 중 20% 이상이 50 내지 120 nm의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된, 양태 1 또는 2에 따른 다공성 탄소 입자.

[0148] 4. 상기 포어가 총 포어 부피 중 25% 이상을 구성하는, 선행하는 양태 중 어느 하나에 따른 다공성 탄소 입자.

[0149] 5. 상기 포어가 총 포어 부피 중 30 내지 60%를 구성하는, 선행하는 양태 중 어느 하나에 따른 다공성 탄소 입자.

[0150] 6. 0.6 내지 2 nm의 평균 직경을 갖는 마이크로포어를 더 포함하는, 선행하는 양태 중 어느 하나에 따른 다공성 탄소 입자.

[0151] 7. 마이크로포어가 총 포어 부피 중 5 내지 30%를 구성하는, 양태 6에 따른 다공성 탄소 입자.

[0152] 8. 200 nm를 초과하는 직경을 갖는 포어를 더 포함하는, 선행하는 양태 중 어느 하나에 따른 다공성 탄소 입자.

[0153] 9. 200 nm를 초과하는 평균 직경을 갖는 포어가 총 포어 부피 중 25 내지 70%를 구성하는, 양태 8에 따른 다공성 탄소 입자.

[0154] 10. 30 내지 150 nm의 평균 직경을 갖는 포어의 총 부피가 0.2 내지 2.0 cm³/g인, 선행하는 양태 중 어느 하나에 따른 다공성 탄소 입자.

[0155] 11. 0.6 내지 2 nm의 평균 직경을 갖는 마이크로포어의 총 부피가 0.01 내지 1.5 cm³/g인, 선행하는 양태 중 어느 하나에 따른 다공성 탄소 입자.

[0156] 12. 200 nm를 초과하는 평균 직경을 갖는 마크로포어의 총 부피가 0.2 내지 1.0 cm³/g인, 양태 8 내지 11 중 어느 하나에 따른 다공성 탄소 입자.

[0157] 13. BET (Brunauer-Emmett-Teller) 방법에 의해 측정된 총 비표면적은 700 m²/g을 초과하는, 선행하는 양태 중 어느 하나에 따른 다공성 탄소 입자.

[0158] 14. 총 비표면적은 1000 m²/g을 초과하는, 양태 13에 따른 다공성 탄소 입자.

[0159] 15. 총 비표면적은 1400 내지 2000 m²/g을 초과하는, 양태 14에 따른 다공성 탄소 입자.

[0160] 16. 2 내지 2000 μm의 평균 직경을 갖는, 선행하는 양태 중 어느 하나에 따른 다공성 탄소 입자.

[0161] 17. 구형 입자의 형태로 존재하는, 선행하는 양태 중 어느 하나에 따른 다공성 탄소 입자.

[0162] 18. 경구 또는 직장(rectally) 투여되는, 선행하는 양태 중 어느 하나에 따른 다공성 탄소 입자.

- [0163] 19. 자유-유동 형태(free-flowing form) 또는 정제 형태로 경구 투여되는, 양태 18에 따른 다공성 탄소 입자.
- [0164] 20. 간질환은 알코올성 간질환(alcoholic liver disease: ALD), 비-알코올성 간질환, 비-알코올성 지방간(non-alcoholic steatohepatitis: NASH), 간경변, 및/또는 간경변의 합병증으로부터 선택되는 것인 선행하는 양태 중 어느 하나에 따른 다공성 탄소 입자.
- [0165] 21. 비-알코올성 간질환은 비-알코올성 지방간질환(non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD)인 것인 양태 20에 따른 다공성 탄소 입자.
- [0166] 22. ALD, NAFLD 또는 바이러스성 간염과 같은 만성 간질환의 염증 및 섬유증의 치료 또는 예방용인 것인 양태 1 내지 19 중 어느 하나에 따른 다공성 탄소 입자.
- [0167] 23. 간경변의 합병증은 문맥성 고혈압(portal hypertension), 복수(ascites), 신부전, 간성뇌증, 및 급만성 간부전(acute-on-chronic liver failure)으로부터 선택되는 것인 양태 20에 따른 다공성 탄소 입자.
- [0168] 24. 총 포어 부피 중 20% 이상이 2 내지 200 nm의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된 다공성 탄소 입자의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 간질환을 치료 또는 예방하는 방법.
- [0169] 25. 간질환의 치료 또는 예방을 위한 의학의 제조에 있어서 총 포어 부피 중 20% 이상이 2 내지 200 nm의 평균 직경을 갖는 포어로 구성된 다공성 탄소 입자의 용도.
- [0170] 26. 장-간 축(gut-liver axis)의 조절(modulation)에 이용하기 위한, 양태 1 내지 17 중 어느 하나에서 정의된 다공성 탄소 입자.
- [0171] 27. 관상동맥 질환, 염증성 장질환, 과민성 대장 증후군, 맹낭염(pouchitis), 고혈압, 뇌졸중, 비만 또는 비만의 합병증의 치료 또는 예방에 이용하기 위한, 양태 26에 따른 다공성 탄소 입자.

도면의 간단한 설명

- [0172] 도 1: 불활성화 내지 29 및 47%의 번 오프(burn off)로 활성화된 TE9 탄소에 대해 질소 흡착에 의해 측정되고 BJH 방법을 이용하여 결정된 폐놀성 수지 유래 탄소의 포어 분포. 활성화는 주로 마이크로포어 내 포어를 증가시킨다 (<2nm 직경). 작은 매크로포어 (50-500nm)는 2-50nm 범위(메소포어) 내 포어의 도입 없이 크게 변화하지 않는다.
- 도 2: 수는 기공측정기에 의해 측정된, 본 발명의 다공성 탄소 입자의 대표적인 포어 크기 분포 (A: TE7 시험 탄소; B: TE8 시험 탄소). 30,000을 초과하는 피크는 탄소 입자 간 빈공간에 기인한 것이고 다공성에 기인한 것이 아니다.
- 도 3: 약 50% 번 오프까지(burn off along) 활성화되는 탄소에 있어서 TE3으로부터 TE7으로의 포어 형성체 농도의 증가에 의한 매크로포어 부피에서의 증가 (50-500nm). 메소포어 범위 (2-50nm) 내 포어의 유의한 도입 또는 마이크로포어 도메인 내 포어에서 유의한 변화 없음.
- 도 4: A 수는 기공측정기에 의해 결정된 포어 구조에 대한 활성화 정도의 영향, cm^3/gm 단위에서 포어 부피의 발달(evolution) 및 활성화에 의해 유발된 벌크 밀도에서의 감소; B 수는 기공측정기에 의해 결정된 포어 구조에 대한 활성화 정도의 영향, 활성화 정도의 함수로서 cm^3/cm^3 의 수는 포어 부피에서의 변화
- 도 5: A. 시간 경과에 따른 아세트알데히드 제거 (500 μM (22 mg/L) Ac 스파이크(spike), n=3, 평균 +/-SEM, 실온, DIH 유도체화 시약, HPLC ELS 검출 방법); B. 시간 경과에 따른 시험 탄소에 의한 % 아세트알데히드 (AT) 흡착 (7.2 mM 스파이크, 0.1g/ml) (n=3, 평균 +/-SEM).
- 도 6: 시간 경과에 따른, E coli와의 직접 접촉 후 발광 신호를 평가하는 BacTiter-Glo 미생물 세포 생존능 분석을 이용하여 측정된 박테리아 성장에 대한 TE8 시험 탄소의 효과 (점종물은 3.9×10^9 박테리아 ml^{-1}) (평균 +/- sem, n=3).
- 도 7: 시간 경과에 따른, S. aureus와의 직접 접촉 후 발광 신호를 평가하는 BacTiter-Glo 미생물 세포 생존능 분석을 이용하여 측정된 박테리아 성장에 대한 TE7 시험 탄소의 효과 (점종물은 7.5×10^7 박테리아 ml^{-1}) (평균 +/- sem, n=3). 데이터는 탄소가 이들 박테리아를 체외에서(ex-vivo) 살해하지 않는다는 것을 암시한다.
- 도 8: 시간에 따른 E coli의 성장 특성에 대한 TE7 시험 탄소 삼출액의 효과를 Biscreen 혼탁도 분석기

(turbidometric analyser)를 이용하여 증가하는 혼탁도에 의해 (540nm) 측정하였다 (평균, n=4). 데이터는 탄소가 이들 박테리아를 체외에서 살해하지 않는다는 것을 암시한다.

도 9: 시간에 따른 *B subtilis*의 성장 특성에 대한 TE7 시험 탄소 삼출액(leachate)의 효과를 Biscreen 혼탁도 분석기를 이용하여 증가하는 혼탁도에 의해 (540nm) 측정하였다 (평균, n=4). 데이터는 탄소가 이들 박테리아를 체외에서 살해하지 않는다는 것을 암시한다.

도 10: A. 탄소가 없는 대조군에 비해 시간 경과에 따른 시험 탄소에 의한 내독소의 제거 (n=3, 평균 +/- SEM); B. 탄소가 없는 대조군에 비해 시간 경과에 따른 시험 탄소에 의한 내독소의 제거; 더 높은 내독소 스파이크 (0.1g, SIF에서 200 EU/ml 스파이크) (n=3).

도 11: 평형 농도에 대한, 탄소 그램 당 흡착된 탄소의 양 (μg)을 보여주는 흡착 등온선(adsorption isotherm)으로 표현된, SIF로부터 TNF에 대한 TE8 시험 탄소의 제거 용량 (평균, n=4).

도 12: 간 생화학 - ALT: 미처리 군에 비해 탄소 처리된 BDL 및 BDL+LPS 군에서 알려진 트랜스아미나제 (ALT)에서의 유의한 감소가 관찰되었다. 탄소 처리는 BDL+LPS 랫트에서 99 U/ml로부터 62 U/ml까지 ($p=0.0152$) 및 BDL 랫트에서 71U/ml로부터 52U/ml까지 ($p=0.0422$)의 ALT에서의 감소와 연관되어 있었다 (Sham: 모의 수술(Sham operated), BDL: 담관 결찰(bile-duct ligation) [4주후 연구], LPS: 복강 내 리폴리사카라이드 (lipolysaccharid) 투여된 동물; BDL 탄소는 탄소 처리군을 지칭한다).

도 13: 동맥(arterial) TNF α . TNF 알파는 탄소 처리된 BDL 동물에서 유의하게 감소한다.

도 14: 문맥압(portal pressure): 탄소 처리 후 BDL+LPS (미처리 평균 18.05mmHg, 탄소 처리 10.17mmHg, $p=0.0007$) 및 BDL (미처리 평균 12.57mmHg, 탄소 처리 11.02mmHg, $p=0.0043$) 군에서 문맥압의 유의한 감소가 관찰되었다 (Sham: 모의 수술, BDL: 담관 결찰 [4주후 연구], LPS: 복강 내 리폴리사카라이드 투여된 동물; BDL 탄소는 탄소 처리군을 지칭한다).

도 15: 체중. 미처리 군에 비하여 탄소에 의해 처리된 BDL 동물에서 건조 최종 체중에서의 유의한 증가가 관찰되었다 ($p=0.0271$). 데이터는 탄소의 투여가 간경변과 연관된 악액질을 감소시킬 수 있다는 것을 암시한다. (Sham: 모의 수술, BDL: 담관 결찰 [4주후 연구], BDL 탄소는 탄소 처리군을 지칭한다).

도 16: 쿠퍼 세포 (CD163+) 집단. 탄소에 의한 처리는 미처리 군에 비하여 탄소에 의해 처리된 BDL 동물에서 활성화된 쿠퍼 세포 집단의 감소를 유발하였다. 데이터는 BDL 동물에서 보여진 감소된 간 손상의 가능한 기전을 제공한다 (Sham: 모의 수술, BDL: 담관 결찰 [4주후 연구], LPS: 복강 내 리폴리사카라이드 투여된 동물; BDL 탄소는 탄소 처리군을 지칭한다).

도 17: 활성화된 대식세포 (CD63+) 집단. 탄소에 의한 처리는 미처리 군에 비하여 탄소에 의해 처리된 BDL 동물에서 활성화된 쿠퍼 세포 집단의 감소를 유발하였다. 데이터는 BDL 동물에서 보여진 감소된 간 손상의 가능한 기전을 제공한다 (Sham: 모의 수술, BDL: 담관 결찰 [4주후 연구], LPS: 복강 내 리폴리사카라이드 투여된 동물; BDL 탄소는 탄소 처리군을 지칭한다).

도 18: 전체 간 ROS 활성. 탄소에 의한 처리는 미처리 군에 비하여 탄소에 의해 처리된 BDL 동물에서 간의 산화 스트레스의 감소를 유발하였다. 데이터는 BDL 동물에서 보여진 감소된 간 손상의 가능한 기전을 제공한다 (Sham: 모의 수술, BDL: 담관 결찰 [4주후 연구], BDL 탄소는 탄소 처리군을 지칭한다).

도 19: 쿠퍼 세포 ROS 활성. 탄소에 의한 처리는 미처리 군에 비하여 탄소에 의해 처리된 BDL 동물에서 활성산소종의 쿠퍼 세포 생성의 조절을 통한 간의 산화 스트레스에서의 감소를 유발하였다. 데이터는 BDL 동물에서 보여진 감소된 간 손상의 가능한 기전을 제공한다 (Sham: 모의 수술, BDL: 담관 결찰 [4주후 연구], BDL 탄소는 탄소 처리군을 지칭한다).

도 20: 쿠퍼 세포 LPS ROS 활성. 탄소에 의한 처리는 미처리 군에 비하여 탄소에 의해 처리된 BDL 동물에서 활성산소종의 내독소 유도된 쿠퍼 세포 발생의 조절에서의 감소를 유발하였다. 데이터는 BDL 동물에서 보여진 감소된 간 손상의 가능한 기전을 제공한다 (Sham: 모의 수술, BDL: 담관 결찰 [4주후 연구], LPS: 복강 내 리폴리사카라이드 투여된 동물; BDL 탄소는 탄소 처리군을 지칭한다).

도 21: 장 투과성. 탄소에 의해 처리된 BDL 동물에서 미처리군에 비해 장 투과성이 정상화되었다(normalized). 데이터는 탄소 처리 군이 BDL 동물에서 관찰되었던 증가된 투과성을 정상화했다는 것을 입증한다 (Sham: 모의 수술, BDL: 담관 결찰 [4주후 연구], BDL 탄소는 탄소 처리군을 지칭한다).

도 22: 박테리아 전이의 마커 (문정맥 내독소). 탄소에 의한 처리는 내독소혈증을 현저하게 감소시키고, 장 투과성 및 박테리아 전이를 변화시켰다.

도 23: 원위 기관 효과 (간성뇌증). 탄소에 의한 처리는 뇌수 및 혈청 암모니아 수준에서의 감소를 유발하였다.

도 24: 박테리아 전이의 마커 (박테리아의 PCR 양성도). 탄소에 의한 처리는 박테리아 전이의 현저한 감소를 유발하였다.

도 25: 문정맥 사이토카인. 탄소 치료에 의한 문정맥 IL-4 및 IL-10에서의 유의한 감소는 관찰되지 않았다.

도 26: 결장의 조직학. 회장, 공장 및 결장의 조직학은 탄소에 의한 처리 후 영향받지 않은 채 유지되어, 이 처리가 장점막에 대해 안전했다는 것을 나타낸다. (Sham: 모의 수술, BDL: 담관 결찰 [4주후 연구], BDL 탄소는 탄소 처리군을 지칭한다).

도 27: 혈청 크레아티닌. 신장 기능을 나타내는 혈청 크레아티닌의 증가는 LPS의 투여 후 BDL 동물에서 악화되고, 이는 탄소에 의해 처리된 BDL 동물에서 방지되어, 그것이 간경변의 급성 신장 손상을 감소시킨다는 것을 암시한다. (Sham: 모의 수술, BDL: 담관 결찰 [4주후 연구], LPS: 복강 내 리폴리사카라이드 투여된 동물; BDL 탄소는 탄소 처리군을 지칭한다).

도 28: 뇌수 (%). LPS에 의해 처리된 BDL 동물에서, 탄소에 의해 처리된 동물에서 방지되었던 뇌수가 증가하여, BDL 동물의 처리는 간경변의 뇌 합병증 및 그로 인해 간성뇌증을 감소시킨다는 것을 암시한다. (Sham: 모의 수술, BDL: 담관 결찰 [4주후 연구], LPS: 복강 내 리폴리사카라이드 투여된 동물; BDL 탄소는 탄소 처리군을 지칭한다).

도 29: 대변에서 박테로이드/총 박테리아 비율. 데이터는, 박테로이드 종이 탄소 처리된 BDL 동물에서 정상상태를 향해 감소된 BDL 동물의 대변에서 증가하나, 박테리아의 총 수는 동일하게 유지된다는 것을 암시한다 (Sham: 모의 수술, BDL: 담관 결찰 [4주후 연구], BDL 탄소는 탄소 처리군을 지칭한다).

도 30: 대변에서 피르미쿠트(firmicute)/총 박테리아 비율. 데이터는, 피르미쿠트 종이 탄소 처리된 BDL 동물에서 정상상태를 향해 증가된 BDL 동물의 대변에서 감소하나, 박테리아의 총 수는 동일하게 유지된다는 것을 암시한다 (Sham: 모의 수술, BDL: 담관 결찰 [4주후 연구], BDL 탄소는 탄소 처리군을 지칭한다).

도 31: 대변에서 피르미쿠트/박테리오테스(Bacterioidetes) 비율. 데이터는, 박테로이드 종에 대한 피르미쿠트의 비율이 탄소 처리된 BDL 동물에서 정상상태를 향해 증가된 BDL 동물의 대변에서 감소된다는 것을 암시한다. (Sham: 모의 수술, BDL: 담관 결찰 [4주후 연구], BDL 탄소는 탄소 처리군을 지칭한다).

도 32: 체중. 비만인 생쥐는 탄소에 의한 처리에 의해 렙틴 결핍 Ob/Ob 생쥐에서의 정상상태를 향해 체중이 감소하였다. 데이터는 탄소가 비만의 유용한 치료일 수 있다는 것을 암시한다. (Ob-: ob 유전자에 대한 이형접합체; Ob-/Ob-: Ob/Ob 유전자에 대한 동형접합체; +C: 4주 동안 탄소에 의해 처리된 군).

도 33: ALT. 비만인 (Ob/Ob) 생쥐의 탄소에 의한 처리는 간손상에서의 감소를 유발하여, 탄소가 비-알코올성 지방간 질환에 대한 치료라 될 수 있다는 것을 암시한다 (Ob-: ob 유전자에 대한 이형접합체; Ob-/Ob-: Ob/Ob 유전자에 대한 동형접합체; +C: 4주 동안 탄소에 의해 처리된 군).

도 34: 간 조직학. 비만인 생쥐의 탄소에 의한 처리는 간의 지방 축적 및 염증성 세포 침윤에서의 감소를 유발한다. (Ob-: ob 유전자에 대한 이형접합체; Ob-/Ob-: Ob/Ob 유전자에 대한 동형접합체; +C: 4주 동안 탄소에 의해 처리된 군).

도 35: 쿠퍼 세포 집단 (F4/80+/CD68-/CD11b+): 비만인 생쥐의 탄소에 의한 처리는 쿠퍼 세포의 활성화에서의 감소를 유발한다. (Ob-: ob 유전자에 대한 이형접합체; Ob-/Ob-: Ob/Ob 유전자에 대한 동형접합체; +C: 4주 동안 탄소에 의해 처리된 군).

도 36: 쿠퍼 세포 집단 (F4/80+). 비만인 생쥐의 탄소에 의한 처리는 쿠퍼 세포의 활성화에서의 감소를 유발한다. 이는, 간 손상이 탄소에 의해 처리된 Ob/Ob 생쥐에서 감소되는 가능한 기전을 제공한다. (Ob-: ob 유전자에 대한 이형접합체; Ob-/Ob-: Ob/Ob 유전자에 대한 동형접합체; +C: 4주 동안 탄소에 의해 처리된 군).

도 37: 쿠퍼 세포 집단 F4/80+ LPS: ROS 생성. 비만인 생쥐의 탄소에 의한 처리는 쿠퍼 세포에 의한 활성산소종 생성에서의 감소를 유발하였다. (Ob-: ob 유전자에 대한 이형접합체; Ob-/Ob-: Ob/Ob 유전자에 대한 동형접합체; +C: 4주 동안 탄소에 의해 처리된 군).

