



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0038874
(43) 공개일자 2021년04월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7032 (2006.01) A61K 31/715 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/7032 (2013.01)
A61K 31/702 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7001708
- (22) 출원일자(국제) 2019년06월28일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2021년01월19일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2019/093803
- (87) 국제공개번호 WO 2020/001640
국제공개일자 2020년01월02일
- (30) 우선권주장
201810713411.3 2018년06월29일 중국(CN)
- (71) 출원인
상하이 그린벨리 파머수티컬 주식회사
중국, 상하이 201203, 푸둥 뉴 디스트릭트, 뉴턴
로드 넘버 421
상하이 인스티튜트 오브 마테리아 메디카 차이니
즈 아카데미 오브 싸이언시즈
중국 상하이 201203 푸둥 첵지양 주창치 로드 555
- (72) 발명자
장, 메이유
중국, 상하이 201203, 푸둥 뉴 에어리어, 장 지양
하이-테크 파크, 뉴턴 로드 421
신, 시안리양
중국, 상하이 201203, 푸둥 뉴 에어리어, 장 지양
하이-테크 파크, 뉴턴 로드 421
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
황이남

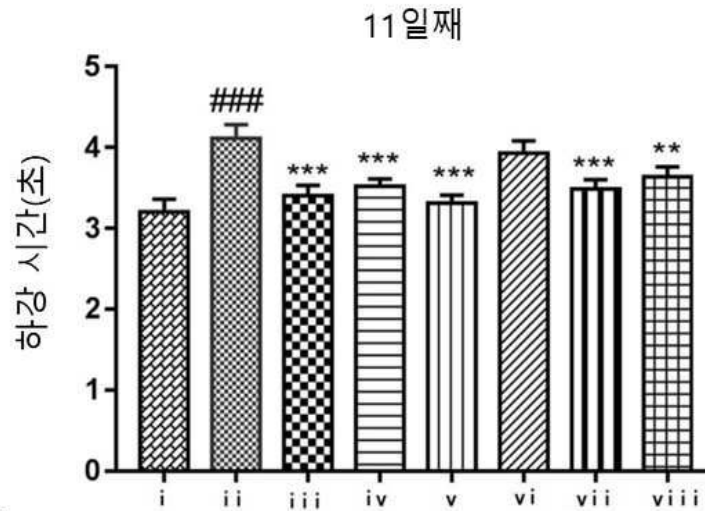
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 파킨슨 병 치료에서의 만누론 이산 조성물의 용도

(57) 요약

본 발명은 파킨슨병 치료에서의 만누론 이산 올리고당 조성물의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 31/715 (2013.01)

A61P 25/16 (2018.01)

(72) 발명자

두, 시아오캥

중국, 상하이 201203, 푸둥 뉴 에어리어, 장 지양
하이-테크 파크, 뉴턴 로드 421

장, 쟈핑

중국, 상하이 201203, 푸둥 뉴 에어리어, 장 지양
하이-테크 파크, 뉴턴 로드 421

딩, 지안

중국, 상하이 201203, 푸둥 뉴 에어리어, 장 지양
하이-테크 파크, 뉴턴 로드 421

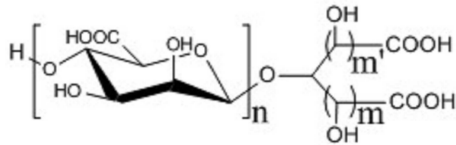
명세서

청구범위

청구항 1

파킨슨병 치료용 의약 제조에서의 만누론 이산 올리고당 조성물의 용도로서, 상기 만누론 이산 올리고당 조성물은 화학식 (III)의 만누론 이산 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는, 조성물의 용도:

[화학식 III]



여기서 n은 1 내지 9에서 선택되는 정수이고, m은 0, 1 또는 2에서 선택되고, m'는 0 또는 1에서 선택되고;

여기서,

n= 1 내지 5인 만누론 이산의 총 중량은 조성물의 총 중량의 60% 이상을 차지하고;

n= 1 내지 2인 만누론 이산의 총 중량은 조성물의 총 중량의 60% 이하를 차지한다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 만누론 이산 올리고당 조성물에서, n= 1 내지 2인 만누론 이산의 총 중량은 조성물의 총 중량의 10 내지 50%, 바람직하게는 25 내지 50%를 차지하는 용도.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 만누론 이산 올리고당 조성물에서, n= 1 내지 3인 만누론 이산의 총 중량 대 n= 4 내지 7인 만누론 이산의 총 중량의 비는 1.0 내지 3.5인 용도.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 만누론 이산 올리고당 조성물에서, m+m'= 1 또는 2인 만누론 이산의 총 중량은 조성물의 총 중량의 50% 이상, 바람직하게는 60 내지 90%, 더 바람직하게는 70 내지 90%인 용도.

