

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0131654 (43) 공개일자 2013년12월04일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/7036 (2006.01) A61K 31/702 (2006.01) A61K 31/70 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-0055361 (22) 출원일자 2012년05월24일 심사청구일자 2012년05월24일		(71) 출원인 인하대학교 산학협력단 인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동) (72) 발명자 홍순선 인천광역시 중구 서해대로 366, 정석빌딩 1동 2층 임상연구센터 박기동 서울특별시 서초구 사임당로 130 신동아아파트 102동 701호 (뒷면에 계속) (74) 대리인 김순웅

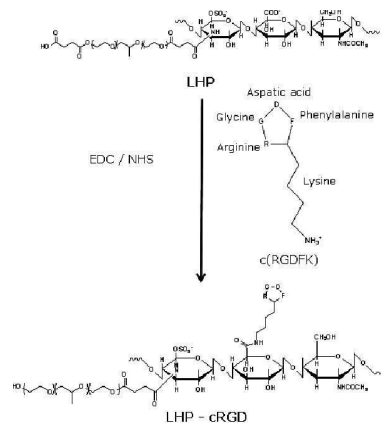
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 LHP-cRGD를 유효성분으로 포함하는 간경화 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 LHP-cRGD (low molecular weight heparin Pluronic-cRGD)를 유효성분으로 포함하는 간경화 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 LHP-cRGD는 동물모델에서 교원섬유질의 생성을 감소시키고, 섬유화 마커인 TGF- β 1 및 α -SMA의 발현을 감소시키는 효능이 우수하므로, 간경화 및 섬유화 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

정경희

인천광역시 중구 서해대로 366, 정석빌딩 1동 2층
임상연구센터

이주희

인천광역시 중구 서해대로 366, 정석빌딩 1동 2층
임상연구센터

정윤기

경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 아주대학교 서
관 108-2호 고분자생체재료연구실

최중훈

경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 아주대학교 서
관 108-2호 고분자생체재료연구실

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-0002988

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기본연구지원사업

연구과제명 간경화 간암 치료용 약물 개발 및 전임상 시험

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교 산학협력단

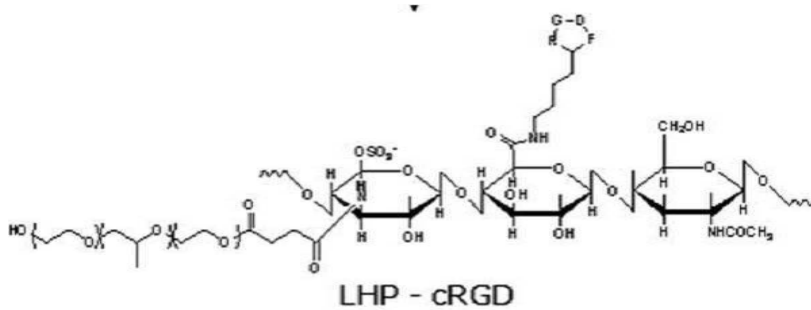
연구기간 2010.05.01 ~ 2015.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

화학식 1로 표시되는 LHP-cRGD (low molecular weight heparin Pluronic-cRGD)를 유효성분으로 포함하는 간경화 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 LHP-cRGD에서 헤파린은 평균 분자량이 3kDa 내지 8kDa인 것을 특징으로 하는, 간경화 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

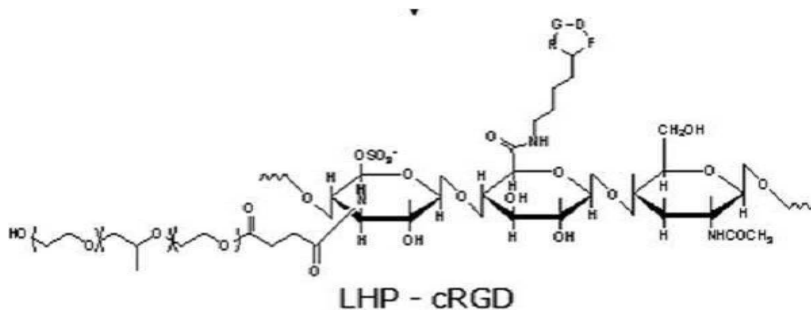
청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 LHP-cRGD에서 cRGD는 1 내지 3개가 결합되어 있는 것을 특징으로 하는, 간경화 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

화학식 1로 표시되는 LHP-cRGD를 유효성분으로 포함하는 간경화 예방 또는 개선용 식품 조성물.