도 38: 간 조직학 (콜라겐 염색). 비-알코올성 지방간 질환의 반 메티오닌 콜린 결핍 식이 (HMCD) 모델에서, 탄소는 조직학적 섬유화를 감소시켜, 탄소 처리가 간 섬유증에 대한 치료가 될 수 있다는 것을 암시한다. (HMCD 미처리: 식이 단독; HMCD 탄소: 4주 동안 식이 + 탄소 처리).

도 39: 간; 섬유증의 마커에 대한 유전자 발현. 비-알코올성 지방간 질환의 반 메티오닌 콜린 결핍 식이 (HMCD) 모델에서, 탄소는 콜라겐 A2 및 TGFβ1의 유전자 발현을 감소시킨다. 데이터는 탄소가 간 섬유증의 예방을 위한 치료가 될 수 있다는 것을 지지한다. (HMCD 미처리: 식이 단독; HMCD C4: 4주 동안 식이 + C4 처리).

도 40: ALT. 비-알코올성 지방간 질환의 반 메티오닌 콜린 결핍 식이 (HMCD) 모델에서, 탄소의 투여는 간 손상을 감소시켜, 탄소가 비-알코올성 지방간 질환의 치료가 될 수 있다는 것을 암시한다 (HMCD: 식이 단독; HMCD +C: 4주 동안 식이 + 탄소 처리; WT: 미처리 대조군).

도 41: 간 조직학 (H&E 염색). 비-알코올성 지방간 질환의 반 메티오닌 콜린 결핍 식이 (HMCD) 모델에서, 탄소는 간에서 지방 축적을 감소시켜, 탄소가 비-알코올성 지방간 질환의 치료가 될 수 있다는 것을 암시한다 (HMCD 미처리: 식이 단독; HMCD 탄소: 4주 동안 식이 + 탄소 처리).

도 42: 간 조직학 (지방증 점수(steatosis score)). 비-알코올성 지방간 질환의 HMCD 모델에서, 탄소는 지방 축적을 감소시켜, 탄소가 비-알코올성 지방간 질환의 치료가 될 수 있다는 것을 암시한다 (HMCD 미처리: 식이 단독; HMCD 탄소: 4주 동안 식이 + 탄소 처리).

도 43: 간 생화학. 비-알코올성 지방간 질환의 메티오닌 콜린 결핍 식이 (MCD) 모델에서, 탄소는 간 손상을 감소시켜, 탄소가 비-알코올성 지방간 질환의 치료가 될 수 있다는 것을 암시한다 (WT: 미처리 군; WT+C: 미처리 군 + C; MCD: 식이 단독 MCD+C: 탄소에 의해 처리된 MCD 동물).

도 44: 간 조직학 (H&E 염색). 비-알코올성 지방간 질환의 메티오닌 콜린 결핍 식이 (MCD) 모델에서, 탄소는 지방 축적을 감소시켜, 탄소가 비-알코올성 지방간 질환의 치료가 될 수 있다는 것을 암시한다 (MCD 미처리: 식이 단독; MCD+탄소: 식이 + 탄소 처리).

도 45: 비-알코올성 지방간 질환의 MCD 모델에서, 탄소는 조직학적 섬유화를 감소시켜, 탄소가 간 섬유증의 치료가 될 수 있다는 것을 암시한다 (MCD 미처리: 식이 단독; MCD+탄소: 식이 + 탄소 처리).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0173]

재료 및 방법

[0174]

탄소 물질

[0175]

제조예 1

[0176]

에틸렌 글리콜 중 평균 분자량 700-800D를 갖는 산업용 노볼락 수지 (Hexion Specialty Chemicals)의 100 중량부의 용액을 90-95℃로 가열하고, 동일한 온도로 가열된 에틸렌 글리콜 중 헥사메틸렌테트라민 (헥사민)의 15 내지 20 중량부의 용액과 2 내지 5분 동안 완전히 혼합하였다. 결과로 얻은 맑은 용액을, 2.5 내지 6배 부피의, 주성분이 다중불포화 (산화된) 식물성 오일인 산업용 건조 오일 (테니쉬 오일)이었던 0.2 내지 1% (v/v)의 분산제를 함유하는 교반된 고온의 (150-155℃) 낮은 점도의 미네랄 오일 (절연유 또는 변압기유)로 한번에(in a stream) 부었다. 혼합물의 온도를 135-140℃로 떨어뜨리고, 혼합물을 15-20분에 걸쳐 150-155℃로 재가열하였다. 일반적으로 140℃ 부근에서 1-2분 이내에 경화가 발생한 후 가스의 상당한 발생이 뒤를 이었다. 15-20분 동안 150-155℃로의 추가의 가열은 경화의 완결을 보장하였다. 혼합물을 냉각시키고 결과로 얻은 비드를 여과 또는 원심분리에 의해 오일로부터 분리하였다. 다중 온수 추출에 의해 또는 진공 중 건조 (50 mm Hg에서 120℃)에 의해 에틸렌 글리콜을 수지로부터 제거했다. 상기 과정에서, WO 02/12380의 실시예 3과 비교하여, 헥사민의 함량은 이전에 예시된 9 pbw로부터 노볼락 100pbw 당 15-20pbw으로 증가하였고, 수지 용액을 붓는 오일의 온도는 115-120℃로부터 150-155℃까지 증가하고, 이전에 예시된 바와 같은 "느린(slow)" 경화가 아닌 "플래쉬(flash)" 경화가 유발된다.

[0177]

물로-세척된 젖은, 건조된 또는 진공-건조된 수지 비드는 가열 처리되어 탄소 물질을 생성하였다. 일반적인 과정은, 주위 온도로부터 800℃로 3℃/분의 온도 램핑(ramping)과 함께 이산화탄소의 공급(flow) 중 탄화, 입자 크기에 의한 분류 및 900℃의 이산화탄소 공급 중 선택된 분획의 추가적인 "물리적" 활성화를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 또한, 당업계에 알려진 이 일반적인 과정의 여러 변이가 적용될 수 있다. 이 시료에서 활성화 정도는 약 30%였다.

[0178] 결과로 얻은 탄소의 메소/마크로 포어 크기 분포는, 용매/포어 형성제의 함량 및 결과로 얻은 탄소의 활성화 정도에 의해 조절되는, 수지-전구물질의 다공성에 의해 미리 결정된다. 하기 표 1은 활성화된 물질의 질소 기공측정법 및 수은 기공측정법 시험에 의해 제시된 바와 같이, 메소/마크로 다공성 탄소에 대한 전구물질인 4개의 수지 조성물의 세부사항을 제공한다. 대부분의 마이크로-마크로포러스 물질인 TE7 및 TE8은 그 뒤의 생물의학 검사(biomedical testing)에서 이용되었고, 매우 유사한 마크로포어 구조를 갖는다. 메소/마크로 도메인의 보다 작은 포어를 갖는 TE3 및 TE5 물질은 이해를 돕기 위한 것이고(for illustration) TNF α 와 같은 보다 큰 분자의 흡착에서 열등한 성능을 제공한다.

[0179] 결과로 얻은 수지 비드의 입자 크기 분포는, 교반 도구(stirring tool)의 유형, 교반 속도, 수지 용액의 점도, 분산제의 농도, 오일에 대한 수지 용액의 비율 및 분산의 온도를 포함하나 이에 제한되지 않는 여러 파라미터에 의존한다.

[0180] 다. 일반적으로 분포가 광범위함에도 불구하고 주된 분획의 크기는 ~10 micron 내지 ~1 mm으로 효과적으로 이동될 수 있었다.

표 1

제품 코드	노볼락 용액		헥사민 용액	
	노볼락	에틸렌 글리콜	헥사민	에틸렌 글리콜
TE3	100 pbw	80pbw	20 pbw	100pbw
TE5	100 pbw	100pbw	20 pbw	120pbw
TE7	100 pbw	150pbw	20 pbw	150pbw
TE8	100 pbw	150pbw	20 pbw	180pbw

[0182] 도 11은 각각 TE3, TE5 및 TE7 수지로부터 유래된 활성화된 탄소의 계산된 포어 크기 분포 (BJH 모델)를 나타낸다 (표 1로부터의 조성물): 이것은 <2nm 마이크로포어 크기 범위에서 큰 피크 및 5-500nm 범위에서 2차 메소/마크로 피크를 나타내고, 포어 크기 및 포어 부피는 표 1에 나타난 바와 같이 글리콜 포어 형성제 농도로 인해 증가하는, 모든 물질에 의한 탄소의 이봉 성질(bimodal nature)을 입증한다. 바람직한 물질인 TE7 및 TE8은 질소 흡착에 의해 측정된 바와 같이 10-500nm 범위에서 보다 큰 메소/작은 마크로포어를 갖는다. TE3는 유의하게 더 작은 포어 부피를 갖고 포어는 작은 메소포어 (2-50nm) 도메인으로 더 확대된다.

[0183] 제조예 2: 탄화된 비드의 활성화

[0184] 수지 비드는 이산화탄소 또는 증기에서 활성화될 수 있다. 이산화탄소는 보다 통제가능하고, 증기는 비용을 기초로 보다 큰 규모의 제조에 바람직하다. 이산화탄소에서의 활성화는 노(furnace)에서의 체류 시간에 의해 조절되는 번 오프(burn off) 정도에 의해 900℃ 부근에서 발생한다. 스팀 활성화는 바람직하게는 700℃ 부근에서 발생한다. 두 경우, 조건은 결정적이지 않고 온도 및 시간은 통상의 기술자에게 알려진 바와 같이 요구되는 활성화 정도를 제공하도록 조정될 수 있다. TE8 비드의 포어 구조에 대한 이산화탄소 활성화의 효과는, 표 2에서 요약된 포어 분포를 갖는 도 3에서 보여진다. 마이크로포어 부피에서의 증가는 도 3으로부터 보여질 수 있다. 또한, 표 2로부터 마이크로포어(<2nm)에서의 포어 부피는, 낮은 BET 표면적 (534m²/g)에도 해당하는 불활성화된 시료에서 매우 낮다(0.1cm³/g)는 것이 보여질 수 있다. 30% 이상의 번 오프에 대한 활성화는 마이크로포어 부피 및 표면적을 증가시킨다. 생물의학 흡착을 위한 바람직한 물질은 1000m²/g 이상의 면적, 0.3cm³/g을 초과하는 마크로포어 부피를 갖는다.

[0185] 표 2. CO2 활성화된 TE8 탄소에 대한 포어 구조

Material	Density g/cm ³	BET Area m ² /g	Total Vol (0.99)	Incremental Pore Volume		
			0.99 cm ³ /g	0-2nm cm ³ /g	2-50nm cm ³ /g	>50nm cm ³ /g
TE8 Unactivated		534	0.9	0.101	0.136	0.56
29% activated	0.22	1041	1.31	0.34	0.22	0.66
47% burn oif	0.17	1432	1.67	0.96	0.355	0.81

[0187] 활성화에 의한 탄소의 마크로포어 부피의 변화는 질소 흡착 방법의 인공물(artefact)이나 >0.5cm³/g이 되어야

한다. 보다 큰 포어 구조는 수은 기공측정법을 이용하여 측정되어야 한다. 이들은 도 2에서 40% 변 오프까지 활성화된 TE7 및 TE8에 대해 나타난다. >38000nm의 더 큰 포어는 비드 사이의 입자 간 빈 공간에 기인하고, 비드 내 내부 다공성에 기인하지 않는다. TE7 및 TE8 입자는 각각 88 nm and 91 nm에서의 포어 직경 피크, $1499 \text{ m}^2/\text{g}$ 의 표면적, $1.36 \text{ cm}^3/\text{g}$ 의 포어 부피, $0.2 \text{ g}/\text{cm}^3$ 의 벌크 밀도, 240-500 μm 의 입자 크기 및 40% 활성화 정도를 갖는다. 주요 피크 (>300nm)를 초과하는 포어의 부재는 두 물질에 대해 모두 메소포어 (2-50nm) 도메인의 포어의 필수적인 부재와 같이 즉시 명백하다. 수은은 관련된 압력으로 인해 ~6nm 미만의 포어에서 데이터를 제공할 수 없다.

[0188] 달리 특정되지 않는 한, 하기 인 비트로 및 인 비보 연구에서 이용된 다공성 탄소 입자는 전술된 활성화된 TE7 입자였다.

[0190] 인 비트로 연구

[0191] **박테리아 대사에 대한 시험 탄소의 직접 접촉 인큐베이션(direct contact incubation)의 영향에 대한 조사**

[0192] 탄소 물질 (특정된 TE7 또는 TE8)을 일반적인 유리병(glass universal bottle)에 가하고(weigh into) 2시간 동안 80°C에서 건조 가열 멸균하였다(dry heat sterilised). 1ml의 인산염 완충액 (PBS)을 각각의 0.1g 물질에 첨가하고 시료를 120rpm에서 진탕하면서 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 트립톤 소야배지(Tryptone soya broth: TSB)를 에세리키아 콜라이 (NCTC 10418) 또는 스타필로코쿠스 아우레우스 (NCTC 6571)로 접종하고 120rpm에서 진탕하면서 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 박테리아 현탁액을 원심분리에 의해 펠릿화하고 1 ml PBS에 재현탁하였다. 현탁액의 흡광도를 540nm에서 측정하고 현탁액 농도를 0.5의 값이 되도록 조정하였다. 그 후 이 희석인자를 TSB 중 박테리아 현탁액을 제조하는데 이용하였다. E coli 현탁액에 대하여 단계 희석에 의해 생존능 계수(viability count)를 수행하고 아가 플레이트 상에 플레이트팅하였다. 접종물 (1ml)을 각 물질에 첨가하고 시료를 120rpm에서 진탕하면서 37°C에서 인큐베이션하였다. 30분, 2시간 및 6시간의 시간 간격에서, 100 μl 의 박테리아 현탁액을 각 시료로부터 덜어서 96 웰 플레이트의 웰로 옮겼다. 시료를 용해하고 BacTiter-Glo 미생물 세포 생존능 분석법 (Promega)을 이용하여 세포 대사에 대한 척도로 ATP 함량을 분석하였다.

[0194] **박테리아 대사에 대한 탄소 삼출액(carbon leachate)의 영향에 대한 조사**

[0195] 탄소 물질 (TE8 및 중독을 위해 제시된 상용 ACTIDOSE 차콜)을 일반적인 유리병에 가하고 2시간 동안 120°C에서 건조 가열 멸균하였다. 2ml의 인산염 완충액 (PBS)을 각각의 0.2g 물질에 첨가하고 시료를 120rpm에서 진탕하면서 37°C에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 트립톤 소야배지(TSB)를 E.coli (NCTC 10418) 또는 바실러스 서브틸리스로 접종하고 120rpm에서 진탕하면서 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 박테리아 현탁액을 원심분리에 의해 펠릿화하고 TSB에 희석하여 대략 1×10^9 박테리아 ml^{-1} 의 최종 농도를 생성하였다. 100 웰 Bioscreen 플레이트에, 100 μl 의 추출물, 100 μl 의 접종물 및 100 μl 의 TSB를 첨가하고 박테리아의 수를 540nm에서 72시간 동안 모니터링하는 Bioscreen 혼탁도 분석기에서 박테리아의 성장을 측정하였다.

[0197] **시간 경과에 따른 내독소의 시험 탄소 흡착에 대한 조사**

[0198] TE8 시험 탄소에 의한 내독소 제거를 리몰루스 아메바세포 용해물(limulus amebocyte lysate: LAL) 엔도세이프 엔도크롬-K 시험 (endosafe endochrome-K test)(Charles River Laboratories UK) 및 endoscan-V 소프트웨어를 구비한 Tecan Sunrise 인큐베이션 플레이트를 이용하여 측정하였다. 내독소 오염을 최소화하기 위해 멸균 및 발열원 제거된(depyrogenated) 유리 제품 및 내독소가 없는 플라스틱을 사용하였다. TE8 시험 탄소 비드는 250°C에서 3시간 동안 건조 가열 멸균을 거쳤다. 탄소를 인공장액(simulated intestinal fluid: SIF)으로 미리-젖게 하였다. SIF는 미국 약전 26 recipe에 따라 판크레아틴 없이 및 LAL 시약액(reagent water)을 이용하여 각 실험 전 즉시 제조되었다. E coli 055:B5로부터 유래한 표준 리포폴리사카라이드 (LPS) 용액을 SIF 중 200 EU ml^{-1} 의 농도로 제조하였다. SIF를 흡입에 의해 탄소로부터 제거하고 내독소 스파이크된(spiked) SIF를 탄소 그램 당 10 ml의 중량 대 부피 비로 각 시험 탄소에 첨가하였다. 시험 시료 및 탄소가 없는 양성 대조군을 진탕하면서 37°C에서 인큐베이션하고 450 μl 의 시료를 0, 15, 30, 45 및 60분 시점에서 제거하였다. 각 시료의 내독소 농도를

제조사사의 지시사항에 따라 0.005 내지 50 EU ml⁻¹의 희석도를 이용하여 제조된 표준 곡선에 대하여 계산하였다.

[0199]

[0200] **TNF의 시험 탄소 흡착에 대한 조사**

[0201] 0.001 내지 0.005g 범위의 상이한 중량의 탄소 비드 (TE8 시험 탄소)를 동일한 4개의(in quadruplicate) 멸균 표지된 에펜도르프 튜브에 담고 37℃에서 2시간 동안 진탕 인큐베이터에서 1 ml의 SIF에 미리 젖게 하였다. 에펜도르프를 8000rpm에서 3분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 10ng/ml의 재조합 TNF에 의해 스파이크된 SIF를 첨가하였다. TE8 시험 탄소 흡착제를 90 rpm에서 24시간 동안 진탕하면서 37℃에서 인큐베이션하였다. 시료를 8000rpm에서 3분 동안 원심분리하고 상층액을 수집하고 -20℃에 저장하였다. 제조사사의 지시사항에 따라 (BD Biosciences) 시료를 ELISA에 의한 TNF 농도의 측정 전 분석 희석액 중에 희석시켰다.

[0203] **아세트알데히드에 대한 탄소 흡착의 영향에 대한 조사**

[0204] 0.001 내지 0.005g 범위의 상이한 중량의 탄소 비드 (TE8 시험 탄소)를 동일한 4개의 멸균 표지된 에펜도르프 튜브에 담고 37℃에서 2시간 동안 진탕 인큐베이터에서 1 ml의 SIF에 미리 젖게 하였다. 7.2 mM 스파이크, 0.1g/ml의 아세트알데히드를 첨가하였다 (n=3, 평균 +/-SE). 에펜도르프를 8000rpm에서 3분 동안 원심분리하였다. 아세트알데히드 (AT) 흡착을 2-디페닐아세틸-1,3-인단디온-1-하이드라존 (DIH)에 의한 유도체화 방법 및 HPLC에 의한 검출을 이용하여 측정하였다 (도 5B).

[0206] 인 비보 연구

[0207] 모든 동물 실험은 UK Animals in Scientific Procedures Act 1986 하의 Home Office 가이드라인에 따라 수행되었다. 수컷 스프라그-다워리 랫트 (체중 280-300g)를 이용하였다 (Charles River Laboratories UK Ltd.). 모든 랫트를 유닛에 수용하고 12시간의 명/암 주기와 함께, 19℃ 내지 23℃의 온도 및 약 50%의 습도에서 표준 분말 사료(standard powdered rodent chow) 및 음수에 대한 자유 접근이 주어졌다.

[0209] **담관결찰 모델**

[0210] 할로테인 무감각증(halothane anaesthesia) 하의 13마리의 수컷 스프라그-다워리 랫트는 담관-결찰 또는 모의 담즙 수술(sham biliary surgery)을 받았다. 랫트는, 최초 수술로부터 4-5주에 실험의 완료때까지 담관결찰 후 2주부터 일당 0.4g/100g 체중의 투여량으로 분말 사료 +/- 미리-수화된 (powered chow +/- pre-hydrated) Mastcarbon (250-500μm) (TE7)을 쌍으로 공급받았다(pair-fed). 복강내 크랩시엘라 리포폴리사카라이드 (LPS) (0.33mg/kg)를 연구의 완료 전 3.5시간 4개의 서브그룹에 투여하였다. 하기 그룹이 연구되었다: Sham (n=15), Sham + carbon (n=17), Sham + LPS (n=11), Sham+LPS+carbon (n=10), BDL (n=22), BDL + carbon (n=25), BDL+LPS+ carbon (n=10), BDL+LPS+carbon (n=16).