청구항 5

제4항에 있어서, m+m'=1인 만누론 이산의 총 중량은 조성물의 총 중량의 10% 이상, 바람직하게는 30 내지 40%인 용도.

청구항 6

제4항에 있어서, m+m'=2인 만누론 이산의 총 중량은 조성물의 총 중량의 10% 이상, 바람직하게는 30 내지 50%인 용도.

청구항 7

제1항에 있어서, n= 1 내지 5인 만누론 이산의 총 중량은 조성물의 총 중량의 80 내지 95%를 차지하는 용도.

청구항 8

제1항에 있어서, n= 1 내지 3인 만누론 이산의 총 중량은 조성물의 총 중량의 20 내지 70%를 차지하는 용도.

청구항 9

제3항에 있어서, n= 1 내지 3인 만누론 이산의 총 중량 대 n= 4 내지 7인 만누론 이산의 총 중량의 비는 1.0 내

지 3.0인 용도.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물에서 각각의 중합도를 갖는 만누론 이산의 중량% 함량은: 이당류 5 내지 25%, 삼당류 15 내지 30%, 사당류 15 내지 28%, 오당류 5 내지 25%, 육당류 2 내지 20%, 칠당류 2 내지 20%, 팔당류 2 내지 20%, 구당류 2 내지 20%, 십당류 2 내지 20%인 용도.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 조성물에서 각각의 중합도를 갖는 만누론 이산의 중량% 함량은: 이당류 5 내지 25%, 삼당류 15 내지 30%, 사당류 15 내지 28%, 오당류 10 내지 20%, 육당류 5 내지 15%, 칠당류 3 내지 10%, 팔당류 2 내지 5%, 구당류 1 내지 5%, 십당류 1 내지 5%인 용도.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 조성물에서 각각의 중합도를 갖는 만누론 이산의 중량% 함량은: 이당류 10 내지 20%, 삼당류 18 내지 30%, 사당류 15 내지 28%, 오당류 10 내지 20%, 육당류 5 내지 10%, 칠당류 3 내지 5%, 팔당류 2 내지 5%, 구당류 1 내지 3%, 십당류 1 내지 3%인 용도.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약학적으로 허용되는 염은 나트륨 염 또는 칼륨 염인 용도.

청구항 14

유효량의 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 만누론 이산 올리고당 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 파킨슨병을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 파킨슨병 치료에서의 생물학적 활성 스크리닝 방법에 의해 수득된 만누론 이산의 최적 조성물의 용도에 관한 것이다.

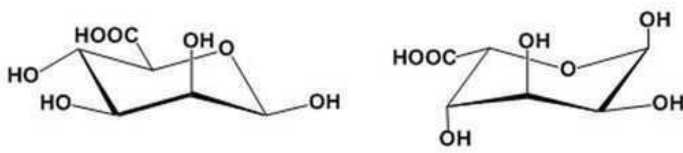
배경 기술

[0002] 파킨슨병(Parkinson's disease, PD)은 50 내지 60세 이상의 중년 및 노인에게 발생하는 흔한 신경퇴행성 질환(neurodegenerative disease)이다. 주요 병변은 흑질과 선조체 경로에 위치하여, 안정 떨림(resting tremor), 고긴장(hypertonia) 및 운동완만증(bradykinesia)을 유발한다. 파킨슨병은 노인들 사이에서 네 번째로 흔한 신경퇴행성 질환으로, 65세 이상 인구의 1%가 이 질환을 앓고 있고 40세 이상 인구의 0.4%가 이 질환을 앓고 있다. 파킨슨병의 임상 치료제는 주로 복합 레보도파 제제, 도파민 수용체 작용제, 모노아민 산화효소 억제제, 항콜린 제제, 아만타딘 등이지만 부작용이 크고 장기 적용 효과가 감소하는 것과 같은 단점이 있다.