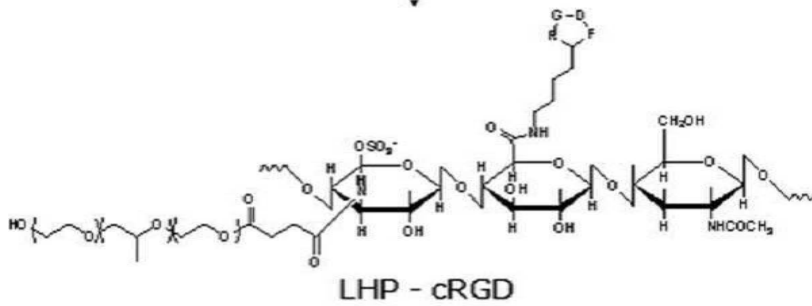
[화학식 1]



청구항 5

화학식 1로 표시되는 LHP-cRGD를 유효성분으로 포함하는 섬유화 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 LHP-cRGD에서 헤파린은 평균 분자량이 3kDa 내지 8kDa 인 것을 특징으로 하는, 섬유화 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 LHP-cRGD에서 cRGD는 1 내지 3개가 결합되어 있는 것을 특징으로 하는, 섬유화 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

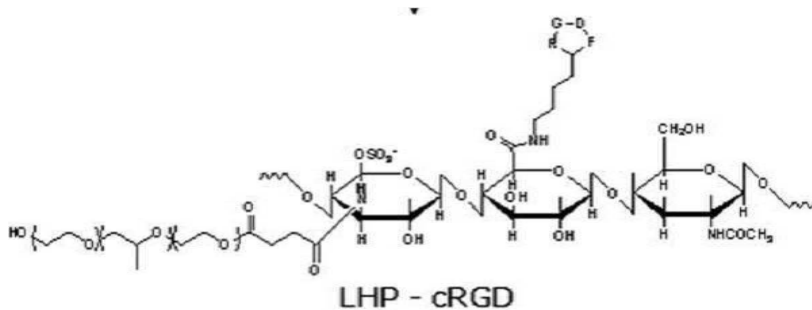
청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 섬유화 질환은 섬유화폐포염 (Fibrosing Alveolitis), 비장 섬유화 (spleen fibrosis), 켈로이드 질환 (Keloid), 골수섬유화증 (Myelofibrosis with myeloid metaplasia) 및 세뇨관간질의 섬유화 (tubulointerstitial fibrosis)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 섬유화 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

화학식 1로 표시되는 LHP-cRGD를 유효성분으로 포함하는 섬유화 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[화학식 1]



명세서

기술분야

본 발명은 LHP-cRGD (low molecular weight heparin Pluronic-cRGD)를 유효성분으로 포함하는 간경화 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

[0002] 만성 간질환은 국내에서 중요한 성인병 및 사망 원인 중의 하나이다. 특히, 간암에 의한 사망률은 세계 1위를 차지하고 있으며, 만성 간질환은 미국 내 사망원인의 5위에 해당된다. 간질환에 의한 사망 원인은 대개 간경변(liver cirrhosis)이 진행된 후에 발생하는 합병증이며, 간암 환자의 80%는 간경변 상태이므로, 만성 간염에서 간경변으로의 진행을 막는 것이 만성 간질환 해결의 가장 중요한 목표이며 숙제라고 할 수 있다. 최근 보고에 따르면 40-50대 중년 남자가 간경변증으로 인해 사망하는 비율이 진단 후 2년에는 사망률 50%, 5년에는 사망률 65%로 증가하는 추세에 있다고 알려졌다. 그러나 국내에서 간세포암종과 간염에 대한 연구는 비교적 활발하게 진행되고 있으나, 간경변에 대한 연구는 간경변의 원인과 합병증에 관한 연구가 대부분이고, 간경변 자체의 치료에 관한 연구는 매우 제한적인 실정이다. 최근까지도 간경변은 치료될 수 없는 병으로 인식되어 왔으나 최근 15년 동안 과도한 섬유생성(fibrogenesis)이 특징인 간경변의 병태생리가 분자 수준까지 밝혀짐에 따라, 간경변은 불가역적(irreversible)인 질병이라는 생각에서 섬유생성의 억제 또는 용해 촉진에 의해 가역적(reversible)일 수 있는 질병으로 개념이 변화되고 있다. 간경변의 진행과정 중 초기의 가역적인 시기를 간섬유증(hepatic fibrosis)으로, 불가역적인 시기를 간경변증으로 인위적인 구분을 할 수 있는데, 가역성을 결정하는 요인이 무엇인지, 또 어떤 지표로 가역적인 시기와 불가역적인 시점(point of noreturn)을 알 수 있는 것인지에 대해서는 아직 알려져 있지 않다. 그러나 간섬유증과 간경변 모두 간에서 세포외기질(extracellular matrix)이 병적으로 증가하는 상태라는 점에서는 같다.