[0212] **장투과성 분석**

[0213] 실험의 완료 1일 전 장투과성 분석을 수행하였다. 밤새 순응을 위해 동물을 대사케이지(metabolic cage)에 두었다. 기준선 소변 시료를 동결튜브에 수집하고 -70℃에 저장하였다. 그 후, 락툴로오스 (277mM), L(+)-람노오스 (10mM) 및 3-메틸-o-피라노오스 (2.0mM)의 용액 0.6 ml을 개비지(gavage)에 의해 투여하고 그 뒤 5시간 동안 소변을 수집하였다. 질량 분석기를 이용하여 소변 시료를 분석하였다. 재-순응을 위해 동물을 그의 그룹 케이지로 되돌려보내고 종료 전 절식하였다.

[0215] **혈류역학(haemodynamic) 측정 및 시료 수집**

[0216] 할로테인 무감각증 (5ml/분 유도 2ml/분 유지)하에서 내경동맥(internal carotid) 카테터 (0.96 외경 Portex fine-bore polythene tubing, Scientific Laboratory Supplies Ltd., Nottingham, UK)를 전술된 바와 같이 삽입하였다. 연구 기간 동안 근위 및 원위 홀딩 봉합(holding suture)에 의해 카테터를 고정시켰다. 카테터를 변

환하고(transduce) 평균 동맥압을 결정하였다. 그 후 멸균 조건하에서 개복술(laparotomy)을 수행하고 카테터를 문맥에 위치시켰다. 동정맥 및 문정맥(arterial and portal venous) 카테터를 변환하였다. 출혈(exsanguination)의 상태가 달성될 때까지 공존하는 동정맥 및 문정맥 혈장을 무균성으로(aseptically) 리튬 헤파린 및 EDTA 튜브에 수집하였다. 그 후 차가운(ice-cold) 5ml의 PBS를 간에 관류시켜 기관 블랜칭(organ blanching)을 달성하였다. 간을 추출하고 10 ml의 차가운 PBS에 두었다. 혈장을 3,500rpm에서 10분 동안 4℃에서 원심분리하였다. 상층액을 즉시 동결튜브로 옮기고 -70℃에 저장하였다.

[0217] 십이지장, 중간-공장(mid-jejunum), 말단 회장 및 상행 결장(ascending colon)을 수집하고 포르말린 및 전자현미경 보존액 (200mM 소듐 카코딜레이트, 4% 글루테르알데히드, pH=7.2-4)에 저장하였다. 루멘을 세척(irrigate)하거나 오염물질을 제거하려는 시도 없이 조직염색 표본을 장간막의 베드(bed of mesentery)에 의해 수집하였다. 또한, 루멘의 오염물질 제거 및 염용액에 의한 세척 후 모두 4개의 부위로부터 시료를 수집하였다. 이 시료를 즉시 동결튜브로 옮기고 -70℃에 저장하였다. 또한, 간, 신장 및 뇌 조직을 수집하고 포르말린 및 동결튜브에 저장하고 -70℃에 저장하였다.

[0219] 간의 비-간세포(non-parenchymal cell)의 분리

[0220] 관류된 간 조직을 스캐펠(scapel)에 의해 해부하고 Hanks 밸런스(balanced) 염용액 (칼슘 및 마그네슘 + 콜라게나제 0.01% 및 DNase I (0.01%) 함유) 중에 균질화하였다. 균질 현탁액(homogenate)을 50ml Falcon 튜브로 옮기고 100mcm 셀 스트레이너(cell strainer)를 통한 여과 전 37℃에서 인큐베이션하였다. 그 후, 이것을 500rpm에서 5분 동안 4℃에서 원심분리하고 뒤이어 상층액을 2000rpm에서 10분 동안 4℃에서 원심분리하였다. 상층액을 버리고 펠릿을 PF4 (칼슘 또는 마그네슘 미포함 HBSS, DNase I 0.01%, 소 혈청 알부민 (0.25%)) 중에 재현탁하고 2000rpm에서 10분 동안 4℃에서 원심분리하였다. 그 후, 펠릿을 3.9ml의 RPMI 1640 중에 재현탁하고 2.1ml (RPMI 및 optiprep 22%)과 함께 부드럽게 혼합하였다. 그 후, RPMI를 적층하고(layer on top) 4℃에서 브레이크 없이 25분간 2800rpm에서 원심분리하였다. 비-간세포를 계면으로부터 분리하고, 동일 부피의 PF4 중에 재현탁하고 2000rpm에서 10분 동안 4℃에서 원심분리하였다. 후속의 모든 분석에서 10×10^6 개의 세포를 이용하였다.

[0222] 쿠퍼 세포의 식세포 기능

[0223] 세포를 2000rpm에서 4℃에서 5분 동안 원심분리하고 상층액을 폐기하였다. 라텍스 비드 함유 매질 $200\mu\text{l}$ 를 펠릿에 첨가하고 20분 동안 암 상태에서 37℃에서 인큐베이션하였다. 그 후, 5ml의 차가운 PBS를 첨가하고 2000rpm에서 5분 동안 4℃에서 원심분리하였다. 그 다음, 5ml의 차가운 PBS로 세척하고 원심분리하였다. 그 후, Fc 블로커(blocker)를 첨가하고 10분 동안 4℃에서 인큐베이션하였다. 그 후, 항-CD163 항체를 첨가하고 암 상태에서 30분 동안 4℃에서 인큐베이션하였다.

[0225] 쿠퍼 세포의 활성산소종 (ROS) 생성

[0226] $20\mu\text{g/ml}$ 의 *E.coli* 내독소를 1×10^6 개의 비-간세포 시료에 첨가하고 30분 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 최종 농도 200-500 μM 의 ROS 유도물질을 양성 대조군으로 이용하였다. 그 후, 시료를 500g에서 5분 동안 원심분리하고 상층액을 폐기하였다. 그 후, 세포를 5ml의 세척 완충액에 재현탁하고, 500g에서 5분 동안 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 세포를 500 μl 의 ROS 검출 용액에 재현탁하고, 암 상태에서 30분 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 원심분리 후, 세포를 100 μl 의 FACS 완충액에 재현탁하고, Fc 블로커를 첨가하고 (1:25) 10분 동안 4℃에서 인큐베이션하였다. 항-CD163 항체를 첨가하고 세포를 암 상태에서 30분 동안 4℃에서 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 1ml의 FACS 완충액으로 세척하고, 원심분리하고 100mcl FACS 완충액에 재현탁하였다.

[0228] 사이토카인 분석

[0229] BD™ Cytometric Bead Array (CBA) 키트를 이용하여 문정맥 TNF α , IL-4, IL-10 수준을 결정하였다. 50 μl 의 혼합된 포획 비드를 미리-적신 플레이트의 각 분석 웰에 첨가하였다. 그 후 50 μl 의 표준시료 또는 시료를 이 분석 웰에 첨가하였다. 플레이트를 디지털 진탕기를 이용하여 500 RPM에서 5분 동안 교반하고(agitate) 플레이트를 1

시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 그 후, 50 μ l의 혼합된 PE 검출 시약을 각 분석 웰에 첨가하였다. 그 후, 플레이트를 디지털 진탕기를 이용하여 500 RPM에서 5분 동안 교반하고 2시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 웰이 배수될 때까지 플레이트를 진공 흡입하였다. 150 μ l의 세척 완충액을 각 분석 웰에 첨가하였다. 그 후, 플레이트를 디지털 진탕기에서 500 RPM에서 5분 동안 교반하여 비드를 재현탁하였다. 그 후, 시료를 유세포 분석기에 의해 분석하고 데이터를 FACS Diva 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.

[0231] **내독소 측정**

[0232] 내독소의 검출을 위해 발색성 리물루스 아메바세포 용해물 동역학 분석 (Charles River Laboratories)을 이용하였다. 문정맥 혈장 (100mc1)을 내독소 미포함 물을 이용하여 1:10으로 희석하고 75℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 100mc1의 시료 및 100mc1의 LAL 시약을 96-웰 플레이트에서 혼합하고 엔도스캔 V 소프트웨어를 이용하여 분광광도계에 의해 405nm에서 분석하였다. 결과를 EU/ml로 표시하였다.

[0234] **호중구 분리**

[0235] 건강한 자원자로부터 얻은 전혈(4ml)을 5ml의 Polymorphoprep 위에 두고(layer over) 30분 동안 400g에서 실온에서 회전시켰다. 제2 계면으로부터 호중구를 수거하고 인산염 완충액으로 세척하였다. 호중구를 계수하고 50mc1:50mc1의 세포 현탁액 중 5x10⁵의 밀도로 PBS에 재현탁하고 분석 당 50mc1 혈장을 이용하였다. 생존능을 평가하였다.

[0237] **호중구 기능**

[0238] Phagoburst 및 Phagotest 분석을 이용하여, 정상 사람 호중구의 산화성 배출(oxidative burst) 및 식세포작용에 대한 문정맥 혈장의 공동-인큐베이션의 효과를 결정하였다. Phagoburst 키트 (Orpegan Pharma)를 이용하여 전술된 활성산소종을 생성하는 호중구의 비율을 결정하였다 (FACS CantoII, BD bioscience). Phagotest (Orpegan Pharma)를 이용하여 전술된 바와 같이 FITC-표지 옴손화(FITC-labeled opsonised) E.coli 박테리아를 이용함으로써 식세포작용을 측정하였다. 90분간 세포와 혈장의 인큐베이션 후, PBS로 세척하고 CD16-PE (3mc1)(Immunotools)과 함께 인큐베이션하였다. 호중구에 대한 해당 항체의 평균 형광 강도를 유세포 분석기 (FACS Canto II, BD bioscience)로 분석하였다.

[0240] **생화학 분석**

[0241] 표준 기법 (COBAS)을 이용하여 생화학 프로파일을 결정하였다.

[0243] **조직학 분석**

[0244] 표준 프로토콜에 따라 간조직을 처리하고 헤마톡실린 및 에오신과 함께 시리우스 레드(Sirius Red) 염색을 수행하였다. 14 포인트 2차 담즙성 간경변증 점수화 시스템(14 point secondary biliary cirrhosis scoring system)을 이용하여 컨설턴트 조직병리학자(consultant histopathologist)에 의해 조직학 단계(histological staging)를 수행하였다. 컴퓨터 보조 디지털 이미지 분석을 이용하여 시리우스 레드 염색을 정량하였다. Zeiss KS300 이미지 분석 소프트웨어를 이용하여 콜라겐 비례 면적(proportionate area)을 결정하였다. 결장, 간 및 신장 내 TLR-4 발현을 면역조직화학에 의해 결정하였다.

[0246] **뇌수(brain water) 분석**

[0247] 표준 프로토콜에 따라 뇌수를 정량하였다. 100g의 뇌조직을 24시간 동안 100℃ 인큐베이터에 두었다. 뇌수 손실 비율을 계산하였다.

- [0249] **통계 분석**
- [0250] 데이터를 평균±평균의 표준오차(SEM)로 표현하였다. 사용된 소프트웨어는 Graphpad Prism 5.0 (GraphPad software, Inc., San Diego, CA)을 포함하였다.
- [0252] **결과**
- [0253] 인 비트로 연구
- [0254] **실시예 1: 박테리아 대사에 대한 시험 탄소의 직접 접촉 인큐베이션의 영향에 대한 조사**
- [0255] TSB 중 E. coli 또는 S. aureus의 박테리아 현탁액과 TE8 시험 탄소의 직접 인큐베이션은, TE8 탄소가 4 내지 6 시간의 직접 접촉 후 두 종의 박테리아 성장에 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다 (도 6 및 7). 발광 측정은 박테리아의 ATP 결정을 통한 세포 생존능 및 세포 수의 간접적인 척도이다. 시험 접촉에 대한 박테리아 대사의 반영인 발광 수준은 시험의 시간 경과에 따라 두 종에 대한 흡착제 미포함 대조군에 비교할만하였다. 대조적으로, 대조군인 상용 ACTIDOSE 경구 탄소는 탄소에 의한 박테리아의 단지 30분간의 인큐베이션 후 발광 신호를 크게 감소시켰다.
- [0257] **실시예 2: 박테리아 대사에 대한 탄소 삼출액의 영향에 대한 조사**
- [0258] TSB 중 E. coli 또는 바실러스 서브틸리스의 박테리아 현탁액과 TE7 탄소 삼출액의 직접 인큐베이션은, TE7 탄소 삼출액이 72시간 이하의 인큐베이션 동안 두 종의 박테리아 성장에 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다 (도 8 및 9). 광학 밀도(OD) 측정은 박테리아 수의 간접적인 척도이다. TE7 시험에 대한 OD값은 시험의 시간 경과에 따라 두 종에 대한 흡착제 미포함 대조군에 비교할만하였다.
- [0260] **실시예 3: 시간 경과에 따른 내독소의 시험 탄소 흡착에 대한 조사**
- [0261] SIF 용액에서 검출된 내독소의 농도는 초기에 200 EU ml^{-1} 로 정점에 이르고 0 시간차의 160 EU ml^{-1} 의 검출 값으로부터 시험 탄소와의 60분간 인큐베이션 후 30 EU ml^{-1} 으로 감소하였다 (도 10). 대조군 용액은 시간 경과에 따라 안정적인 160 EU ml^{-1} 농도를 유지하였다.
- [0263] **실시예 4: TNF의 시험 탄소 흡착에 대한 조사**
- [0264] SIF로부터 염증성 사이토카인 TNF에 대한 TE8 시험 탄소의 제거 용량이 흡착 등온선(adsorption isotherm)에 나타난다 (도 11). TE8 탄소에 의해 평형상태에서 흡수된 TNF의 최대량은 탄소의 $10 \mu\text{gg}^{-1}$ 인 것으로 결정되었다.
- [0266] **실시예 5: 인 비보 연구**
- [0267] 탄소 처리 후 BDL+LPS (평균 18.05mmHg 미처리, 10.17mmHg 탄소 처리, $p=0.0007$) 및 BDL (평균 12.57mmHg 미처리, 11.02mmHg 탄소 처리, $p=0.0043$) 군에서 문맥압에서의 유의한 감소가 관찰되었다. 평균 동맥압에서 유의한 변화는 관찰되지 않았다 (도 14).
- [0268] 탄소 처리된 BDL 및 BDL+LPS 군에서 미처리 군에 비하여 알라닌 트랜스아미나제 (ALT)에서의 유의한 감소가 관찰되었다. 탄소 처리는 BDL+LPS 랫트에서 99 U/ml 로부터 62 U/ml 로의 ALT의 감소 ($p=0.0152$) 및 BDL 랫트에서 71U/ml 로부터 52U/ml 로의 ALT의 감소 ($p=0.0422$)와 연관되었다 (도 12). BDL 및 BDL+LPS 랫트에서 쿠퍼 세포 집단의 증가가 관찰되었다. 탄소에 의한 처리는 두 군에서 모의 대조군(sham control) 값을 향하는 유의한 감소를 유발하였다 ($p=0.0286$, $p=0.0357$). 전체 간 ROS 생성은, 모의 대조군(sham)에 비하여 BDL 랫트에서 증가하는 것으로 밝혀져 간 손상에서의 증가와 일치하였다. BDL 랫트에서의 탄소 처리는 총 ROS 생성에서 모의 대조군 값에 접근하는 현저한 감소와 연관되었다. 쿠퍼 세포의 식세포작용은 BDL 및 BDL+LPS 랫트에서 증가하는 것으로 관찰되었다. 탄소 처리에 의해 모의 대조군 값을 향하는 식세포작용의 정상화가 관찰되었다 (도 17 내지 21).

- [0269] 정상 호중구를 갖는 BDL 및 BDL+LPS 랫트로부터 문정맥 혈장의 인큐베이션 후 GMFI의 유의하지 않은 감소가 관찰되었다. 탄소 처리 후 GMFI에서의 감소는 BDL 랫트에서 1115로부터 944이고 BDL + LPS 랫트에서 1104로부터 998였다. 탄소-처리된 BDL 랫트에서 문정맥 IL-4 및 IL-10에서의 감소하는 경향이 관찰되었다. 문정맥 TNF α 및 내독소 수준은 탄소 처리군에서 더 낮은 것으로 관찰되었으나 이는 통계적으로 유의하지 않았다. 결장에서 TLR-4 및 2의 발현은 처리군과 미처리군 간에 상이한 것으로 밝혀지지 않았다.
- [0270] 처리 및 미처리 BDL 및 BDL+LPS 군 간에 콜라겐 비례 면적에서의 차이가 관찰되지 않았다. 간에서 평활근 액틴의 발현은 면역조직화학법에 의해 탄소 처리된 BDL 및 BDL+LPS 군에서 감소된 것으로 밝혀져, 가능하게는 정상 세포의 활성화에서의 감소 기전을 설명하였다.
- [0271] 탄소에 의해 처리된 동물에서 장 투과성이 정상화되었다 (도 22). BDL 탄소-처리군에서 건조 최종 체중에서의 유의한 증가가 관찰되었다 ($p=0.0271$) (도 15). 회장, 공장 및 결장의 조직학은 탄소에 의한 처리 후 영향받지 않은 채 유지되었다 (도 28).
- [0273] **비만**
- [0274] Ob-/Ob- 생쥐 모델에서 비만에 대한 다공성 탄소 나노입자의 영향을 조사하였다. 10-14주령 랩틴 결핍 유전적 비만인 수컷 생쥐는 탄소 치료를 받았다 (0.04g/10g/일). 생쥐는 5ml의 차가운 PBS에 의한 문맥으로의 간 관류 (hepatic perfusion)를 받았다. 쿠퍼 세포 단리에 의해 결과를 수집하고 세포 투과 없이 FACS 분석에 의해 규명하였다.
- [0275] ● F4/80 (쿠퍼 세포 마커)
- [0276] ● CD68 (대식 세포 마커)
- [0277] ● CD11b (자극된 내피, 식세포작용, 호흡 배출과의 상호작용을 매개)
- [0278] ● ROS (활성산소종) 분석 +/- LPS 처리(challenge)
- [0279] ● 식세포작용 분석
- [0281] **반(Half) 메티오닌 콜린 결핍 (HMCD) 및 메티오닌 콜린 결핍 (MCD) 실험**
- [0282] NAFLD의 염증성 및 섬유성 요소를 연구하기 위하여, 간의 산화 스트레스의 반 메티오닌 콜린 결핍 모델에서 다공성 탄소 입자의 영향을 조사하였다. 2주차부터 HMCD 급식(fed) 생쥐에게 탄소를 0.4g/100g/일의 투여량으로 급식하였다. 보다 진전된 질환을 달성하기 위하여 완전한 MCD 식이를 이용하였다. 4주 모델에서 1일차부터 MCD 급식 생쥐에게 탄소를 0.4g/100g/일의 투여량으로 급식하였다.
- [0284] **원위 장기 효과**
- [0285] 통상적인 염색 (H&E 및 PAMS)에 의한 신장 조직학에서 유의한 차이가 없었다. 신장에서의 TLR-4 발현은 유의하게 상이하지 않았다. 신장 기능의 반영인 혈청 크레아티닌은 탄소에 의해 처리된 BDL+LPS 군에서 더 낮았으나 유의하게 상이하지는 않았다 (도 30). 뇌수는 탄소-처리된 BDL+LPS 군에서 더 낮았으나 통계적으로 유의하지 않았다 (도 30). 거시 또는 미시 수준에서 탄소 색전증(embolisation)의 증거는 관찰되지 않았다.
- [0287] **논의**
- [0288] 본 발명자는 마이크로/메소포러스 탄소가 만성 간질환의 발병에 관계된 관내 인자를 결속시키는 최적의 다공성을 갖는다는 것을 인 비트로에서 입증한다. 유리 내독소에 대한 높은 친화도가 입증되었으나 박테리아의 성장 동역학에 대한 유의한 영향은 갖지 않았다. 그러므로, 마이크로-/메소포러스 탄소는 항생 효과 없이 내독소 흡착제로 작용한다. 생존가능한 박테리아의 부재하에서 박테리아 산물의 전이는 간경변에서 인식된 현상이다. 임상 연구는, 혈청 및 복수에서의 배양-음성(culture-negative) 박테리아의 PCR 양성도가 생존을 예측한다는 것을 나타내었다. 유리 관내 내독소의 전이가 BDL 랫트에서 입증되었고 ACLF의 발병에 관련된 전신성 내독소혈증(systemic endotoxaemia)을 유발한다는 것을 나타내었다. 그러므로, 유리 내독소를 결속시키는 능력을 갖는 마

이크로/메소포러스 탄소는 이 과정을 감소시킬 가능성을 갖는다. 또한, 박테리아의 성장 동역학에 영향을 미치지 않는 것에서, 탄소는 항생제 치료에 기인한 부작용과 연관되어있을 것 같지 않다. 이들은 잠재적으로 보다 유해한 효과를 갖고 장에서 내성을 갖는 박테리아 집단으로 향하는 공생 군총(commensal flora)의 이동(shift)을 갖는 항생제-유도 장내 세균총 불균형(antibiotic-induced dysbiosis)을 포함한다. 또한, 항생제는 내독소 생성을 유발하고 항생제 분류에 따라 내독소 동역학에 대한 가변적인 영향을 갖는다. 항생 활성의 부재하에서, 탄소 치료에 의해 이 영향은 관찰되지 않을 것이다.