[0003] 만누론 이산은 이들의 잠재적인 약용 가치로 인해 광범위한 관심을 받아왔다. 만누론 이산은 일반적으로 알긴산을 원료로 여러 단계로 제조된다.

[0004] 원료 알긴산의 다당류 분자는 β -1,4-글루코시드 결합에 의해 연결된 D-만누론산으로 형성된 M 세그먼트, α -1,4-글루코시드 결합에 의해 연결된 L-굴루론산(guluronic acid)으로 형성된 G 세그먼트 및 두 개의 당류의 혼성에 의해 형성된 MG 세그먼트를 포함한다. D-만누론산 및 L-굴루론산의 구조식은 하기 화학식 (I)로 표시된다:

[0005] [화학식 I]



M; β -D-만누론산

G; α -L-굴루론산

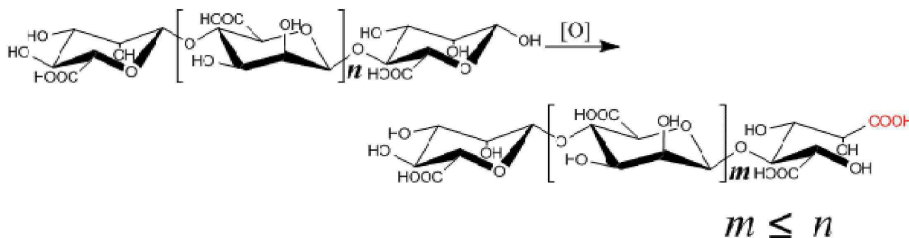
[0006]

[0007] M 세그먼트와 G 세그먼트는 원료인 알긴산으로부터 분리될 수 있다. 일반적인 방법은 하기와 같이 간단하게 설명할 수 있다. 알긴산은 미리 분해되어 폴리만누론산(polymannuronic acid)과 폴리굴루론산(polyguluronic acid)의 혼합 다당류를 생성한다. 그 후 혼합된 다당류를 산성 침전시켜 그 안의 폴리굴루론산을 제거하고, 추가 정제를 수행하여 순도 90% 이상의 호모폴리만누론산(homopolymannuronic acid)(이하 "M 세그먼트 중간체"라고도 함)을 수득한다. 예를 들어, 중국 특허 출원 번호 98806637.8 및 CN02823707.2에 개시된 방법을 참조한다.

[0008] 올리고머 만누론산(oligomeric mannuronic acid)의 일반적인 제조 방법은 하기와 같다: 상기에서 수득된 M 세그먼트 중간체를 산성 조건하에서 가열함으로써 추가 산분해(acidolysis)를 실시하여 원하는 분자량 범위를 갖는 작은 단편 만누론산 중합체를 수득한다. 또한, 분해 효율은 산화 분해(oxidative degradation) 방법에 의해 개선될 수 있다. 한편, 환원 말단은 개환된 이산 당(ring-opened saccharic diacid)으로 산화될 수 있고, 구체적인 것은 Meiyu Geng 등의 중국 특허 출원 번호 200580009396.5(특허 문헌 1) 및 미국 특허 번호 8,835,403 B2(특허 문헌 2)를 참조한다. 설명의 편의를 위해, 특허 문헌 1 및 2는 이하에서 총괄하여 선행 문헌으로 지칭되며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0009] 선행 문헌에 개시된 만누론 이산을 수득하기 위한 반응은 하기 반응식 (II)로 나타낼 수 있는데, 즉 올리고만누론산(oligomannuronic acid) 다당류의 환원 말단에서 만누론산의 C1 위치의 알데히드기가 카르복실기로 산화된다.

[0010] [반응식 II]



[0011]

[0012] 상기의 산화 전환(oxidative conversion) 공정에서 일반적으로 사용되는 산화제는 알칼리성 황산구리 용액, 즉 펠링(Fehling)의 시약이다. 선행 문헌은 이 산화 방법을 채택한다. 구체적으로 알칼리 조건하에서 반응 기질인 폴리만누론산, 즉 상기 M 세그먼트 중간체를 황산구리 용액에 첨가하고 끓는 수조에서 15분 내지 2시간 동안 반응시킨다. 이 방법은 산화제로서 Cu^{2+} 이온을 사용하여 알데히드기를 산화시키며, 붉은 벽돌색의 산화구리(I)(cuprous oxide) 침전물이 반응 내에서 생성된다. 이 반응은 종종 환원당을 식별하는 데 사용된다.