[0003] 한편, 헤파린(heparin)은 설페이트화된 선형의 다당류(polysaccharide)로 이루어져 있으며, 주로 요산(uric acid)으로 구성되어 있다. 헤파린은 다양한 구조의 혼합체로써 항혈전성, 염증억제, 신혈관 형성 암 성장 억제 및 면역억제 등의 다양한 성질을 가지고 있다. 그러나 표준형 헤파린은 상당량이 체내에서 혈장 단백질, 내피세포 및 탐식 세포 등과 결합하여 생체이용률이 떨어지고, 반감기가 짧아 지속적인 항응고 활성도 감시와 투여용량의 조절이 필요하고, 그 효과도 낮아 장기간 사용하기엔 많은 제한점이 있다. 이러한 한계를 극복하고자 표준형 헤파린에서 유도된 저분자량 헤파린(low molecular weight heparin: LH)이 개발되었으며, 이는 생체이용률이 높아 하루에 한, 두 번의 피하주사 혹은 정맥투여로도 적절한 혈중농도를 유지할 수 있어 사용하기에 편리하고 혈중 활성도를 미리 예측할 수 있어 외래에서 항응고 활성도 감시와 용량 조절 없이도 사용할 수 있어 장기적인 항응고요법이 용이하게 되었다. 최근 외국에서 대단위 다기관 공동연구로 행해진 연구들에서 저분자량 헤파린은 표준형 헤파린에 비해 anti-Xa 활성도와 anti-coagulant 효과 측면에서 그 우수함과 유용도가 증명되었다. 그러나 저분자량 헤파린(LH)도 장기간 사용시 출혈 및 혈소판 감소증, 골다공증과 같은 부작용에서 벗어날 수 없어 임상적용에는 한계가 있음이 밝혀졌다. 따라서 저분자 및 고분자 화합물을 화학적 또는 물리적으로 결합하는 방법을 이용하여 부작용이 적으면서 효능은 높은 약물전달체, 신규혈관 형성 및 암 성장 억제효능을 갖는 헤파린 유도체들(예: LH-deoxycholic acid (DOCA), LH-taurocholate)을 개발하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0004] 이에 본 발명자들은 기존의 헤파린 유도체의 한계점을 극복하고, 간경화 치료 효과가 높으며, 부작용이 적은 새로운 약물을 개발하기 위해 연구를 수행한 결과, LHP-cRGD(low molecular weight heparin Pluronic-cRGD)이 우수한 간섬유화 억제 효과가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 국내특허출원번호 : 10-2007-7011189

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 LHP-cRGD(low molecular weight heparin Pluronic-cRGD)를 유효성분으로 포함하는 간경화 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 LHP-cRGD를 유효성분으로 포함하는 간경화 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는

것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 LHP-cRGD를 유효성분으로 포함하는 섬유화 질환의 예방 또는 개선용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 LHP-cRGD를 유효성분으로 포함하는 섬유화 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 LHP-cRGD를 유효성분으로 포함하는 간경화 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 또한 본 발명은 LHP-cRGD를 유효성분으로 포함하는 간경화 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0012] 또한 본 발명은 LHP-cRGD를 유효성분으로 포함하는 섬유화 질환의 예방 또는 개선용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은 LHP-cRGD를 유효성분으로 포함하는 섬유화 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 LHP-cRGD는 동물모델에서 교원섬유질의 생성을 감소시키고, 섬유화 마커인 TGF- β 1 및 α -SMA의 발현을 감소시키는 효능이 우수하므로, 간경화 및 섬유화 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명의 LHP-cRGD의 제조과정을 나타낸 도이다.