[0289] 내독소혈증은 간경변에서 이상조절 염증 반응을 유도하는 것으로 알려져 있다. 이 연구에서의 인 비트로 데이터는, 마이크로-메소포러스 탄소가 간경변 및 급만성 간부전의 발병과 잠재적으로 관련된 염증유발 사이토카인에 대해 높은 친화성을 갖는다는 것을 확인한다. 임상 연구는 문정맥 사이토카인 수준의, 혈류역학 상태(portal haemodynamic status)를 포함한 질환의 자연적인 내력과의 연관성을 기술한다. 그러므로, 탄소에 의한 문맥-유래 사이토카인 반응의 폐기(abrogation)는 문맥성 고혈압에 영향을 미칠 가능성을 갖는다.

[0290] 본 발명자는 마이크로/메소포러스 탄소의 경구 투여 후 BDL 및 BDL+LPS 랫트에서 문맥압의 유의한 감소를 입증한다. 문맥압에서의 가장 현저한 비율의 감소는 BDL+LPS 처리군에서 관찰되었다. 이는, 탄소가 BDL 동물에서 특히 문맥압 반응에 있어서 내독소 민감도에 대한 현저한 효과를 갖는다는 것을 암시한다. 그러나, 탄소 치료는 평균 동맥압에 대한 유의한 영향을 갖지 않아서, 혈류역학 효과가 문맥 순환에 제한된다는 것을 암시한다.

[0291] 또한, 쿠퍼 세포 집단 및 기능이 탄소-처리에 의해 조절된다는 것으로 관찰되었다. 탄소-처리된 BDL 및 BDL+LPS 랫트에서 쿠퍼 세포 집단의 모의 수준(sham level)을 향한 정상화가 관찰되었다. 가장 놀라운 발견은 LPS-유도 쿠퍼 세포의 ROS 활성에서 유의한 감소였다. 이는 탄소-처리된 BDL 랫트의 쿠퍼 세포가 후속의 내독소 처리에 대한 프라이밍이 덜 되어있다(less primed)는 것을 암시한다.

[0292] 생화학적으로 이 발견은 알라닌 트랜스아미나제의 유의한 감소와 병행되어, 감소된 ROS-유도 간 손상을 암시하였다. 문정맥 혈장에서 내독소의 절대 수준은 처리 및 미처리 BDL 동물 간에 유의하게 차이를 갖는 것으로 밝혀지지 않았다. 문정맥 내독소에서 유의하지 않은 차이에 대한 한 가지 가능한 설명은 LAL 분석의 상대적인 둔감성일 수 있다. 내독소의 지질 A 구조는 생리학적으로 관련이 있으나 LAL 분석에 의해서는 검출가능하지 않다. 그러므로, 이 분석에 의해 검출된 절대값과 내독소의 생리학적 효과 간의 불일치에 대한 가능성이 존재한다. 또한, LAL 분석은 엔테로박테리아세(enterobacteriaceae) 패밀리의 공생하는 구성원으로부터 유래된 내독소의 검출에서 특히 둔감한 것으로 밝혀졌다. 쿠퍼 세포 내독소 민감성이 감소되는 것은 탄소 치료와 생리학적으로 보다 관련되어 쿠퍼 세포 집단 및 기능의 정상화를 유발한다.

[0293] 장 투과성은 락툴로오스 람노오스 분석(lactulose rhamnose assay)에 의해 증명된 바와 같이 경구 탄소에 의해 향상된다. 결장의 형태학적 비정상은 관찰되지 않았다 (도 28 및 22).

[0294] 사이토카인 분석 및 호중구 배출에 대한 문정맥 혈장의 효과가 평가되었다. 탄소-처리된 BDL 랫트로부터 얻은 혈장과 공동-인큐베이션된 호중구에서 미처리 대조군에 비해 휴지상태 배출(resting burst)의 유의하지 않은 감소가 관찰되었다. 호중구 기능 이상은 체액성 인자에 의해 매개되는 것으로 알려져 있고, 다수의 증거는 내독소를 발병과 연관시킨다. 증가된 산화성 폭발이 체액성 인자에 의해 부여된 것은 내독소를 발병과 강하게 연관시킨다. 또한, 문정맥 IL-4 및 IL-10에서의 감소가 관찰되었다. IL-4는 쿠퍼 세포 활성화에 관련되나, IL-10은 아디포넥틴/인터루킨-10/헴 옥시게나제-1(adiponectin/interleukin-10/heme oxygenase-1) 경로의 배경에서 쿠퍼 세포의 반응을 약화시키는(dampening) 것에 관련되었다. 탄소가 사이토카인 결합에 무분별할(indiscriminant) 경우, 염증유발 및 항-염증 사이토카인 반응이 동시에(in parallel) 감소된다는 것은 아마도 놀랍지 않은 것이다. 실제로, 급만성 간부전이 나타나는 환자는 확연한 염증유발 및 항-염증 반응을 동시에 보여준다. 전신 면역 기능에 대한 영향 없이 문맥 순환 내에서 이들을 감소시키기 위한 잠재적인 역할이 존재한다. 생물학적 시스템에서 빈번하게 관찰되는 바와 같이, 관찰된 값의 상당한 이질성(heterogeneity)이 존재하여, 경향을 유의하지 않고 따라서 추가 평가를 요구하게 만든다 (도 23 내지 26).

[0295] 인 비트로 연구에서 탄소가 *E. coli* 및 *S. aureus* 성장 동역학에 대한 유의한 효과를 갖지 않는 반면 (도 7 및 8), 인 비보에서 탄소 치료 후 배설물(faecal) 박테리아 집단에서의 조절이 입증되었다 (도 31 내지 33). 박테로이드 집단에 의해 현저한 효과가 관찰되었다. 그러므로, 탄소는, 박테리아의 대사물질 또는 기타 세포 내 신호 분자를 결속시킴으로써 대장균이 아닌(non-*E.coli*) 박테로이드의 성장 동역학에 영향을 미치거나 장내 미생물군총(gut microflora)의 조성에 영향을 미칠 수 있다.

[0296] 탄소-처리 동물에서 간의 평활근 액틴 발현에서의 감소가 관찰되었다. 이는, 탄소 처리의 하류 효과

(downstream effect)가 정상 세포 기능의 조절을 포함한다는 것을 암시한다. 아마도 동물이 최종 2주 동안에만 처리되었기 때문에 섬유증의 척도인 콜라겐 비례 면적은 탄소 처리 후 유의하게 차이를 갖는 것으로 밝혀지지 않았으나, 평활근 액틴에서의 감소는 탄소 처리가 감소된 간 섬유증을 유발할 수 있다는 것을 암시한다. 종합하면, 이 데이터는 문맥의 혈류역학에 대한 탄소의 효과가 사인곡선적(sinusoidal) 수준에서 매개된다는 것을 암시한다. 쿠퍼 세포 집단 및 기능에 대해 관찰된 영향을 고려할 경우, 본 발명자는 마이크로-/메소포러스 탄소 치료가 박테리아 산물의 감소된 전이 및 그 결과 염증 반응을 유발하여, 감소된 쿠퍼 세포 프라이밍(priming), ROS 생성 및 정상 세포 활성화 및 그로 인한 섬유증을 유발한다는 것을 상정한다.

[0297] 미처리 BDL 랫트에 비해 탄소-처리된 BDL 랫트에서 최종 체중에서의 유의한 개선이 관찰되었다. 모의 군 간 최종 체중(body)에서의 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 간경변에서의 중량 손실은 특히 전신 염증 반응의 배경에서 증가된 이화 상태 및 감소된 식욕을 원인으로 한다. 이 실험에서의 동물은 쌍-급식되고(pair-fed) 상기 발견의 맥락에서, 본 발명자는 체중에서 관찰된 개선이 감소된 이화 상태에 기인한 것으로 본다.

[0298] 경구 탄소 치료는, 탄소-처리 Ob-Ob- 생쥐에서의 중량 감소를 향한 경향과 함께 ALT에서의 유의한 감소와 연관되었다. 또한, ALT는 비-알코올성 지방간 질환의 두 개의 다른 모델, 즉, 반 콜린 메티오닌 결핍 식이 및 메티오닌 콜린 결핍 식이에서 감소되었다. 손상에서 이와 같은 감소는 모든 3개의 모델에서 간의 지방 축적의 감소 및 이들 3개의 모델에서 염증성 침윤의 감소에 대한 증거와도 연관되었다. 간 손상 및 지방 축적에서의 이와 같은 감소는 섬유증의 중증도 및 유전자 발현 수준에서 섬유증 마커의 감소와 연관되었다. 종합하면, 이 데이터는, 탄소가 비-알코올성 지방간 질환에 대한 효과적인 치료이고 섬유증의 중증도를 감소시킨다는 것을 나타낸다.

[0299] 조절된 다공성을 갖는 탄소가 이를 달성하는 기전은 쿠퍼 세포 기능의 조절을 통해서이다. 비-알코올성 지방간 질환의 모델에서 탄소에 의한 처리는 쿠퍼 세포 표현형의 조절을 유발하여, 총 쿠퍼 세포 집단 및 CD11b (사이토카인을 생성하는) 쿠퍼 세포에서의 감소를 유발한다. 식세포작용 및 ROS 생성 세포의 관점에서 CD68+ 쿠퍼 세포에서의 증가가 관찰되었다. LPS-유도 ROS 생성에서의 유의한 감소가 관찰되었다 (도 34 내지 38).

[0300] LPS의 투여 후 BDL 동물에서 유도된 신장 기능의 악화는 탄소 처리 동물에서 낮아져 신장의 보호를 나타내었다. 탄소 처리 BDL+LPS 동물에서 보다 낮은 뇌수는 간성뇌증의 치료로서의 잠재성을 암시하였다. 종합하면, 이 데이터는 급만성 간부전의 예방을 위한 치료로서 탄소의 가능한 역할을 암시한다.

[0302] 결론

[0303] 마이크로포어 및 메소포어/작은 마크로포어를 갖는 TE7/TE8 활성화 탄소는 박테리아의 성장 동역학에 대한 유의한 영향 없이, 인 비트로에서 내독소 및 염증유발 사이토카인을 신속하게 결속시킨다. 이들 탄소의 인 비보 경구 투여는 쿠퍼 세포 집단 및 내독소-유도 ROS 활성화의 감소와 연관된 문맥압 및 간 생화학에서의 유의한 감소를 유발한다. 이는 IL-4 및 IL-10의 감소를 향한 경향과 연관되어 있었다. 콜라겐 염색에서 유의한 차이가 관찰되지 않았으나 탄소 처리는 평활근 액틴 발현의 감소와 연관되어 있었다. 종합하면, 이 데이터는, 경구 TE7/TE8 마이크로/메소/작은 마크로포러스 탄소가 박테리아 산물의 전이 및 하류 면역/염증 반응을 감소시킴으로써 사인곡선적 수준에서 문맥성 혈류역학을 조절한다는 것을 암시한다.

[0304] 마이크로포어 및 메소포어/작은 마크로포어를 갖는 TE7/TE8 활성화 탄소는 그것을 현재 이용가능한 개입(intervention)보다 우수하게 만드는 특성을 보여준다. 다공성의 범위는 내독소 및 사이토카인과 같은 생물활성 분자의 결속 측면에서 순수 마이크로포러스 제제보다 우수성을 부여한다. 탄소는 항상 활성을 보이지 않으므로 내성 또는 추가의 장내 세균총 불균형이 수반되는 위험과 연관되지 않는다. 이 관찰은, 경구 TE7/TE8 마이크로/메소/작은 마크로포러스 탄소 치료가 특정한 문맥성 고혈압에서 간경변의 합병증을 감소시키는, 잠재적인 안전하고 효과적인 개입 전략으로서의 가능성을 갖는다는 것을 암시한다.

[0306] 실시예 6: 비-알코올성 지방간염 (NASH)의 모델로서 렙틴 결여(nu11) 생쥐에서 경구 나노포러스 탄소 입자 치료의 영향

[0307] 방법

[0308] 수컷 10-14주령 생쥐: 10 마리 lep-/lep- (Ob-/Ob-) 결여 및 10 마리 이형접합성 수컷 생쥐를 무작위로 4주 동안 분말 사료 +/- 탄소 (TE7; 0.4g/100g 체중/일)를 공급받게 하였다 (WT - n=3; Ob- 이형접합성 - n=5; Ob-

이형접합성 + 탄소 - n=5; Ob-/Ob- 미처리 - n=5; Ob-/Ob- + 탄소 - n=5). 간 손상의 정도를 ALT의 혈청 수준에 의해 평가하였다. 추가로, 비-간세포를 단리하고 쿠퍼 세포 (KC) 집단을, F4/80 (쿠퍼 세포 마커), CD68 (대식세포 마커) 및 CD11b (자극된 내피, 식세포작용, 호흡 폭발과의 상호작용을 매개)를 발현하는 세포와 같이 유세포 분석기에 의해 규명하였다. 또한, 단리된 KC에 의한 활성산소종 (ROS) 생성을 분석하였다. 내독소혈증의 대용물로서 간의 TLR-4 발현을 면역조직화학법에 의해 결정하였다.

[0310] **결과**

[0311] lep-/lep- 생쥐에서, 경구 탄소 치료 또는 예방은 889 ± 280 IU/ml에서 408 ± 42 IU/ml로의 유의한 감소와 연관되어 있었다 ($p < 0.05$). 총 KC 집단은, 탄소 치료 또는 예방에 의해 유의한 감소가 관찰된 이형접합성 대조군에 비해 lep-/lep- 생쥐에서 증가하는 것으로 밝혀졌다 ($p < 0.05$). 또한, 미처리 lep-/lep- 대조군에 비해 탄소 처리 lep-/lep- 생쥐에서 KC의 ROS 생성에서의 유의한 감소가 관찰되었다 ($p < 0.05$). 또한, 탄소 치료 또는 예방 군의 존재 하에 lep-/lep-에서 F4/80+, CD68-, CD11b+ 세포 서브-집단의 유의한 감소가 관찰되었다 ($p < 0.05$). 또한, 간의 TLR-4 발현은 미처리 대조군에 비해 탄소-처리 lep-/lep- 생쥐에서 감소되었다. 최종적으로, 본 발명자는 미처리 대조군에 비해 탄소-처리 lep-/lep- 생쥐에서의 최종 체중의 감소를 향한 경향을 관찰하였다 ($p = 0.095$).

[0313] **결론**

[0314] 내독소혈증 및 쿠퍼 세포 기능의 조절을 통한 경구 TE7/TE8 마이크로포러스/작은 마크로포러스 탄소 입자는 비-알코올성 지방간 질환에 대한 신규한 치료법이 될 수 있다.

[0316] **실시예 7: 아세트알데히드 제거**

[0317] 도 5는 시간 경과에 따른 아세트알데히드의 제거를 나타낸다. Ac는 매우 활성상태에 있어서, DIH 유도체화제를 Rideout 방법에 따라 이용하였다. 이는 430 nm에서 검출가능한 안정한 아진(azine) 형광 유도체를 형성한다.

[0319] **실시예 8. 비-알코올성 지방간염 (NASH)의 모델로서 반 메티오닌 콜린 결핍 식이 (HMCD) 급식 생쥐에서 경구 나노포러스 탄소 입자 치료의 효과**

[0320] **방법**

[0321] 10 마리의 수컷 10-14주령 생쥐를 메티오닌 콜린 결핍 식이에 의해 처리하였다 (MCD; 4주); 10 마리의 생쥐를 대조군 식이로 급식하였다 (4주). 각 군에서, 동물을 무작위로 2주 동안 분말 사료 +/- 탄소 (TE7; 0.4g/100g 체중/일)를 공급받게 하였다. 간 손상의 정도를 ALT의 혈청 수준 및 조직학에서의 H 및 E 염색에 의해 평가하였다. 섬유증의 중증도를 시리우스 레드 염색을 이용하여 알아내었다. 섬유증의 마커인, 콜라겐 1 A2 및 TGF 베타에 대한 유전자 발현을 간 조직에서 측정하였다.

[0322] **결과**

[0323] 탄소에 의한 처리는 ALT 수준을 정상화시키고 HMCD 생쥐에서 간지방증 및 염증성 세포 침윤을 현저하게 감소시켰다. 이는 섬유증 마커의 유의한 감소와 연관되어 있었다. 콜라겐 1A2 및 TGF 베타의 유전자 발현은 탄소에 의해 처리된 동물에서 유의하게 감소되었다 (도 39-43).

[0325] **결론**

[0326] 내독소혈증 및 KC 기능의 조절을 통한 경구 TE7/TE8 마이크로포러스/메소 탄소 입자는 비-알코올성 지방간 질환에 대한 신규한 치료법이 될 수 있다.

[0328] **실시예 9. 비-알코올성 지방간염 (NASH)의 모델로서 메티오닌 콜린 결핍 식이 (MCD) 급식 생쥐에서 경구 나노포러스 탄소 입자 치료의 효과**

[0329] 방법

[0330] 10 마리의 수컷 10-14주령 생쥐를 메티오닌 콜린 결핍 식이에 의해 처리하였다 (MCD; 4주); 10 마리의 생쥐를 대조군 식이로 급식하였다 (4주). 각 군에서, 동물을 무작위로 2주 동안 분말 사료 +/- 탄소 (TE7; 0.4g/100g 체중/일)를 공급받게 하였다. 간 손상의 정도를 ALT의 혈청 수준 및 조직학에서의 H 및 E 염색에 의해 평가하였다. 섬유증의 중증도를 시리우스 레드 염색을 이용하여 알아내었다.

[0332] 결과

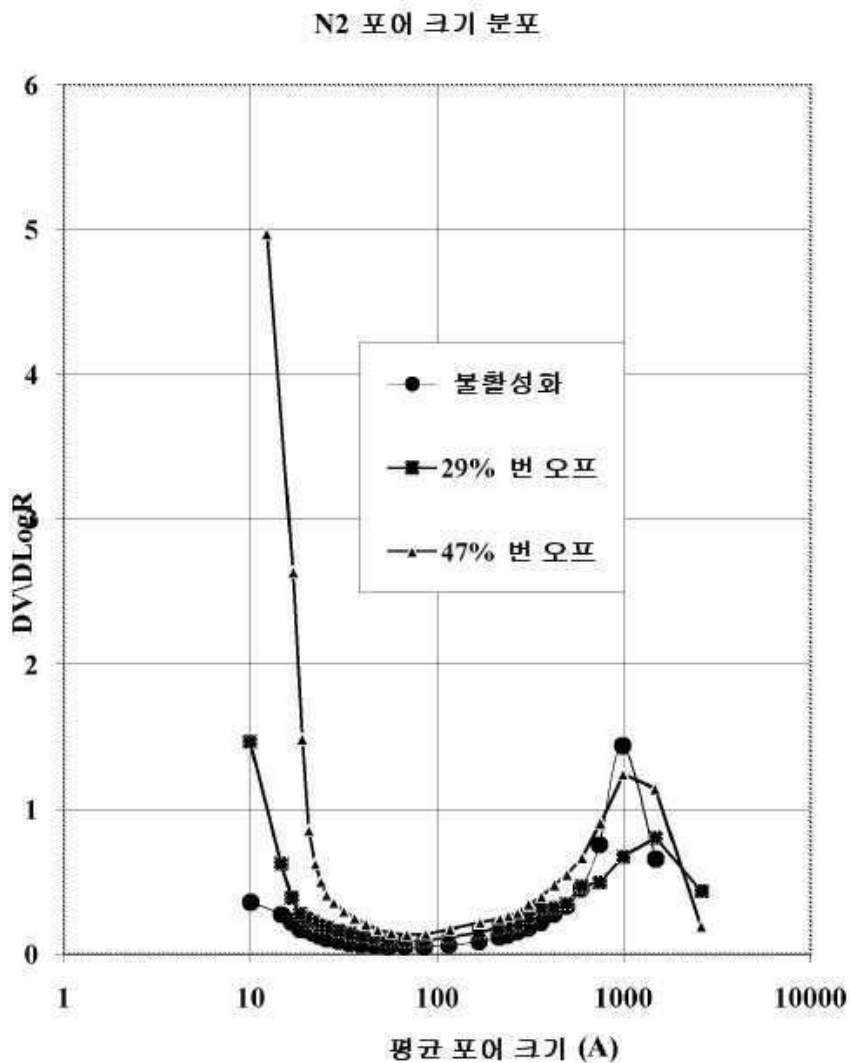
[0333] 탄소에 의한 처리는 ALT 수준을 정상화하였고 MCD 생쥐에서 간지방증 및 염증성 세포 침윤을 현저하게 감소시켰다. 이는 섬유증의 유의한 감소와 연관되어 있었다 (도 44 내지 46).