[0013] 선행 문헌은 올리고만나르산(oligomannaric acid)이 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD) 및 당뇨병(Diabetes Mellitus)에 영향을 미친다는 것을 개시한다. 알츠하이머병과 제2형 당뇨병(type 2 diabetes)의 발병 기전은 아밀로이드(β -아밀로이드 및 아밀린)와 밀접한 관련이 있다. 아밀로이드 단백질은 응집된 다음 단백질 올리고머를 생성하며, 이는 추가로 응집되어 섬유를 형성한다. 이러한 단백질 응집체는 세포독성을 가지며 세포 내에서 산화 반응을 유도하여 미토콘드리아를 손상시키고 염증성 반응과 같은 단계적 연쇄반응을 유발하여 다수의 뉴런과 β 세포에 손상을 입히고 궁극적으로 알츠하이머병 및 제2형 당뇨병을 유발한다. 올리고만나르산은 아밀로이드 단백질을 표적으로 하고 아밀로이드 단백질에 의해 유발되는 단계적 연쇄반응을 길항하므로(antagonize) 알츠하이머병과 제2형 당뇨병을 예방하고 치료하는 효과가 있다.

[0014] 선행 문헌 CN106344592A는 파킨슨병 치료에서 환원 말단의 위치 1에 카르복실기를 갖는 만나르산 올리고당(mannuronic acid oligosaccharide) 및 이의 유도체의 적용을 개시하고, 또한 파킨슨병 치료에서의 사당류 내지 십당류 혼합물의 약력학적 활성을 개시한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명은 파킨슨병 치료에서 만누론 이산 올리고당(mannuronic diacid oligosaccharide) 조성물의 용도를 제공한다.

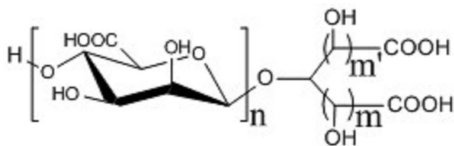
[0016] 또한, 본 발명의 만누론 이산 올리고당 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 파킨슨병의 치료 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명은 파킨슨병 치료에서 만누론 이산 올리고당(mannuronic diacid oligosaccharide) 조성물의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 파킨슨병 치료를 위한 방법에 관한 것이고, 이는 본 발명의 만누론 이산 올리고당 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함한다.

[0018] 본 발명에 개시된 만누론 이산 올리고당 조성물은 화학식 (III)의 만누론 이산 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함한다.

[0019] [화학식 III]



[0020] 여기서 n은 1 내지 9에서 선택된 정수이고, m은 0, 1 또는 2에서 선택되고, m'는 0 또는 1에서 선택되고,

[0022] 여기서,

[0023] n= 1 내지 5인 만누론 이산의 총 중량은 조성물의 총 중량의 60% 이상을 차지하고;

[0024] n= 1 내지 2인 만누론 이산의 총 중량은 조성물의 총 중량의 60% 이하를 차지한다.

발명의 효과

[0025] 출원인은 특정 구성을 갖는 만누론산 이산 조성물이 파킨슨 병 치료에 유리한 효과가 있는 동시에 생산 비용을 절감하는 것을 발견했다. 또한 천연물 유래의 안전성으로 환자의 삶의 질 향상에 도움이 된다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 생성물 A에서 이당류, 삼당류 및 사당류의 질량 스펙트럼을 보여준다.
- 도 2는 생성물 A에서 오당류, 육당류 및 칠당류의 질량 스펙트럼을 보여준다.
- 도 3은 생성물 A에서 팔당류, 구당류 및 십당류의 질량 스펙트럼을 보여준다.
- 도 4는 11일째에 PD 동물의 하강(crawling-down) 시간에 대한 상이한 올리고당 조성물 및 육당류의 효과를 보여준다. 도면에서 가로좌표의 숫자에 해당하는 시료는 하기와 같다. i: 대조군; ii: 모델군; iii: 생성물 A; iv: 생성물 B; v: 생성물 C; vi: 생성물 D; vii: 비교 실험 시료; viii: 육당류.
- 도 5는 11일째에 PD 동물의 지연 시간(latency)에 대한 상이한 올리고당 조성물 및 육당류의 효과를 보여준다. 여기서 가로좌표의 기호는 도 4의 기호와 동일하다.
- 도 6은 14일째에 PD 동물의 하강 시간에 대한 상이한 올리고당 조성물 및 육당류의 효과를 보여준다. 여기서 가로좌표의 기호는 도 4의 기호와 동일하다.
- 도 7은 14일째에 PD 동물의 지연 시간에 대한 상이한 올리고당 조성물 및 육당류의 효과를 보여준다. 여기서 가로좌표의 기호는 도 4의 기호와 동일하다.
- 도 8은 17일째에 PD 동물의 하강 시간에 대한 상이한 올리고당 조성물 및 육당류의 효과를 보여준다. 여기서 가