도 2는 간경화 동물모델에서 본 발명의 LHP-cRGD가 체중 증가에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 3은 간경화 동물모델에서 본 발명의 LHP-cRGD가 간 무게에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 4는 간경화 동물모델에서 본 발명의 LHP-cRGD가 혈중 AST 농도에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 5는 간경화 동물모델에서 본 발명의 LHP-cRGD가 혈중 ALT 농도에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 6은 간경화 동물모델에서 본 발명의 LHP-cRGD가 간의 교원섬유질 생성에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 7은 간경화 동물모델에서 본 발명의 LHP-cRGD가 섬유화 마커의 발현에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

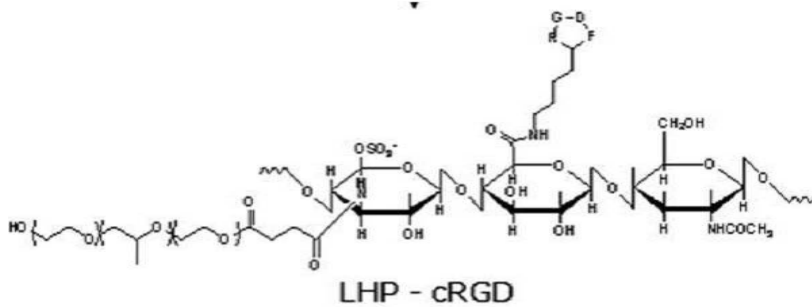
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명은 화학식 1로 표시되는 LHP-cRGD (low molecular weight heparin Pluronic-cRGD)를 유효성분으로 포함하는 간경화 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0017] 또한 본 발명은 화학식 1로 표시되는 LHP-cRGD를 유효성분으로 포함하는 섬유화 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0018] 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 식품 조성물을 포함한다.

화학식 1



[0019]

[0020]

이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0021]

본 발명의 LHP-cRGD는 하기와 같은 방법으로 수득될 수 있다.

[0022]

1차적으로 헤파린의 활성을 높이기 위하여, 저분자 헤파린에 플루로닉이 결합된 저분자 헤파린 유도체를 제조하고, 2차적으로 유전자 또는 약물의 운반에 사용되는 고밀도 인테그린인 cRGD (cyclic RGD) 펩타이드를 결합시켜 LHP-cRGD (low molecular weight heparin Pluronic-cRGD)를 제조한다.

[0023]

본 발명의 바람직한 일실시예에서는, 무수물 숙신산을 이용하여 카르복실화한 플루로닉 (Pluronic F127, 평균 분자량 12600 Da)의 카르복실산 잔기와 저분자 헤파린(low molecular weight heparin, LMWH, LH, 평균 분자량 4.5 kDa)을 결합한 후, 잔여 기능기에 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 (EDC)와 N-하이드록시숙신이미드를 사용하여 cRGD에 아민기가 도입된 cRGDfK (분자량 603.68)를 결합하여 최종적으로 LHP-cRGD를 제조한다. 상기 LHP-cRGD는 수용액 내 임계 마이셀 농도 및 특정 온도 이상의 조건에서 자가조립되어 나노입자를 형성함을 특징으로 한다. 상기 cRGD (cyclic RGDfK)는 (cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys))로 구성되어 있으며, 표적기관으로의 운반에 관여한다. 본 발명에 따른 LHP-cRGD의 제조 시 cRGD는 1개 이상 결합할 수 있으며, 바람직하게는 1개 내지 3 개를 결합시킬 수 있다.

[0024]

본 발명에 따른 LHP-cRGD는 동물모델에서 체중 증가 및 간 무게의 증가 현상을 방지하고, 혈중 AST 및 ALT의 농도 증가를 감소시키며, 간 조직의 교원섬유질의 생성을 감소시키고, 섬유화 마커인 TGF- β 1 및 α -SMA의 발현을 감소시키는 효과가 우수하다.

[0025]

상기한 바와 같이, 본 발명에 따른 LHP-cRGD는 간섬유화의 억제 효과가 우수하므로, 간경화 및 섬유화 질환의 예방 또는 치료에 유용한 의약품 또는 건강기능식품으로 사용될 수 있다.