[0335] 결론

[0336] 내독소혈증 및 KC 기능의 조절을 통한 경구 TE7/TE8 마이크로포러스/메소 탄소 입자는 비-알코올성 지방간 질환에 대한 신규한 치료법이 될 수 있다.

도면

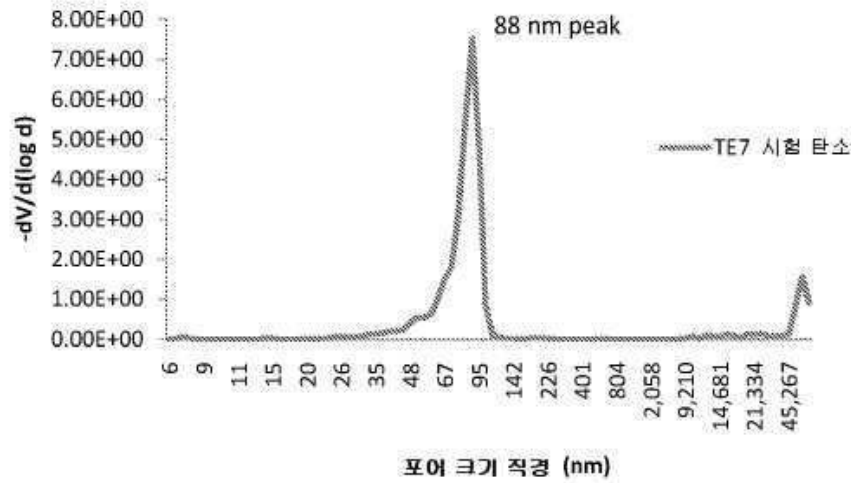
도면1



도면2

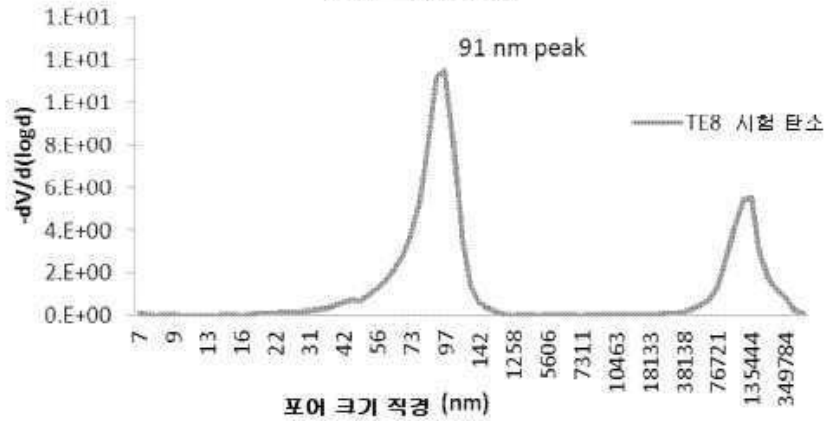
A

수은 기공측정법에 의해 측정된
포어 크기 분포

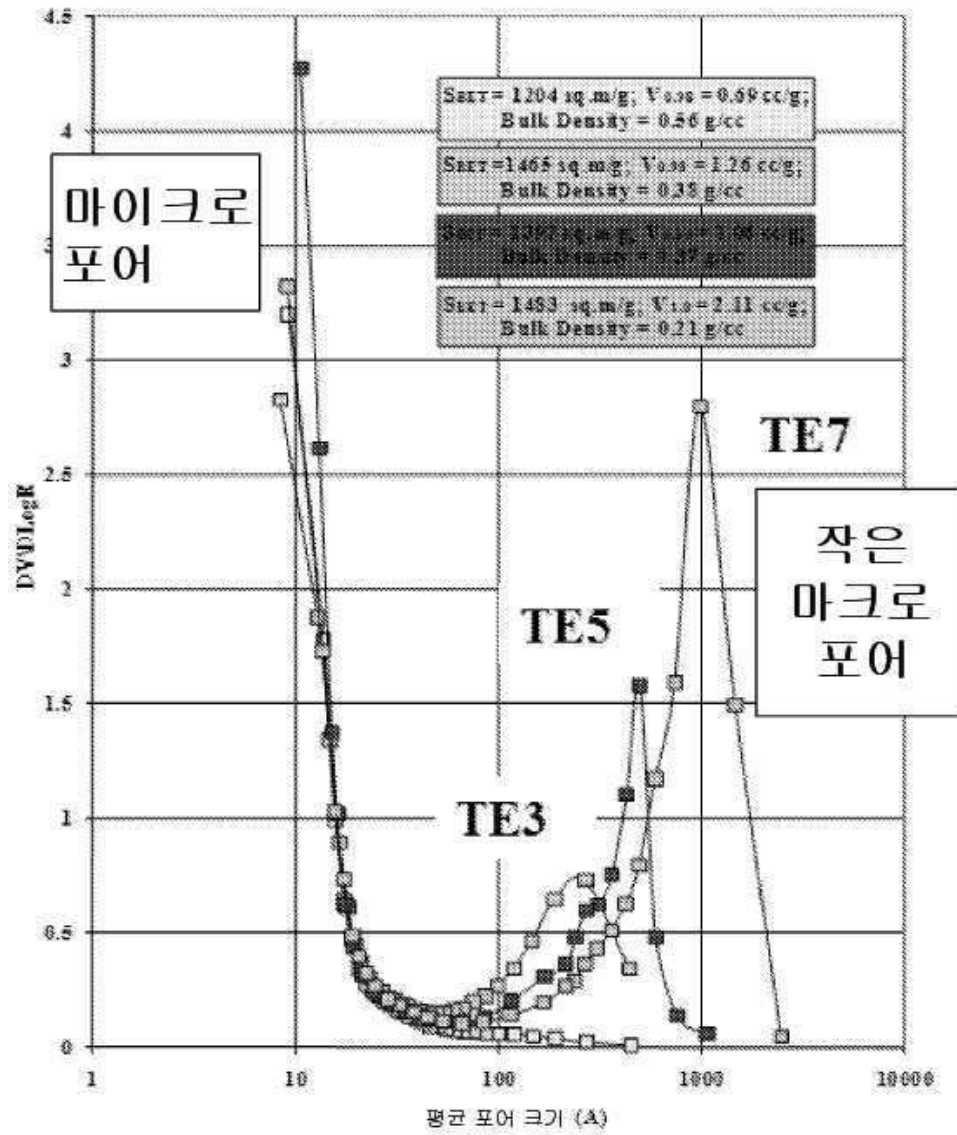


B

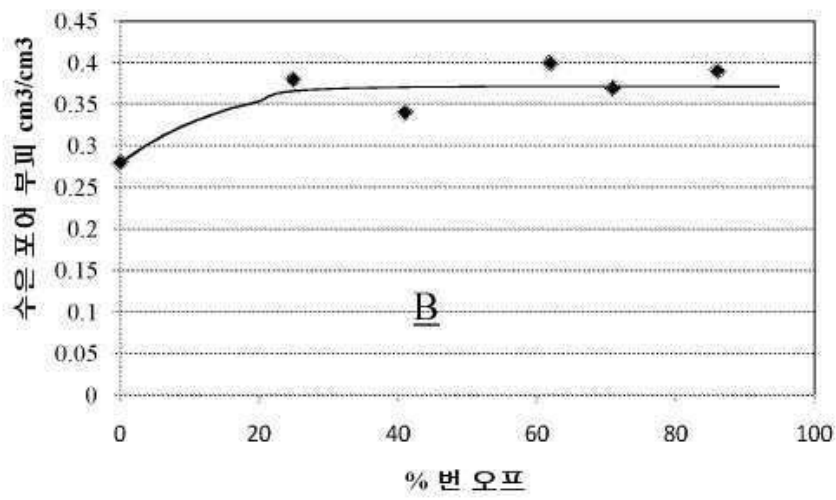
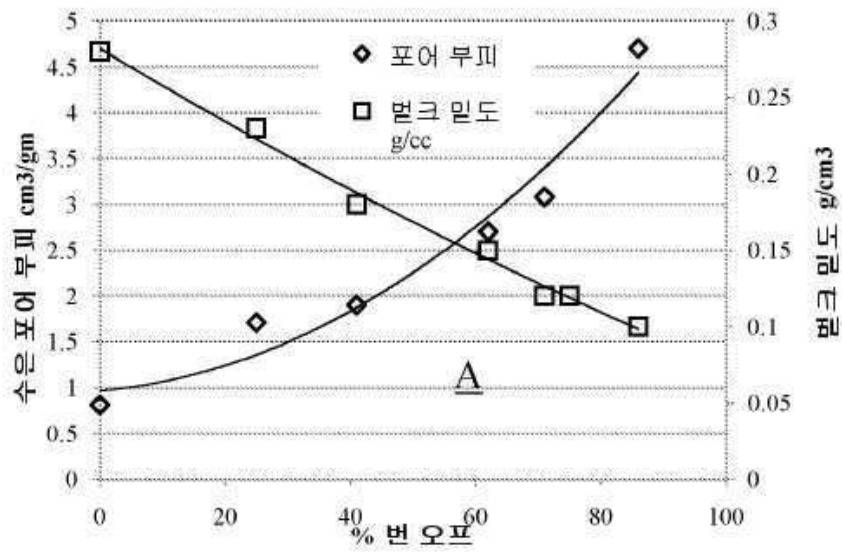
수은 기공측정법에 의해 측정된
포어 크기 분포



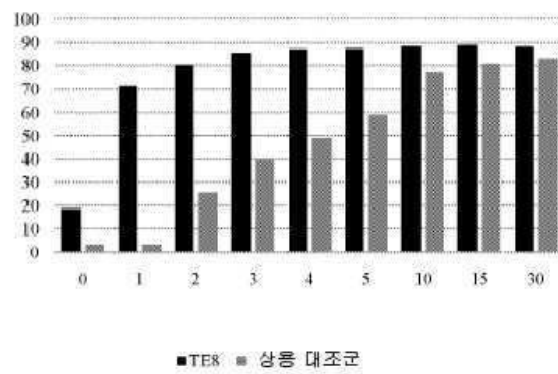
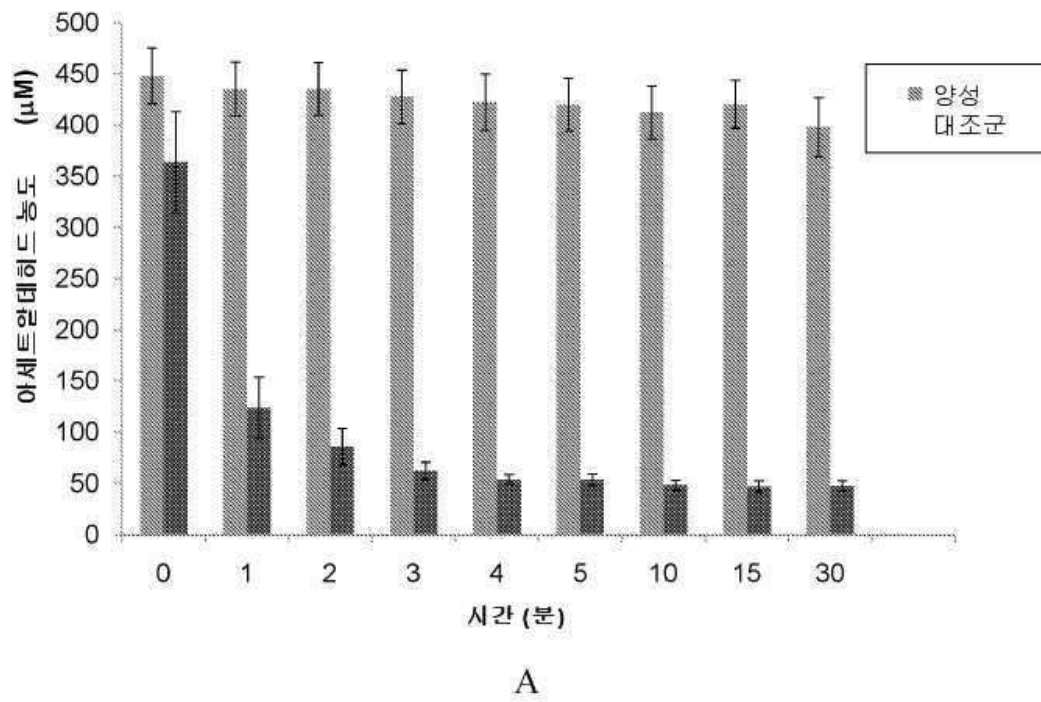
도면3



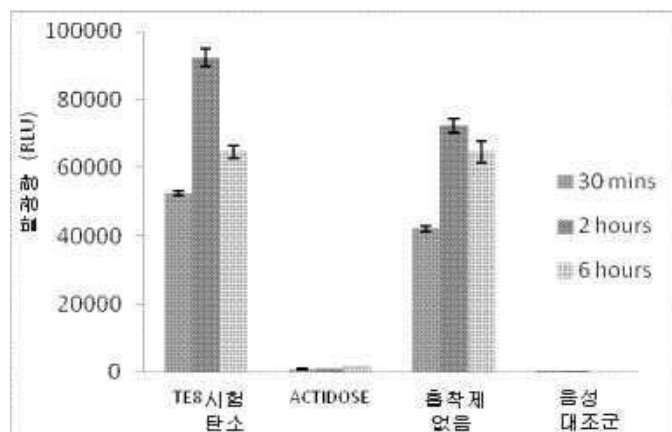
도면4



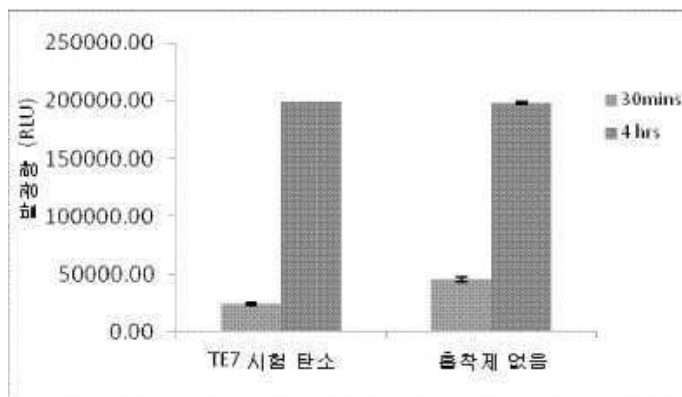
도면5



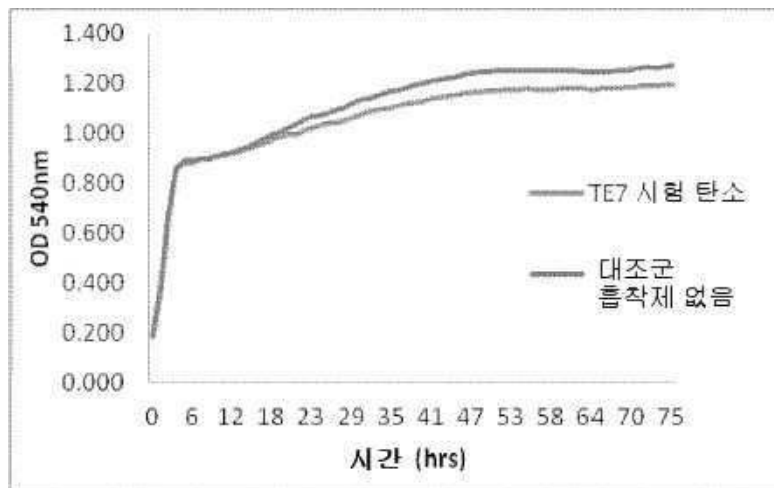
도면6



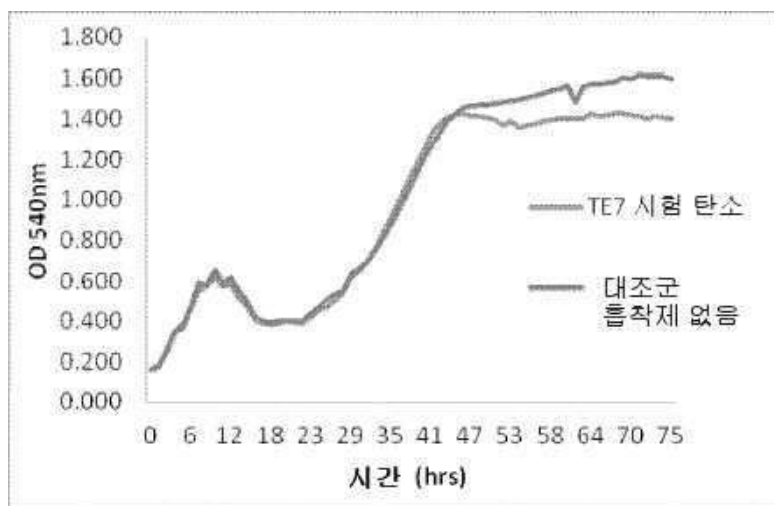
도면7



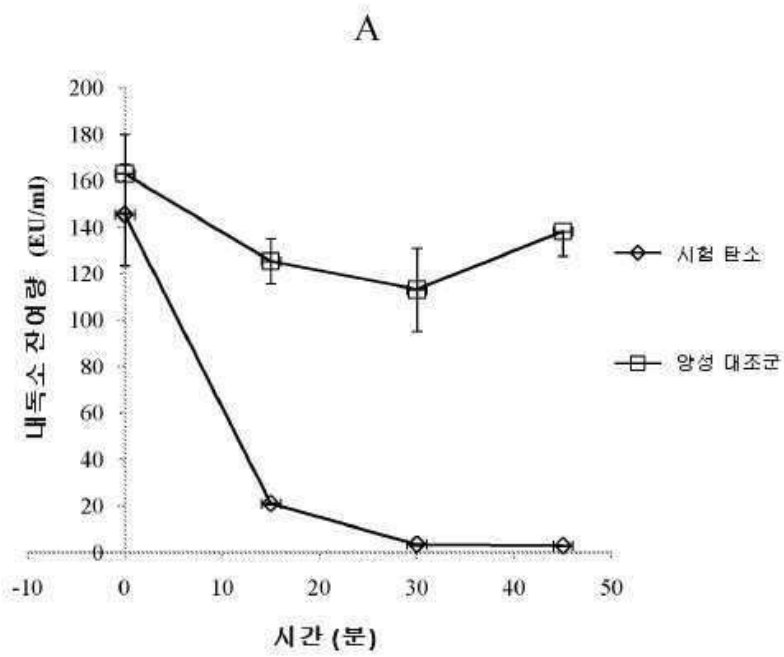
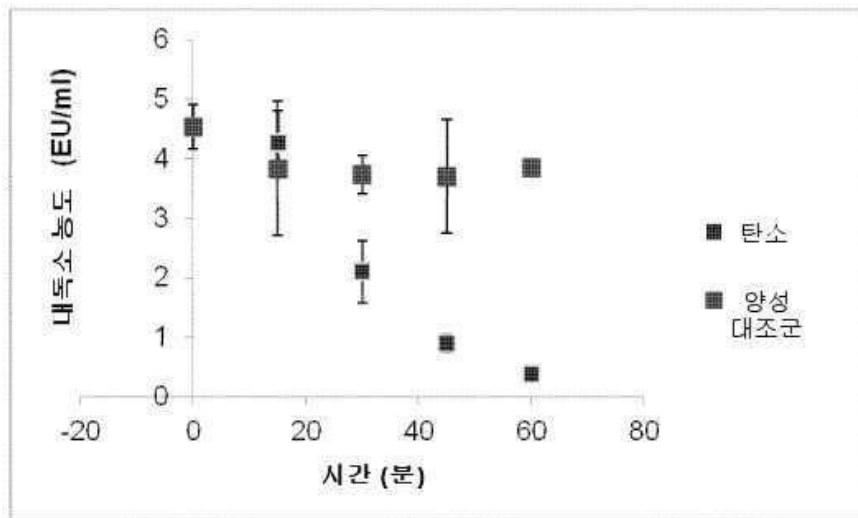
도면8