로좌표의 기호는 도 4의 기호와 동일하다.

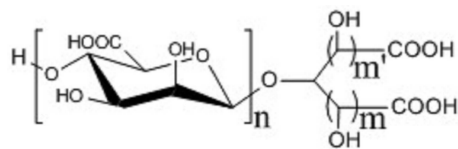
도 9는 17일째에 PD 동물의 지연 시간에 대한 상이한 올리고당 조성물 및 육당류의 효과를 보여준다. 여기서 가 로좌표의 기호는 도 4의 기호와 동일하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하, 본 발명의 다양한 측면을 상세히 설명하지만, 본 발명은 이들 특정 실시예에 한정되지 않는다. 당업자는 하기의 실질적인 개시에 따라 본 발명에 대해 약간의 수정 및 조정을 할 수 있으며, 이러한 조정은 또한 본 발명의 범위 내에 있다.

[0028] 본 발명은 파킨슨병 치료에서의 만누론 이산 올리고당 조성물의 용도에 관한 것이다. 사용된 만누론 이산 올리고당 조성물은 화학식 (III)의 만누론 이산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함한다.

[0029] [화학식 III]



[0030]

여기서 n은 1 내지 9에서 선택된 정수이고, m은 0, 1 또는 2에서 선택되고, m'는 0 또는 1에서 선택되고,

[0032]

여기서,

[0033]

n= 1 내지 5인 만누론 이산의 총 중량은 조성물의 총 중량의 60% 이상을 차지하고;

[0034]

n= 1 내지 2인 만누론 이산의 총 중량은 조성물의 총 중량의 60% 이하를 차지한다.

[0035]

본 발명의 만누론 이산 올리고당 조성물은 상이한 중합도를 갖는 만누론 이산의 혼합물이며, 그 주성분은 중합도가 2 내지 10인 만누론 이산 올리고당이다. 만누론 이산에서 가장 활성이 높은 당류는 사당류 내지 십당류, 특히 육당류이다. 그러나 공지된 선행 기술과 다르게, 본 발명자들은 일정 비율의 덜 활성인 이당류와 삼당류를 가장 활성이 높은 사당류 내지 십당류에 첨가하는 것이 생물학적 활성을 감소시키지 않고 동일한 질량 투여 용량(administration dosage in mass) 하에서 활성을 증가시킨다는 것을 발견하였다. 어떤 이론에도 얽매이지 않고 이것은, 저분자량의 이당류와 삼당류가 단독으로 작용할 수는 없지만 다른 올리고당과 혼합되었을 때의 시너지 효과 때문일 수 있다고 추측된다. 그러나 이당류 내지 삼당류의 비율이 너무 높으면 조성물의 전체 활성이 이당류와 삼당류 자체의 낮은 활성으로 인해 감소할 것이다. 따라서 조성물 내의 이당류와 삼당류의 비율은 일정 범위 내에서 조절되어야 한다.