[0026]

상기 섬유화 질환은 이에 제한되지 않으나, 섬유화폐포염 (Fibrosing Alveolitis), 비장 섬유화 (spleen fibrosis), 켈로이드 질환 (Keloid), 골수섬유화증 (Myelofibrosis with myeloid metaplasia), 세뇨관간질의 섬유화 (tubulointerstitial fibrosis)등이 포함된다

[0027]

본 발명의 조성물은 LHP-cRGD와 함께 간경화 및 섬유화 질환의 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.

[0028]

본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium

carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0029] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0030] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 LHP-cRGD는 1일 100 내지 10000 IU/kg 양으로 투여할 수 있다. 상기 조성물의 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0031] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 조성물은 간경화 및 섬유화 질환의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0033] 본 발명에서, '건강기능식품'이란 질병의 예방 및 개선, 생체방어, 면역, 병후의 회복, 노화 억제 등 생체조절 기능을 가지는 식품을 말하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해하여야 한다.
- [0034] 본 발명의 조성물은 간경화 및 섬유화 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있다. 본 발명의 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15중량 % 이하, 바람직하게는 10 중량 % 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0035] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0036] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g 이다.
- [0037] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0038] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예, 실험예 및 제조예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예, 실

험에 및 제조에는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0039] 실시예 1: LHP-cRGD의 제조

[0040] 헤파린의 활성을 높이기 위하여, 저분자 헤파린에 플루로닉이 결합된 저분자 헤파린 유도체를 제조하고, 이에 고밀도 인테그린인 cRGD (cyclic RGD) 펩타이드를 결합시켜 LHP-cRGD (low molecular weight heparin Pluronic-cRGD)를 제조하였다. 보다 구체적으로는, 무수물 숙신산을 이용하여 카르복실화한 플루로닉 (Pluronic F127, 평균 분자량 12600 Da, BASF KORE에서 구입)의 카르복실산 잔기와 저분자량 헤파린 (low molecular weight heparin, LH, 평균 분자량 4.5 kDa, 메디프렉스 제공)을 결합한 후, 잔여 기능기에 1-에틸-3-(3-디메틸 아미노프로필)-카르보디이미드 (EDC)와 N-하이드록시숙신이미드를 사용하여 cRGD에 아민기가 도입된 cRGDfK (분자량 603.68, Pepton Inc., Daejon, Korea)를 결합하였다. 상기 결합체는 수용액 내 임계 마이셀 농도 및 특정 온도 이상의 조건에서 자가조립되어 나노입자를 형성함을 특징으로 한다. LHP-cRGD의 제조 과정을 도 1에 나타내었다.

[0041] 실험예 1. 간경화 동물 모델에서 LHP-cRGD가 체중 및 간 무게에 미치는 영향 검증

[0042] 실시예 1에서 제조한 LHP-cRGD의 간경화 동물모델에서의 치료 효과를 확인하기 위해 SD (Rague-Dawley) 랫트를 동물 모델로 이용하여 실험을 수행하였다. SD 랫트는 고휘사료와 물을 자유롭게 섭취시키고, 25℃ 12시간 밤 낮 구분이 되는 시설에서 사육하였다. 총 40마리의 SD 랫트를 임의적으로 10마리씩 총 4그룹으로 나누었으며, 대조군(control)은 식염수를 복강 주사하고, 나머지 세 그룹은 DMN (dimethylnitrosamine) 10 µl/kg을 주 3회, 총 4주 동안 복강 주사하여 간경화를 유도하였다. 간경화 유도 그룹 중 양성대조군은 LHP를, 실험군은 실시예 1의 LHP-cRGD를 각각 1,000 IU/kg 용량으로 주 5회 복강 투여하였다. 실험 종료 후 각 랫트의 체중을 측정하고, 간을 적출하여 무게를 측정하였다. 그 결과를 각각 도 2 및 도 3에 나타내었다.

[0043] 도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, DMN으로 유도된 간경화 모델에서는 대조군에 비해 체중 및 간 무게가 유의적으로 감소하였고, 체중과 간 무게의 상대적 비율도 감소하였다. 그러나 DMN으로 유도된 간경화 모델에 LHP-cRGD를 투여한 군에서는 체중 및 간 무게의 감소는 유의적으로 줄어들었으며, LHP를 투여한 군에 비해서도 체중 및 간 무게가 더 증가되는 현상을 확인하였다 (* P < 0.05).