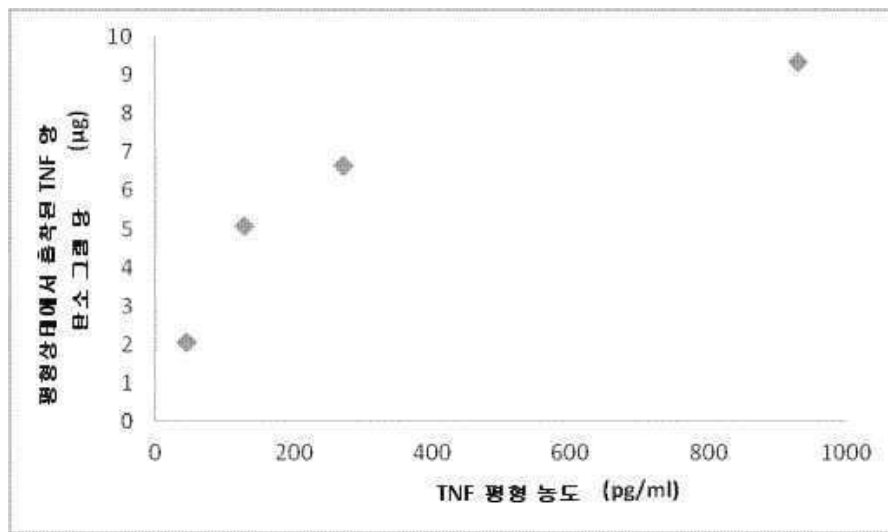
도면9



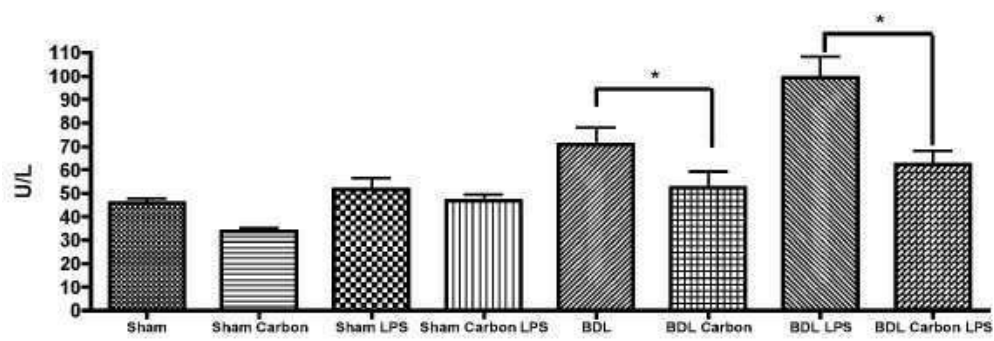
도면10



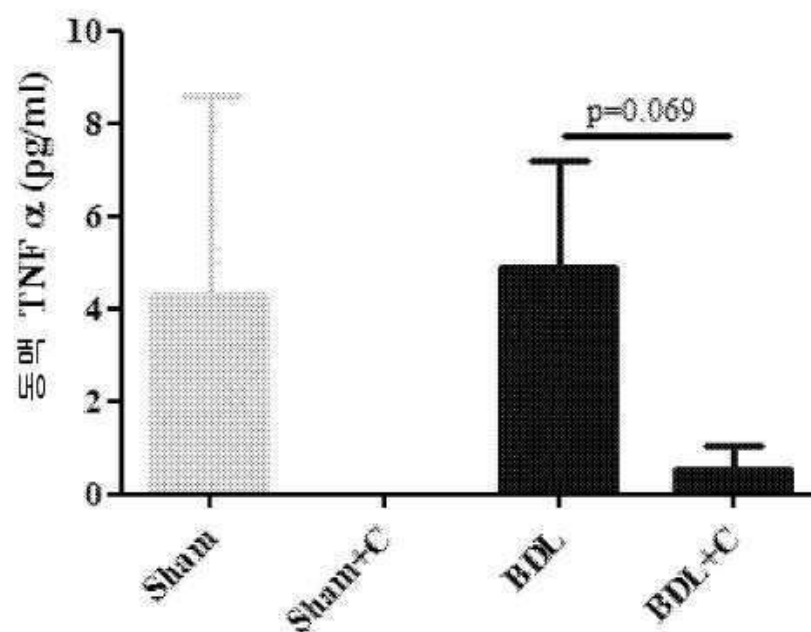
도면11



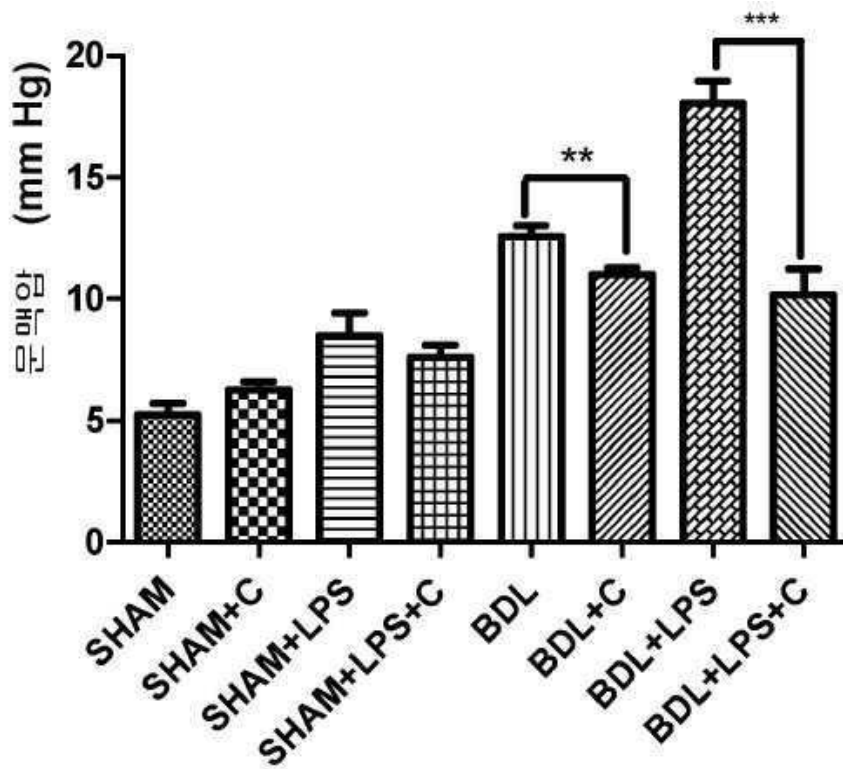
도면12



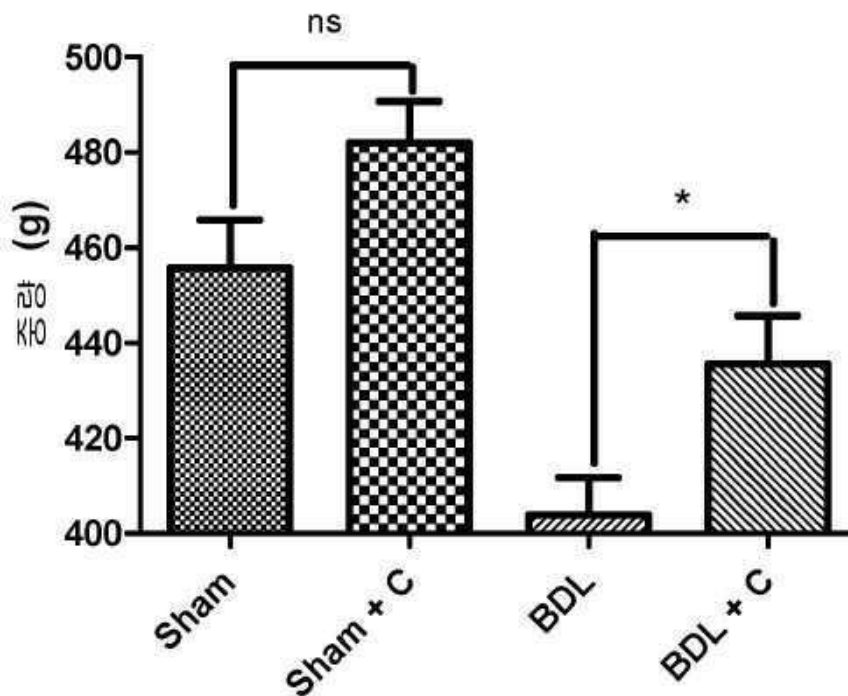
도면13



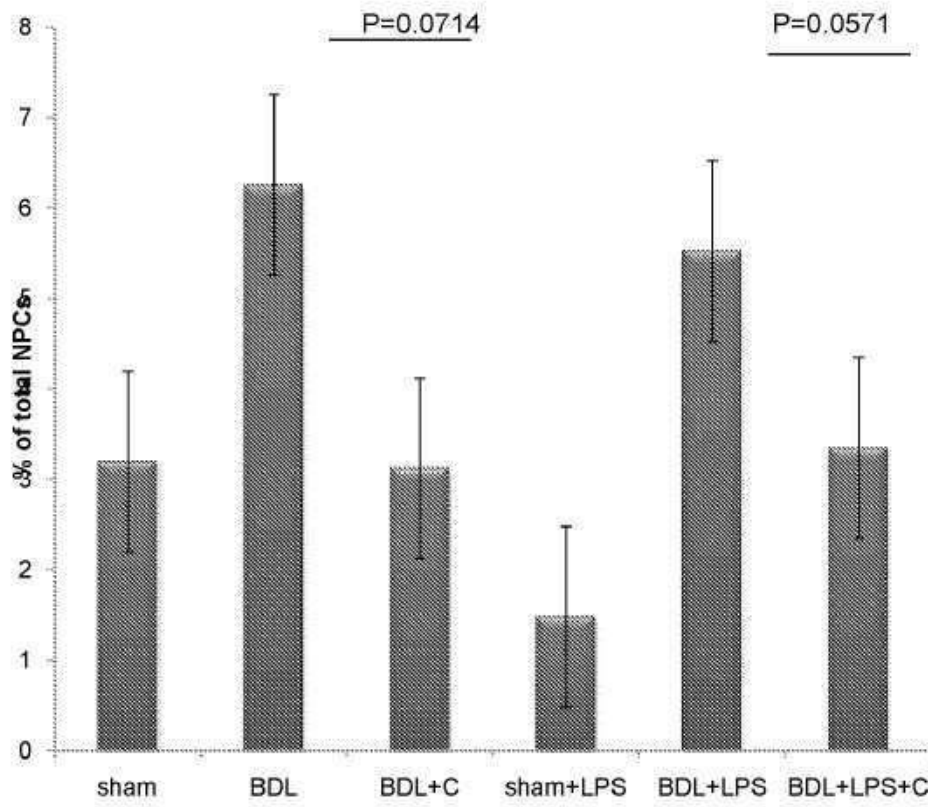
도면14



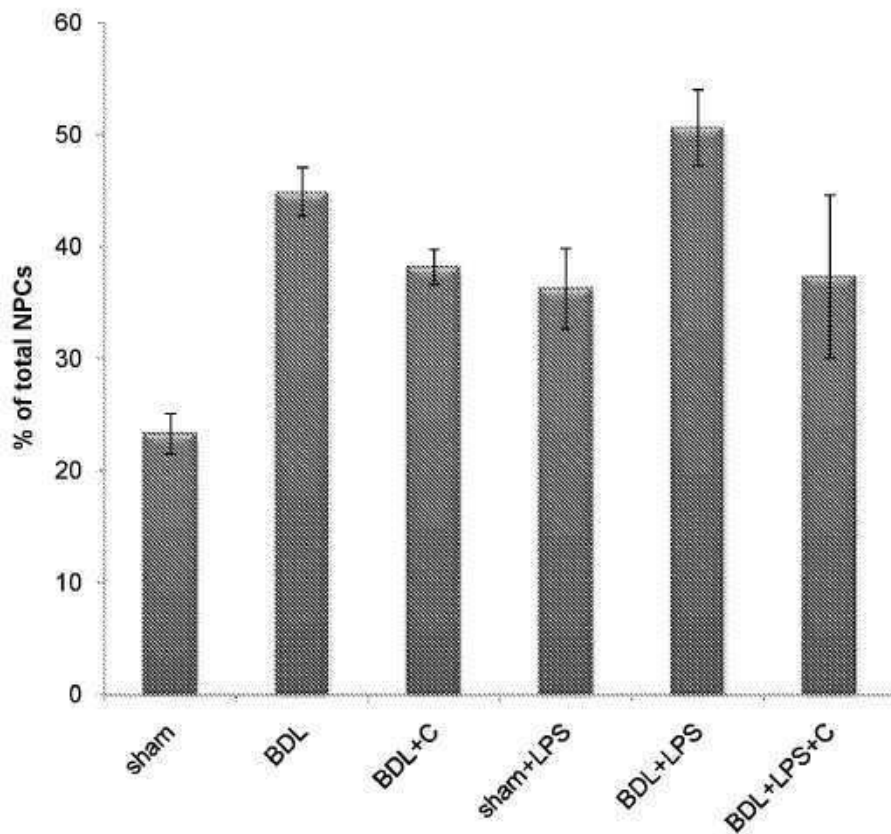
도면15



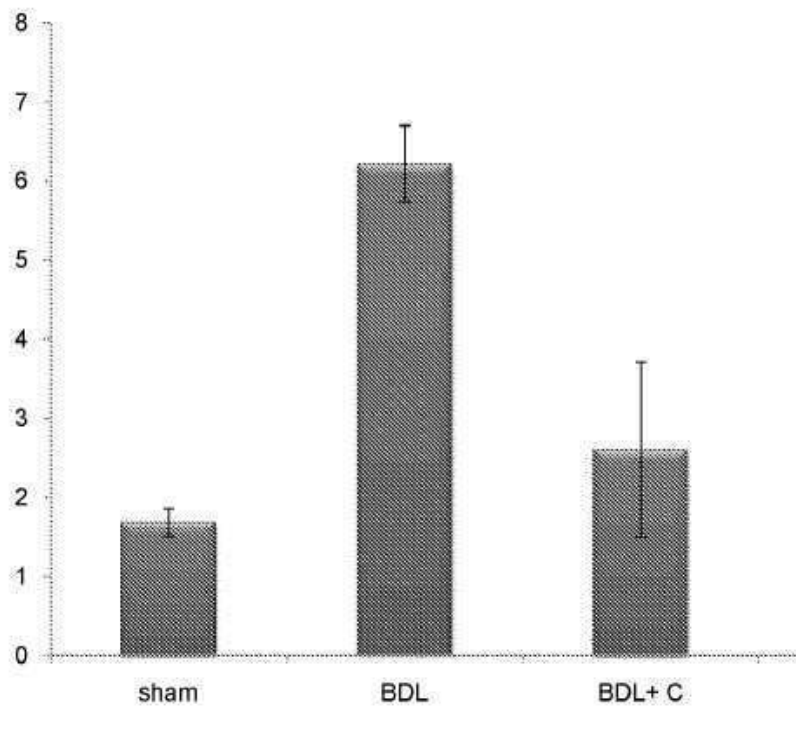
도면16



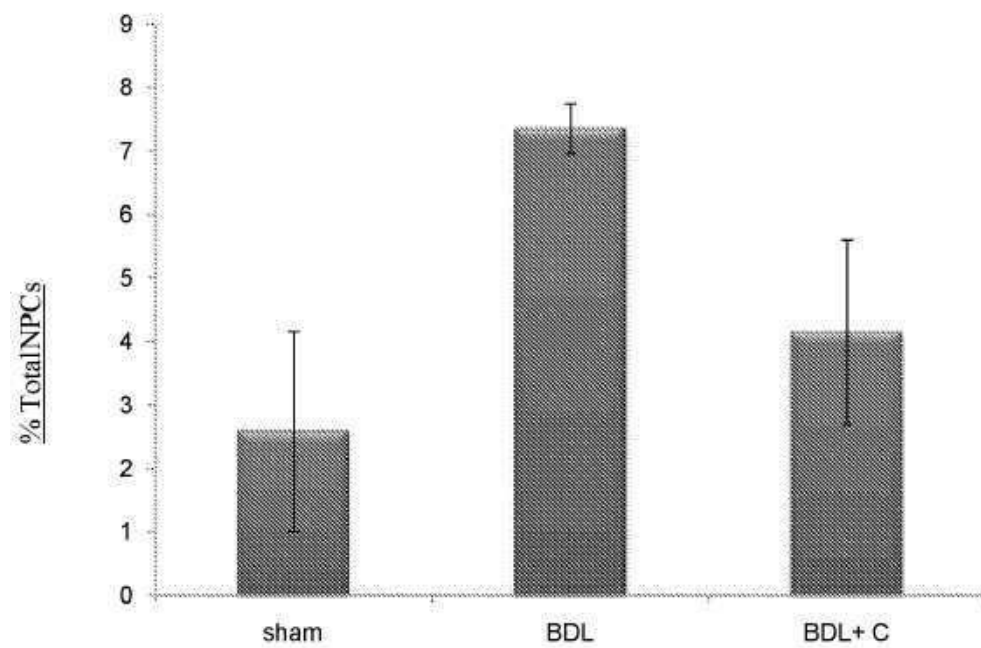
도면17



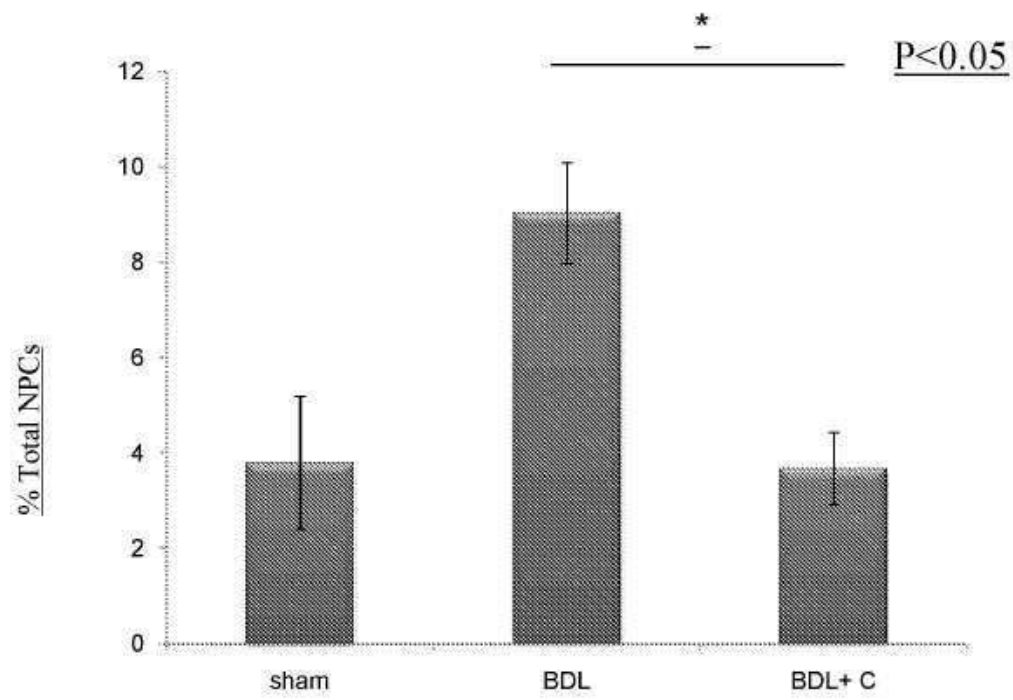
도면18



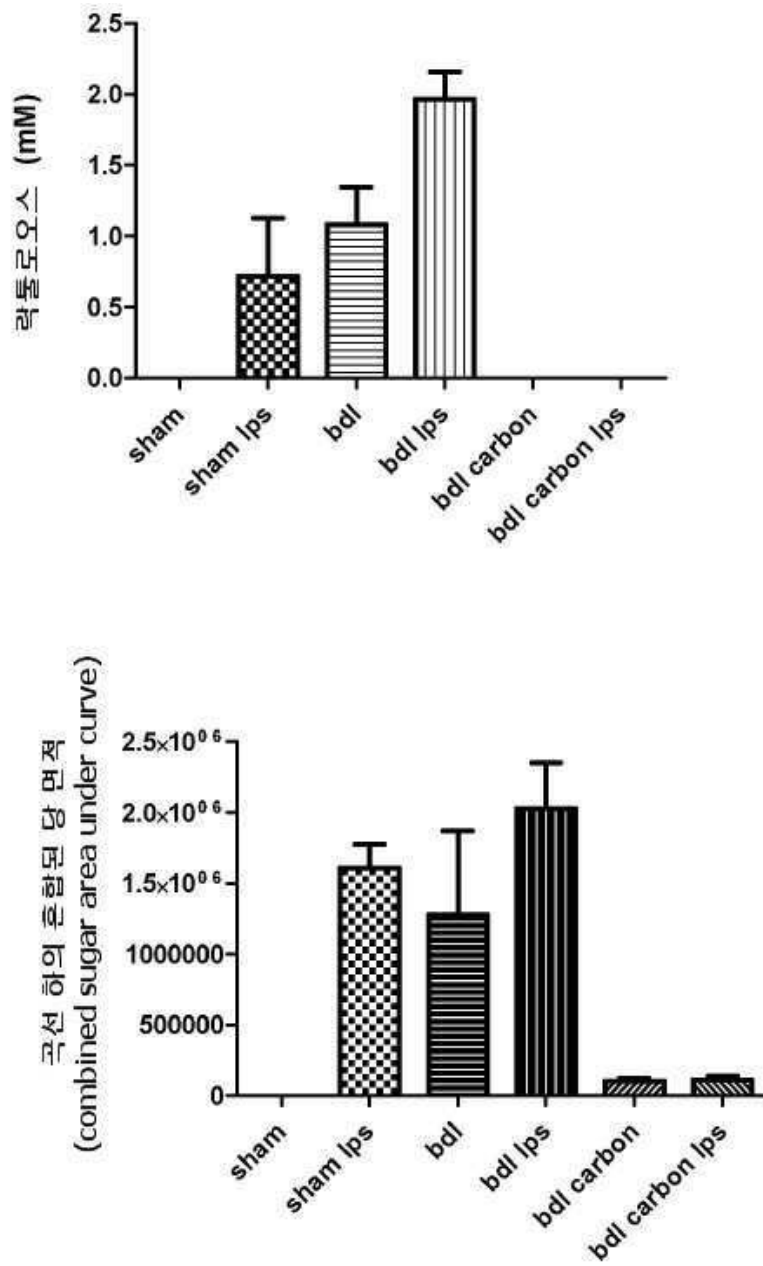
도면19



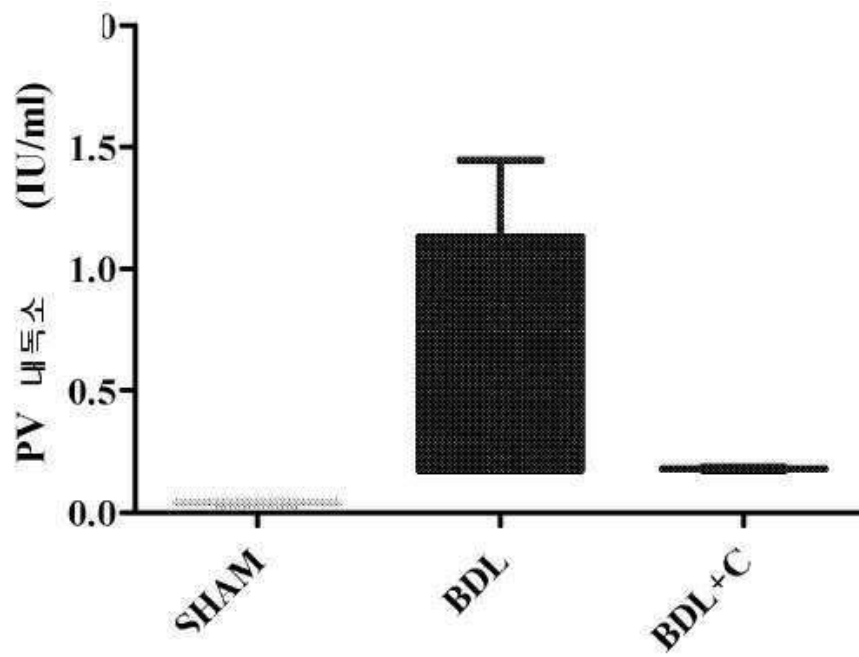
도면20



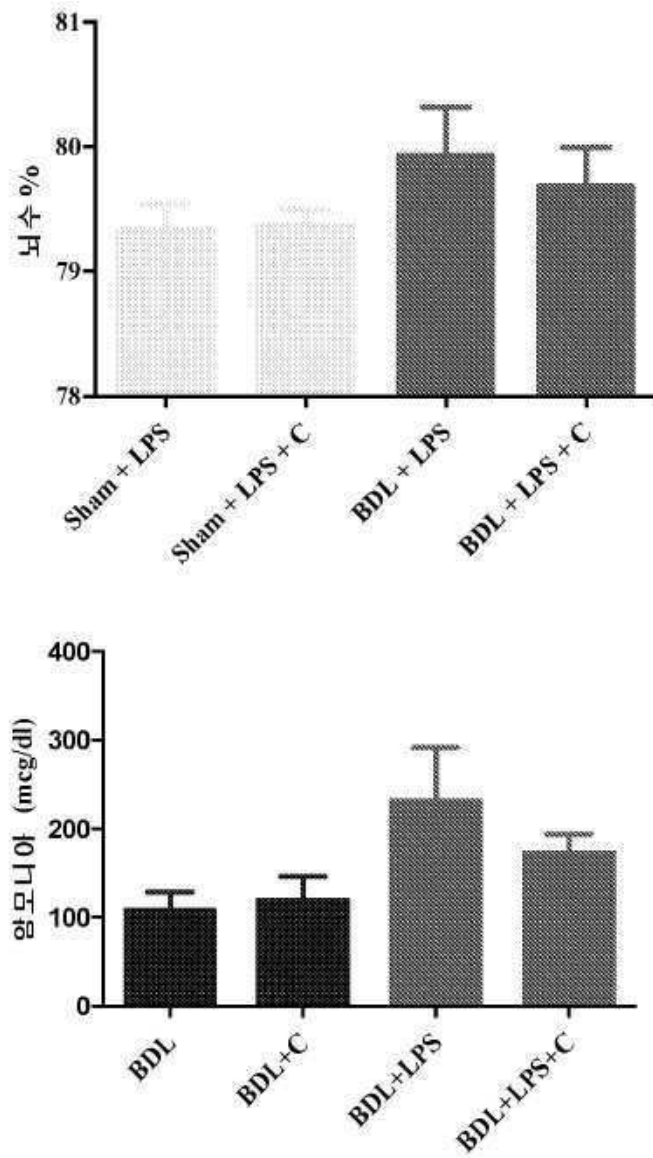
도면21



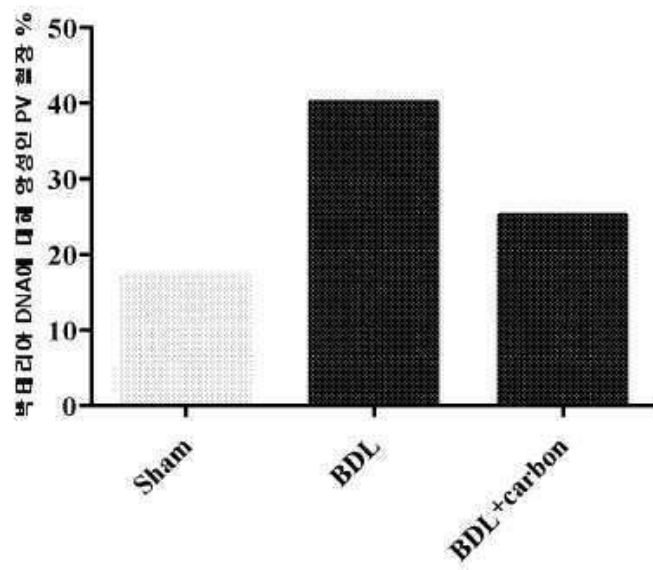