[0036]

실제 제조 과정에서는 일정량의 이당류와 삼당류가 산화 분해 반응(oxidative degradation reaction)에서 생성되며, 일반적으로 낮은 활성으로 인해 생성물의 약학적 효과에 영향을 미치지 않도록 분리 후 생성물에서 제거된다. 그러나, 본 발명자들의 상기 발견을 바탕으로, 산화 분해 생성물에서 이당류와 삼당류를 분리하여 제거할 필요는 없고, 산화 분해 반응의 조건을 조절하여 이당류 내지 삼당류의 비율을 일정 범위 내에서 조절하면 된다. 생성된 조성물의 활성은 선행 출원에 개시된 조성물의 활성에 도달하거나 심지어 더 우수할 수 있다. 또한, 이당류와 삼당류는 제거할 불순물로 간주되지 않기 때문에 생성물 수율도 선행 출원에서 개시된 것보다 현저하게 높다. 따라서 생산 비용을 대폭 절감하고 폐기물 배출량을 줄임으로써 실제 생산에서 실현하기가 더 용이하고, 산업적 대규모 생산을 실현하기가 더 용이해진다.

[0037]

바람직한 실시예에 따르면, 만누론 이산 올리고당 조성물에서, m+m'=1 또는 2인 만누론 이산의 총 중량은 조성물의 총 중량의 50% 이상, 바람직하게는 60 내지 90%, 더 바람직하게는 70 내지 90%이다. 특히, 만누론 이산 올리고당 조성물에서, m+m'=1인 만누론 이산의 총 중량은 조성물의 총 중량의 10% 이상, 바람직하게는 30 내지 40%이다. 또 다른 바람직한 실시예에서, 만누론 이산 올리고당 조성물에서, m+m'=2인 만누론 이산의 총 중량은 조성물의 총 중량의 10% 이상, 바람직하게는 30 내지 50%이다.

[0038]

바람직한 실시예에 따르면, 만누론 이산 올리고당 조성물에서, n= 1 내지 5인 만누론 이산 올리고당의 총 중량은 조성물의 총 중량의 80 내지 95%를 차지한다.

[0039]

바람직한 실시예에 따르면, 만누론 이산 올리고당 조성물에서, n= 1 내지 2인 만누론 이산 올리고당의 총 중량

은 조성물의 총 중량의 10 내지 50%, 바람직하게는 25 내지 50%를 차지한다.