[0044] 실험예 2. 간경화 동물 모델에서 LHP-cRGD가 ALT와 AST 농도에 미치는 영향 검증

[0045] 상기 실험예 1의 실험 동물로부터 혈청을 분리하여, 혈청 내 질환 관련 효소인 ALT(alanine aminotransferase) 및 AST(aspartate aminotransferase)의 수치를 측정하였다. 그 결과를 도 4 및 도 5에 각각 나타내었다.

[0046] 도 4 및 도 5에 나타난 바와 같이, DMN으로 유도된 간경화 모델에서는 대조군에 비해 ALT와 AST 수치가 3-4배 이상 증가되었으나, DMN으로 유도된 간경화 모델에 LHP-cRGD를 투여한 군에서는 ALT와 AST 수치가 유의하게 감소되는 것을 확인하였다 (* P < 0.05, ** P<0.01).

[0047] 실험예 3. 간경화 동물 모델에서 LHP-cRGD가 교원섬유질에 미치는 영향 검증

[0048] 상기 실험예 1의 실험 동물로부터 간 조직을 분리한 후, 4µm 두께의 간 절편을 제작하였다. 간조직 내 콜라겐(collagen) 검사를 위해 MT 염색 (masson's trichrome staining)을 수행하였다. 파란색으로 염색되는 부분이 교원섬유의 양을 의미한다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0049] 도 6에 나타난 바와 같이, DMN으로 유도된 간경화 모델에서는 대조군에 비해 교원섬유질 (파란색)의 발현이 증가되어 있었으나, DMN으로 유도된 간경화 모델에 LHP-cRGD를 투여한 군에서는 교원섬유질의 발현이 감소되는 것을 확인하였다. 특히, 실시예 1의 LHP-cRGD를 투여한 군에서는 LHP를 투여한 군에 비해 더욱 우수한 효과를 나타내었으며, 이를 통해 LHP-cRGD의 우수한 간경화 치료 효능을 확인하였다.

[0050] **실험예 4. 간경화 동물 모델에서 LHP-cRGD가 섬유화 마커 발현에 미치는 영향 검증**

[0051] 상기 실험예 1의 실험 동물로부터 간 조직을 분리한 후, 전체 RNA를 Trizol reagent를 이용하여 분리하였다. 동량의 RNA를 MMuLV 역전사효소(reverse transcriptase)로 역전사(reverse transcription)시켜 cDNA를 제작한 후, Taq DNA 중합효소(polymerase)를 이용하여 증폭시켰다. 이 후, 섬유화발현 마커인 TGF- β 1, α -SMA에 대한 프라이머를 이용하여 PCR을 통해 mRNA 발현량을 확인하였다. PCR은 변성 (denaturation) 5분 95℃, 풀림 (annealing) 1분 55℃, 신장 (extension) 1분 72℃ 조건으로 32 사이클 수행하였으며, 2% 아가로스 겔에 전기영동하여 증폭된 PCR 결과물을 확인하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0052] 도 7에 나타난 바와 같이, DMN으로 유도된 간경화 모델에서는 대조군에 비해 섬유화발현 마커인 TGF- β 1 및 α -SMA의 mRNA 발현이 증가하였으며, DMN으로 유도된 간경화 모델에 LHP-cRGD를 투여한 군에서는 α -SMA와 TGF- β 1 mRNA 발현이 감소함을 확인하였다. 특히, 실시예 1의 LHP-cRGD를 투여한 군에서는 LHP를 투여한 군에 비해 더욱 우수한 효과를 나타내었다.

[0053] 이하 본 발명의 상기 조성물을 포함하는 약학적 조성물 및 건강기능식품의 제제예를 설명하나, 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0054] **제제예 1. 약학적 조성물의 제조**

[0055] **1-1. 산제의 제조**

[0056] LHP-cRGD 20 mg
 [0057] 유당 100 mg
 [0058] 탈크 10 mg
 [0059] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0060] **1-2. 정제의 제조**

[0061] LHP-cRGD 10 mg
 [0062] 옥수수전분 100 mg
 [0063] 유당 100 mg
 [0064] 스테아린산 마그네슘 2 mg
 [0065] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0066] **1-3. 캡슐제의 제조**

[0067] LHP-cRGD 10 mg
 [0068] 결정성 셀룰로오스 3 mg
 [0069] 락토오스 14.8 mg
 [0070] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg
 [0071] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0072] **1-4. 주사제의 제조**