도면22



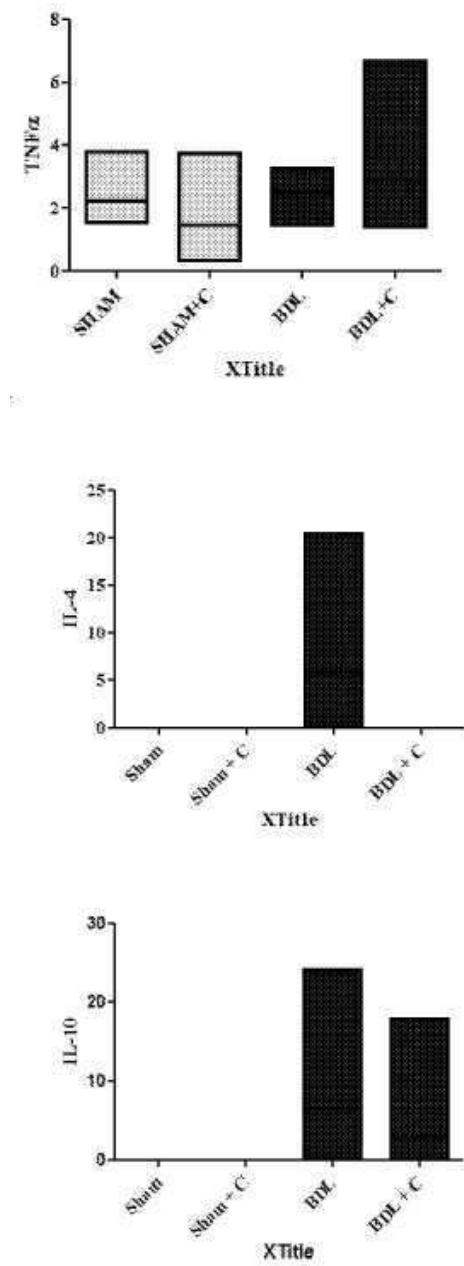
도면23



도면24

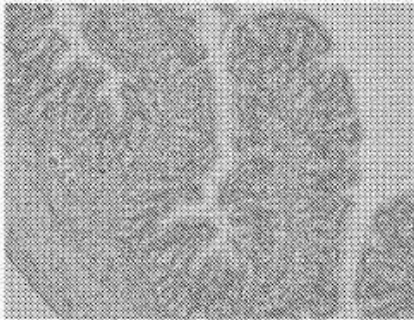


도면25



도면26

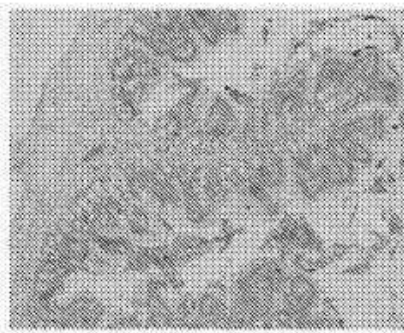
Sham



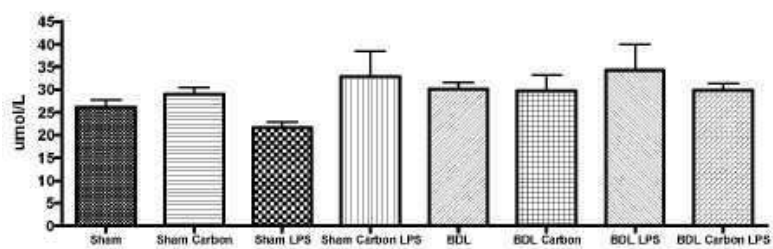
BDL



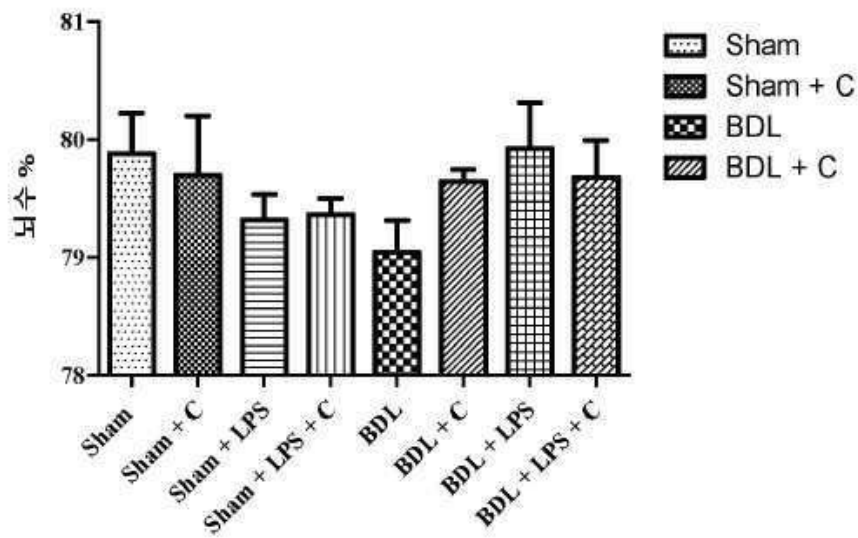
BDL+Carbon



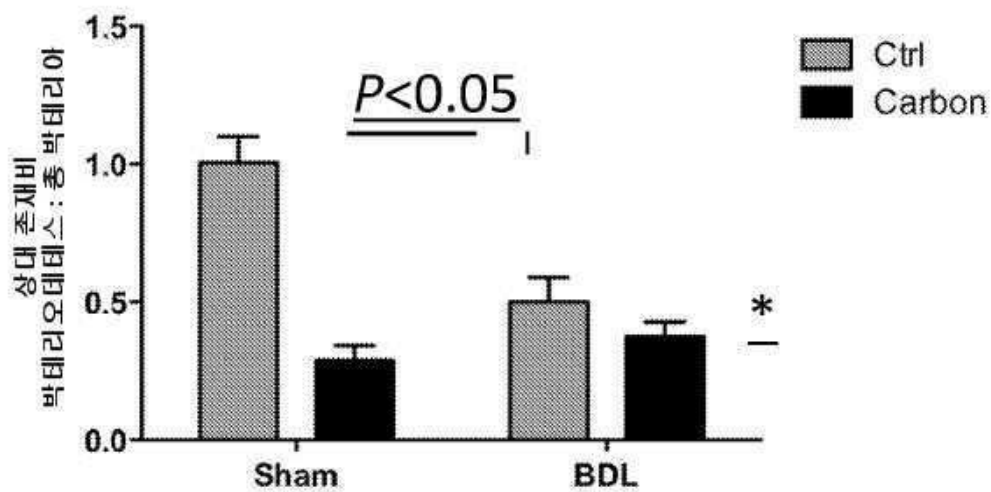
도면27



도면28

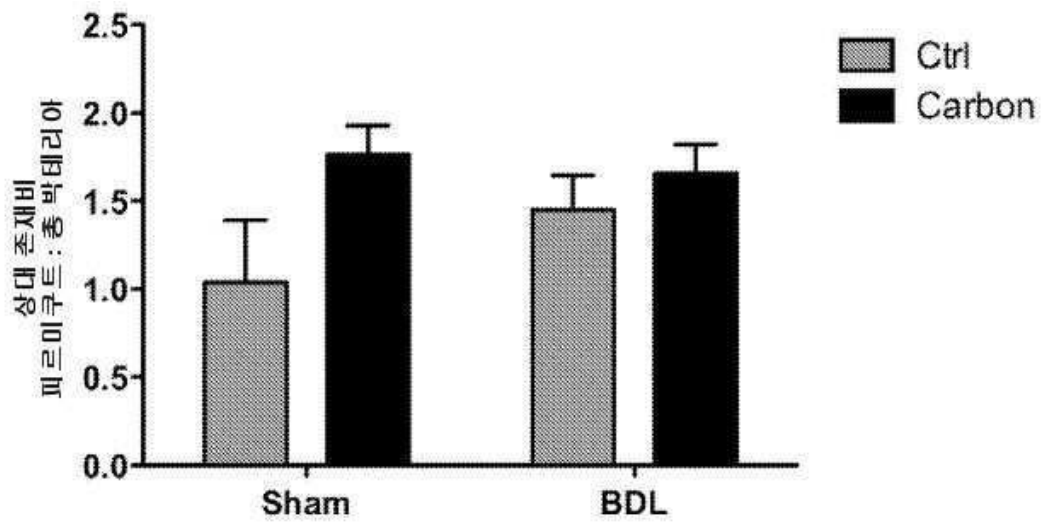


도면29

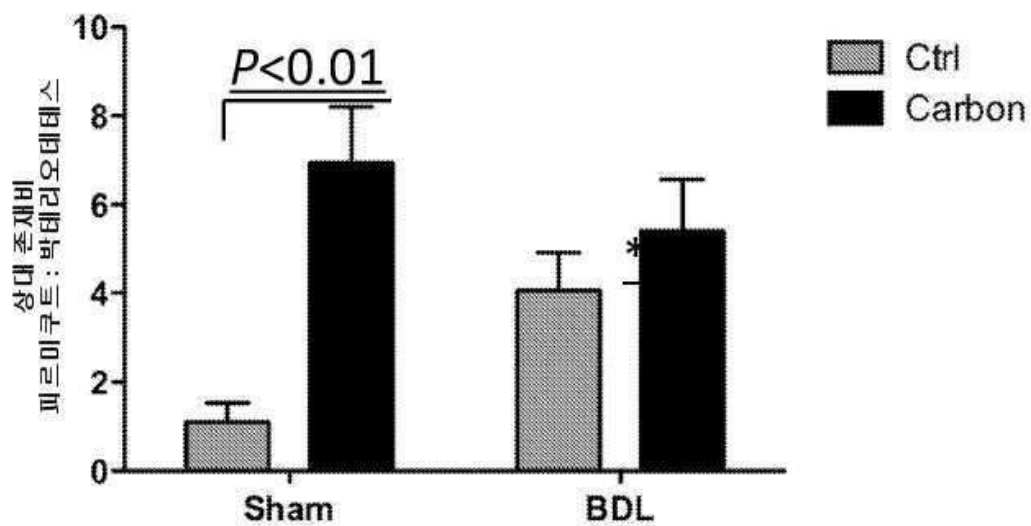


* $P < 0.05$ compared to sham

도면30

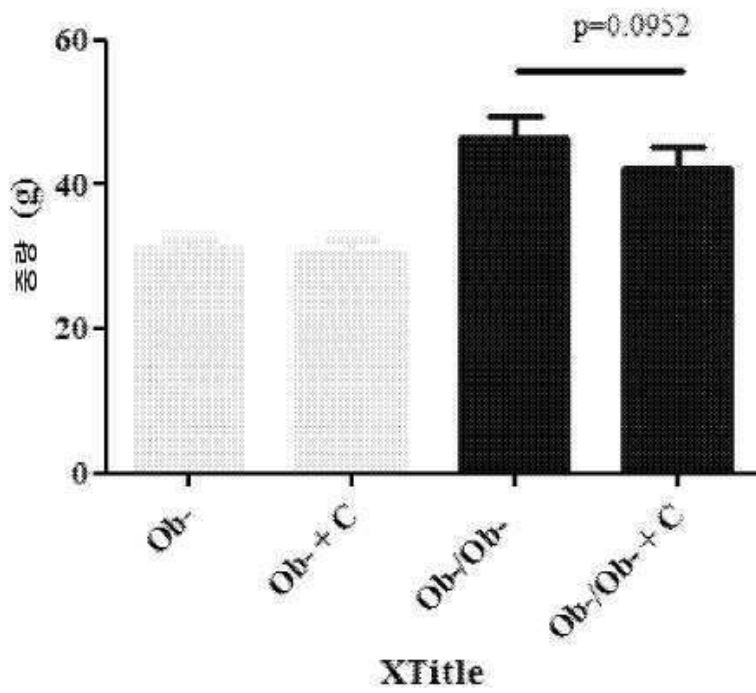


도면31

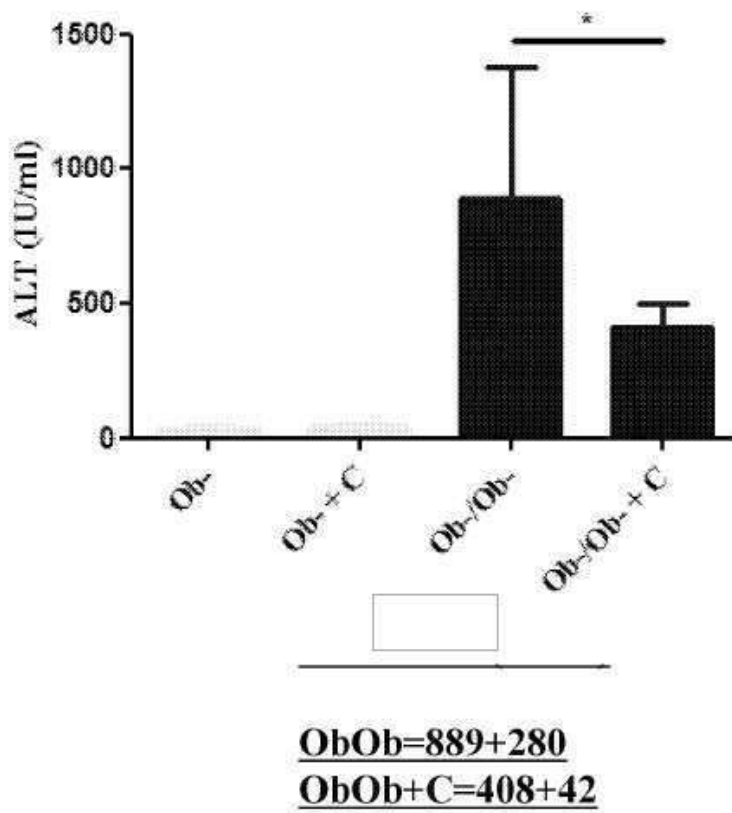


* $P < 0.05$ compared to sham

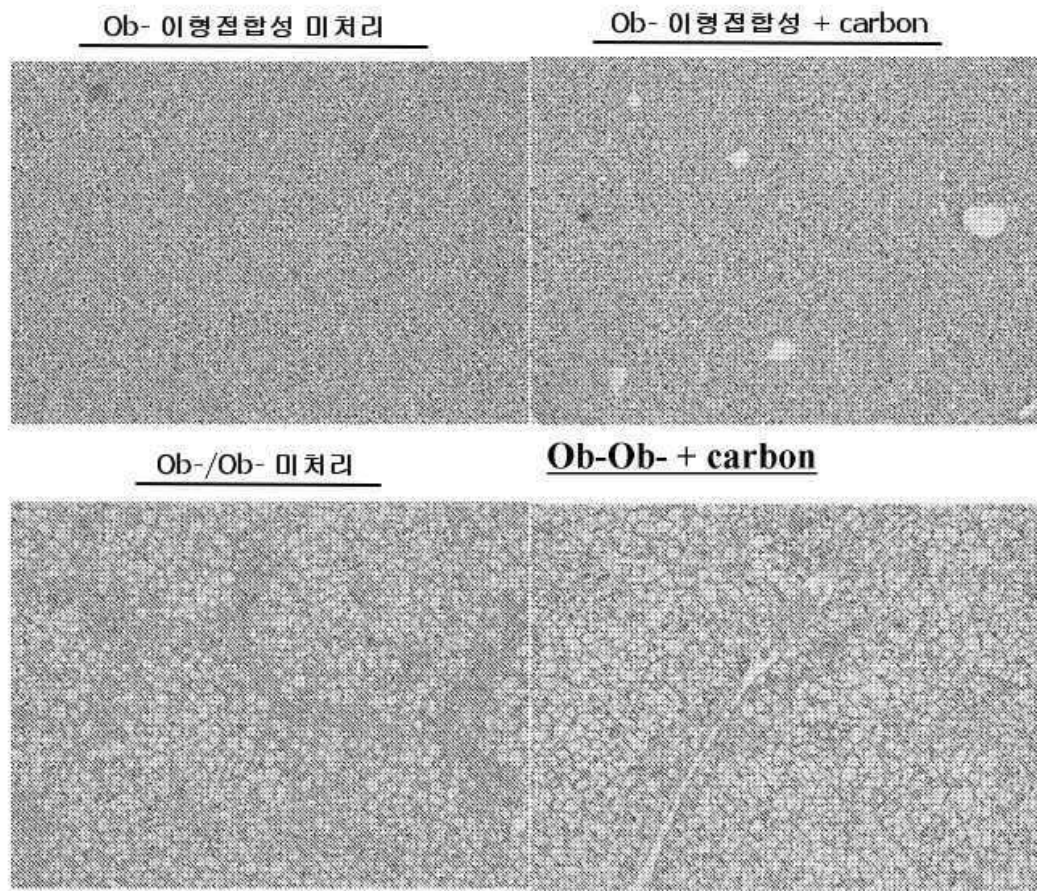
도면32



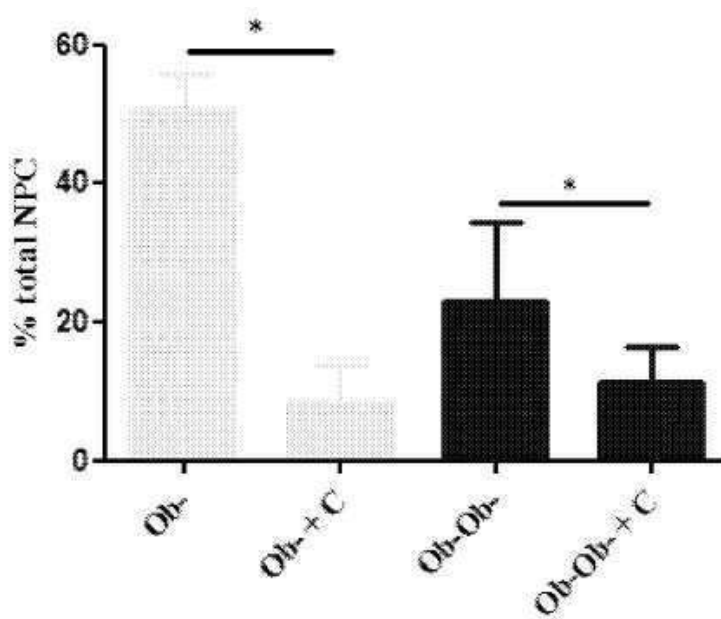