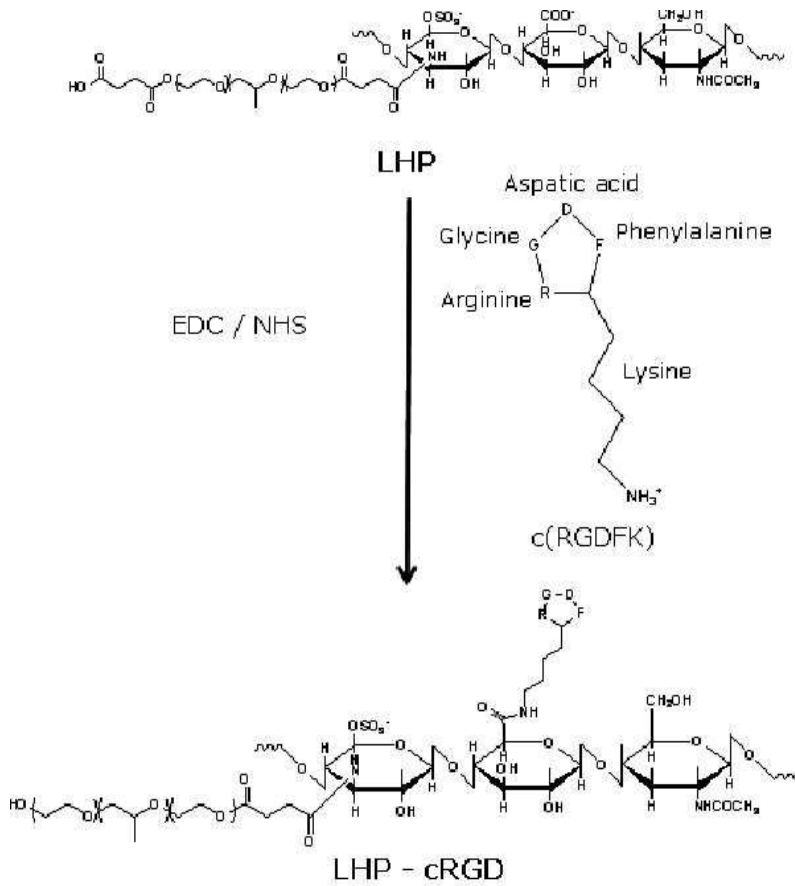
[0073] LHP-cRGD 10 mg

- [0074] 만니톨 180 mg
- [0075] 주사용 멸균 증류수 2974 mg
- [0076] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 26 mg
- [0077] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.
- [0078] **1-5. 액제의 제조**
- [0079] LHP-cRGD 20 mg
- [0080] 이성화당 10 g
- [0081] 만니톨 5 g
- [0082] 정제수 적량
- [0083] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.
- [0084] **제제예 2. 식품 조성물의 제조**
- [0085] **2-1. 건강식품의 제조**
- [0086] LHP-cRGD 100 mg
- [0087] 비타민 혼합물 적량
- [0088] 비타민 A 아세테이트 70 μg
- [0089] 비타민 E 1.0 mg
- [0090] 비타민 B1 0.13 mg
- [0091] 비타민 B2 0.15 mg
- [0092] 비타민 B6 0.5 mg
- [0093] 비타민 B12 0.2 μg
- [0094] 비타민 C 10 mg
- [0095] 비오틴 10 μg
- [0096] 니코틴산아미드 1.7 mg
- [0097] 엽산 50 μg
- [0098] 판토텐산 칼슘 0.5 mg
- [0099] 무기질 혼합물 적량
- [0100] 황산제1철 1.75 mg
- [0101] 산화아연 0.82 mg
- [0102] 탄산마그네슘 25.3 mg
- [0103] 제1인산칼륨 15 mg
- [0104] 제2인산칼슘 55 mg
- [0105] 구연산칼륨 90 mg

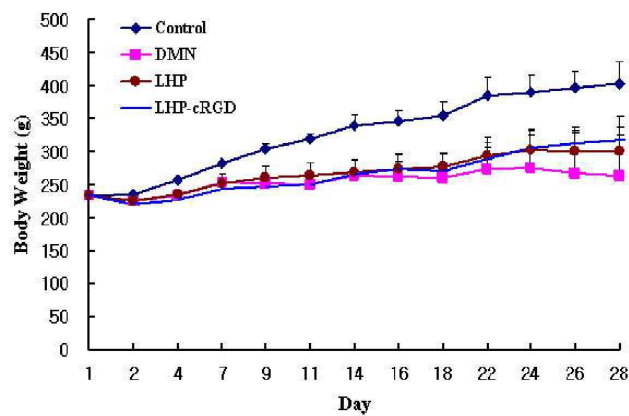
- [0106] 탄산칼슘 100 mg
- [0107] 염화마그네슘 24.8 mg
- [0108] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.
- [0109] **2-2. 건강음료의 제조**
- [0110] LHP-cRGD 100 mg
- [0111] 비타민 C 15 g
- [0112] 비타민 E(분말) 100 g
- [0113] 젖산철 19.75 g
- [0114] 산화아연 3.5 g
- [0115] 니코틴산아미드 3.5 g
- [0116] 비타민 A 0.2 g
- [0117] 비타민 B1 0.25 g
- [0118] 비타민 B2 0.3g
- [0119] 물 정량
- [0120] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85 ℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.
- [0121] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

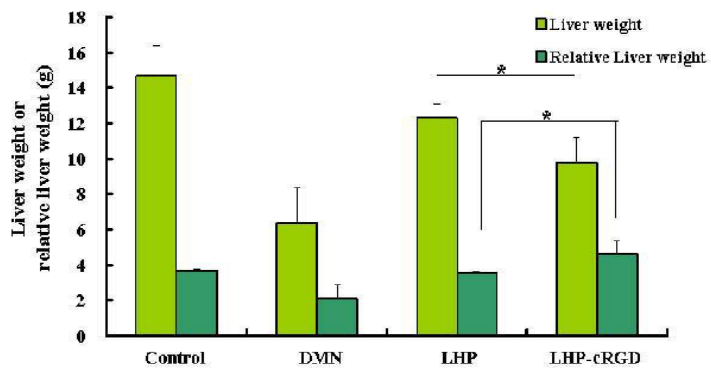
도면1



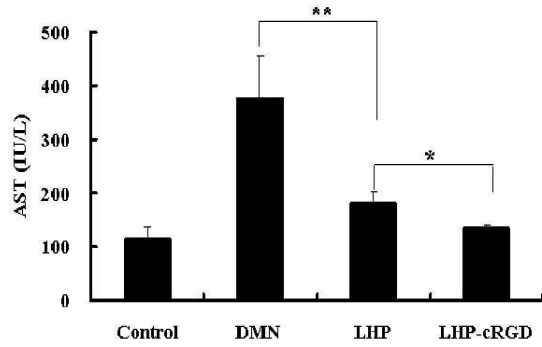
도면2



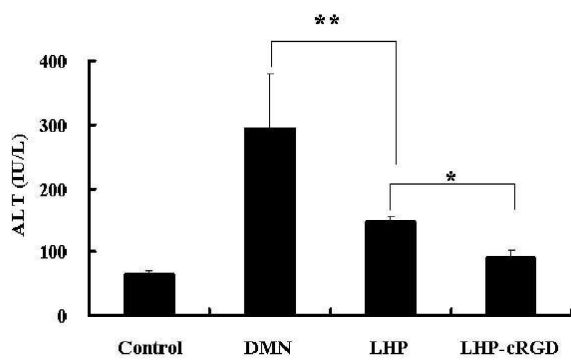
도면3



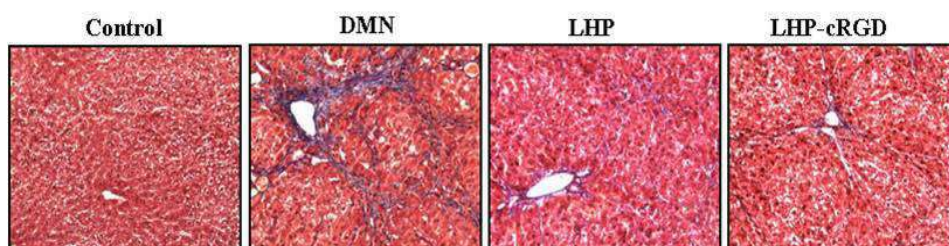
도면4



도면5



도면6



도면7