도면33



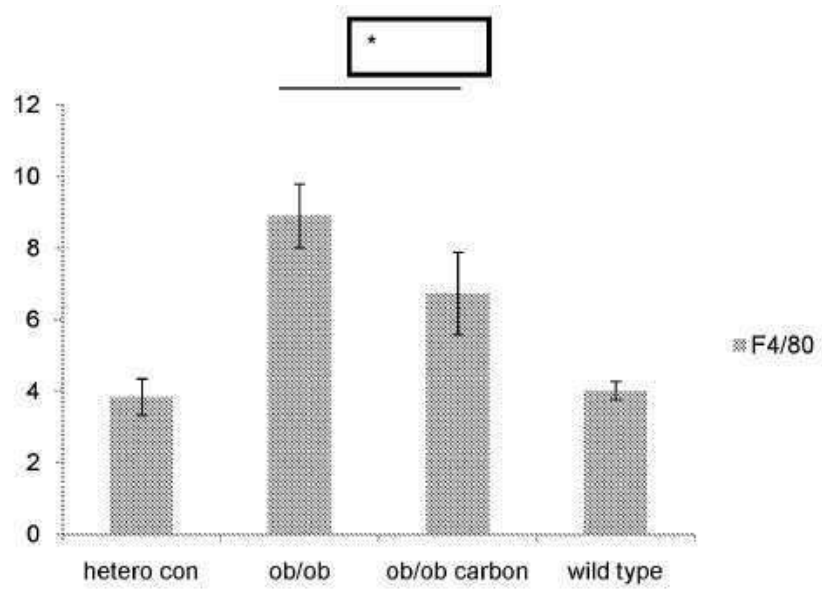
도면34



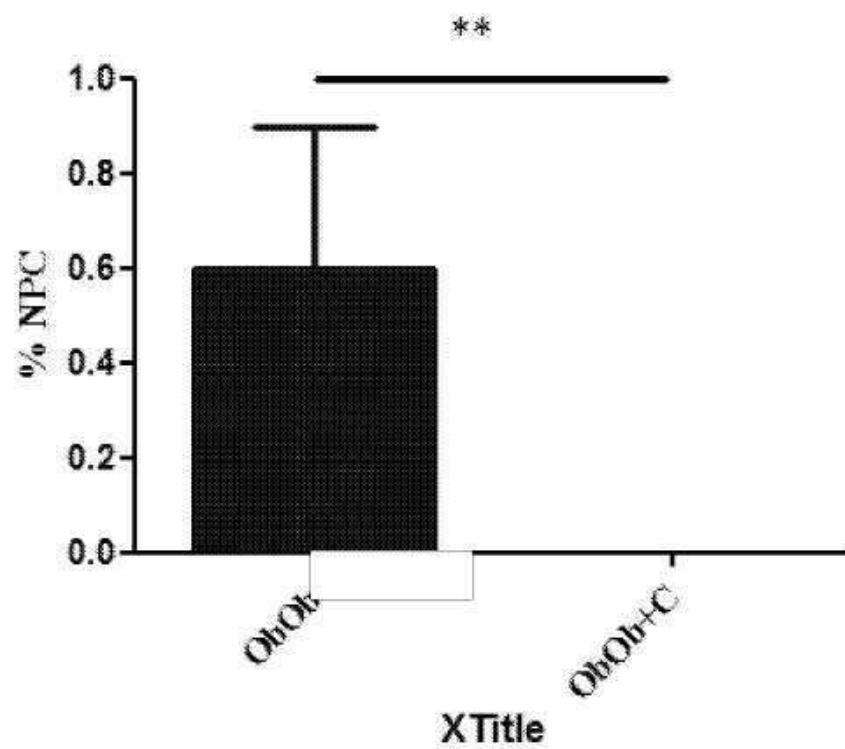
도면35



도면36

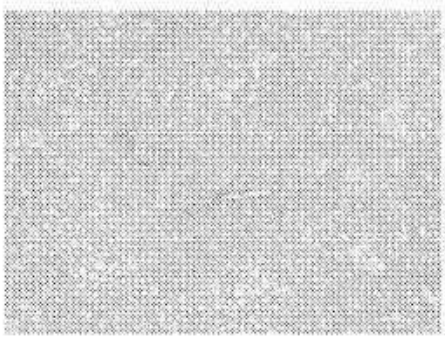


도면37

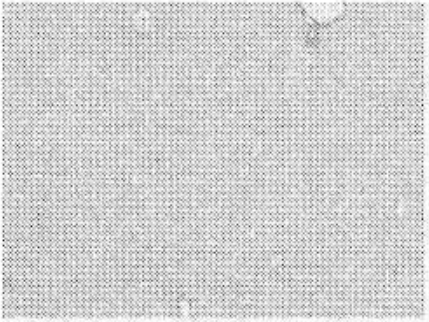


도면38

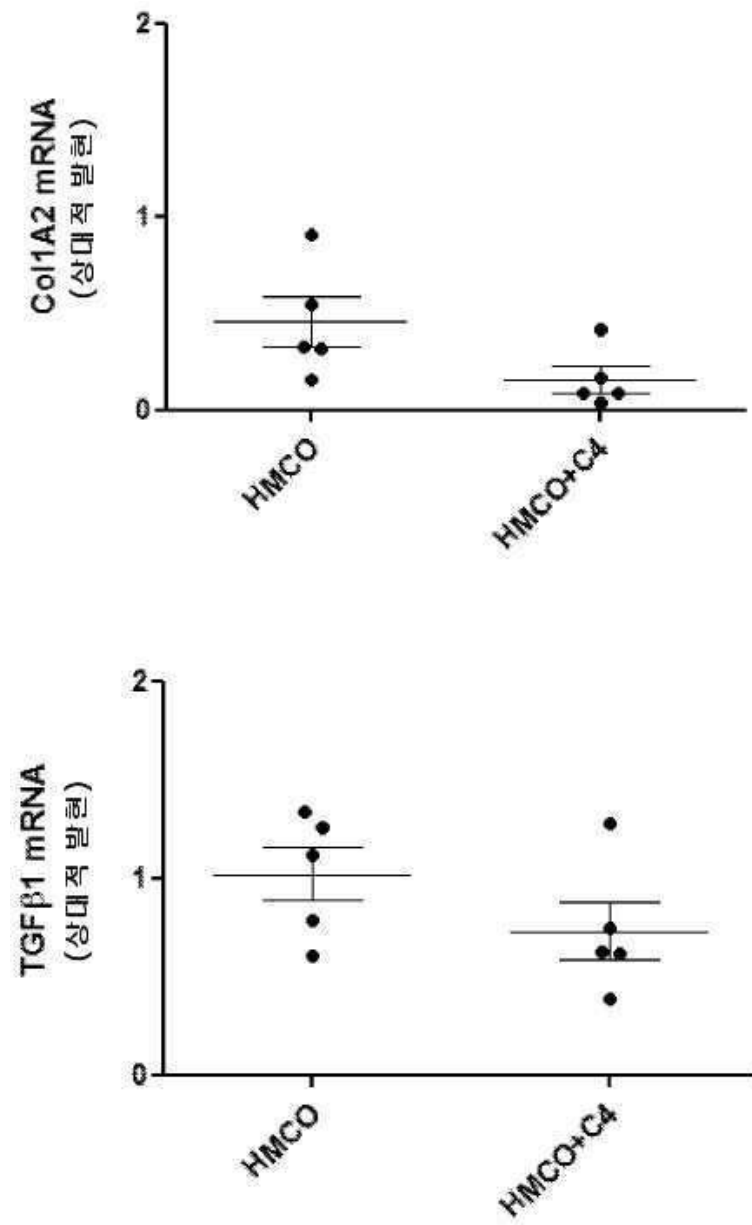
HMCD 미처리



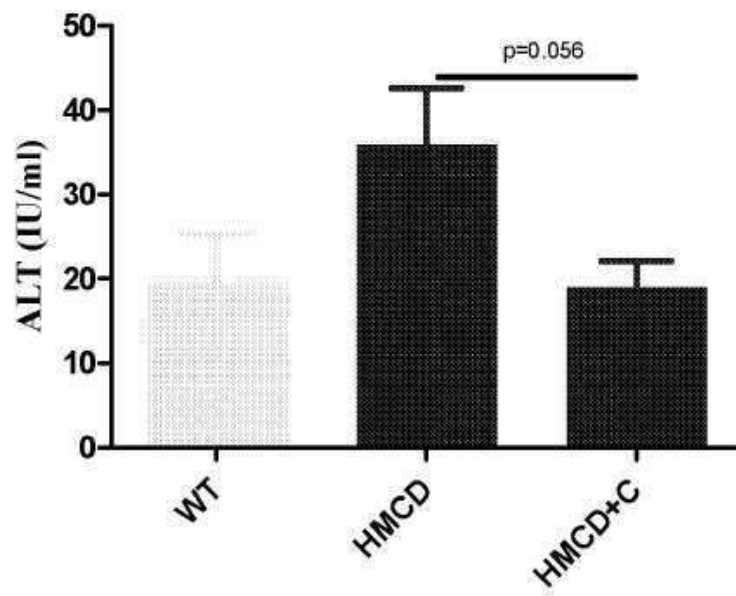
HMCD + carbon



도면39

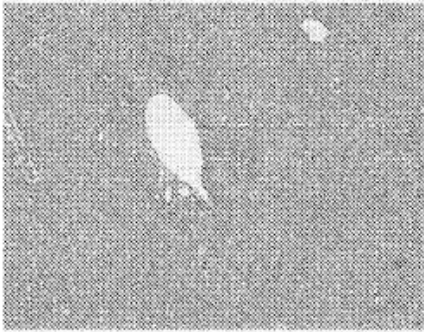


도면40

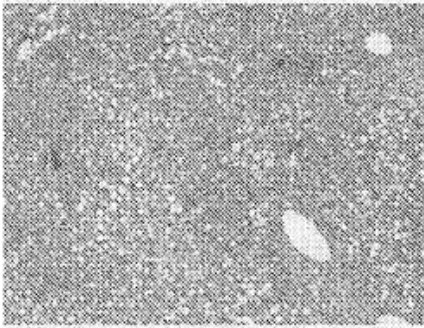


도면41

Sham



HMCD 미처리

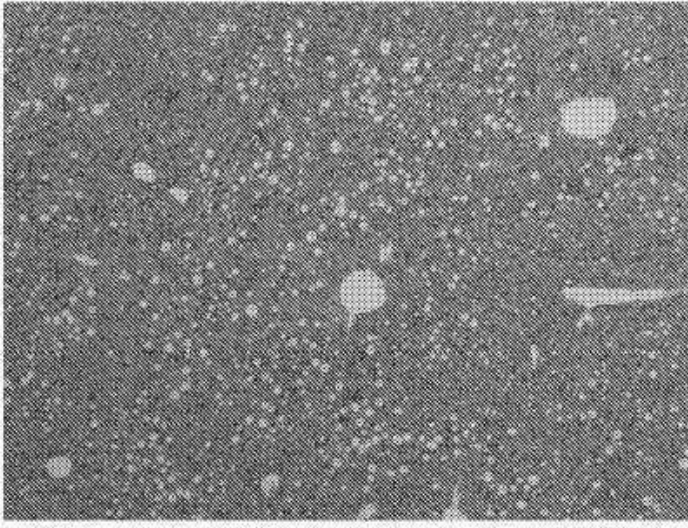


HMCD + carbon

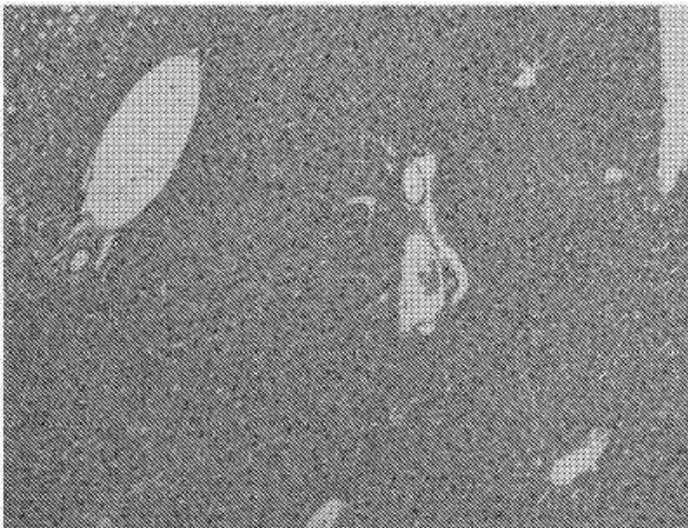


도면44

MCD 미처리

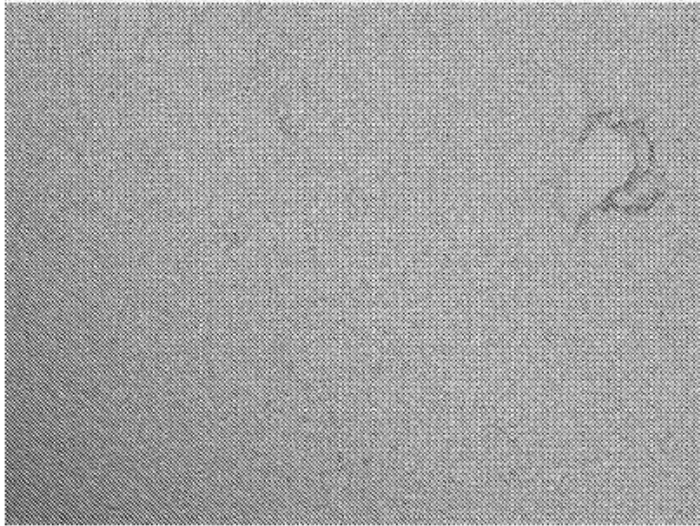


MCD + carbon



도면45

MCD 미처리



MCD + carbon