- [0040] 바람직한 실시예에 따르면, 만누론 이산 올리고당 조성물에서, n= 1 내지 3인 만누론 이산 올리고당의 총 중량은 조성물의 총 중량의 20 내지 70%를 차지한다.
- [0041] 바람직한 실시예에 따르면, 만누론 이산 올리고당 조성물에서, n= 1 내지 3인 만누론 이산의 총 중량 대 n= 4 내지 7인 만누론 이산의 총 중량의 비는 1.0 내지 3.5, 바람직하게는 1.0 내지 3.0이다.
- [0042] 바람직한 실시예에 따르면, 만누론 이산 올리고당 조성물에서 각각의 중합도를 갖는 만누론 이산의 중량% 함량은: 이당류 5 내지 25%, 삼당류 15 내지 30%, 사당류 15 내지 28%, 오당류 5 내지 25%, 육당류 2 내지 20%, 칠당류(heptasaccharide) 2 내지 20%, 팔당류(octasaccharide) 2 내지 20%, 구당류(nonasaccharide) 2 내지 20%, 십당류(decasaccharide) 2 내지 20%이다. 특히, 조성물 내의 올리고당의 중량% 함량은 이당류 5 내지 25%, 삼당류 15 내지 30%, 사당류 15 내지 28%, 오당류 10 내지 20%, 육당류 5 내지 15%, 칠당류 3 내지 10%, 팔당류 2 내지 5%, 구당류 1 내지 5%, 십당류 1 내지 5%이다. 보다 바람직하게는, 조성물 내의 올리고당의 중량% 함량은 이당류 10 내지 20%, 삼당류 18 내지 30%, 사당류 15 내지 28%, 오당류 15 내지 20%, 육당류 5 내지 10%, 칠당류 3 내지 5%, 팔당류 2 내지 5%, 구당류 1 내지 3%, 십당류 1 내지 3%이다.
- [0043] 본 발명의 만누론 이산 올리고당 조성물에서, 이의 약학적으로 허용되는 염은 나트륨 염 또는 칼륨 염일 수 있다.
- [0044] 본 특허 출원의 발명자들은 상이한 중합도의 올리고당을 일정 비율에 따라 합성하면 고-활성 올리고당 조성물을 수득할 수 있고, 이의 활성은 가장 활성이 높은 육당류보다 높다는 것을 발견하였다. 특히, 일정 비율의 이당류와 삼당류를 첨가한 조성물은 이당류와 삼당류가 없는 조성물보다 활성이 높다. 고-활성 올리고당 조성물에서 각 올리고당의 비율은 하기의 비율을 가질 수 있다:
- [0045] 조성물에서 n= 1 내지 5인 만누론 이산의 총 중량은 조성물의 총 중량의 60% 이상, 바람직하게는 80 내지 95%를 차지한다. n= 1 내지 2인 만누론 이산의 총 중량은 조성물의 총 중량의 60% 이하, 바람직하게는 10 내지 50%, 더 바람직하게는 25 내지 50%를 차지한다. n= 1 내지 3인 만누론 이산 올리고당의 총 중량은 조성물의 총 중량의 20 내지 70%를 차지한다. n= 1 내지 3인 만누론 이산 올리고당의 총 중량 대 n= 4 내지 7인 만누론 이산 올리고당의 총 중량의 비는 1.0 내지 3.5, 바람직하게는 1.0 내지 3.0이다.
- [0046] 본 발명의 파킨슨병의 치료용 약제는 만누론 이산 올리고당 조성물을 포함하고, 이는 화학식 (III)을 갖는 만누론 이산 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제는 경구 또는 비경구 투여를 위한 정제, 경질 캡슐, 연질 캡슐, 장용성 캡슐(enteric capsule), 마이크로캡슐, 과립, 시럽, 주사제, 과립, 에멀전, 현탁액, 용액 및 서방형 제제의 형태일 수 있다.
- [0047] 본 발명의 약학적으로 허용되는 담체는 당업자에게 공지된 약학적으로 허용되는 담체를 의미한다. 본 발명의 약학적으로 허용되는 담체는 충전제, 습윤제, 결합제, 붕해제(disintegrant), 윤활제, 접착제, 활택제(glidant), 및 차폐제(taste masking agent), 계면활성제, 방부제 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 충전제는 락토스, 미정질 셀룰로스, 전분, 당류 분말, 텍스트린, 만니톨, 황산 칼슘 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 습윤제 및 결합제는 카르복시메틸셀룰로스나트륨(sodium carboxymethylcellulose), 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 젤라틴, 수크로스, 폴리비닐피롤리돈 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 붕해제는 카르복시메틸스타치나트륨(sodium carboxymethyl starch), 가교(crosslinked) 폴리비닐피롤리돈, 가교 카르복시메틸셀룰로스나트륨, 저치환 히드록시프로필 셀룰로스 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 윤활제는 스테아르산마그네슘, 실리카겔 미세 분말, 활석, 수소 첨가(hydrogenated) 식물유, 폴리에틸렌 글리콜, 마그네슘라우릴설페이트(magnesium lauryl sulfate) 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 접착제에는 아라비아검, 알긴산, 카르복시메틸셀룰로스 칼슘(calcium carboxymethylcellulose), 카르복시메틸셀룰로스나트륨, 글루코스 결합제, 텍스트린, 텍스트로스, 에틸 셀룰로스, 젤라틴, 액체 글루코스, 구아검, 히드록시에틸셀룰로스, 히드록시프로필셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 마그네슘알루미늄실리케이트(magnesium aluminum silicate), 말토크스트린, 메틸셀룰로스, 폴리메타크릴산에스테르, 폴리비닐피롤리돈, 알과전분(pegelatinized starch), 알긴산나트륨, 소르비톨, 전분, 시럽 및 트라가칸트 검 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 활택제는 콜로이드 규산, 분말 셀룰로스, 삼규산마그네슘(magnesium trisilicate), 실리카 및 활석을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 맛 차폐제는 아스파탐, 스테비오사이드, 프럭토스, 글루코스, 시럽, 꿀, 자일리톨, 만니톨, 락토스, 소르비톨, 말티톨 및 글리시리진을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 계면활성제는 트윈팔십(Tween-80) 및 폴록사머(poloxamer)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 방부제는 파라벤, 벤조산나트

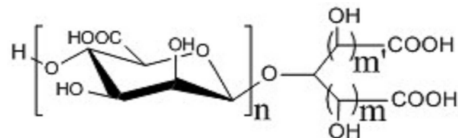
를, 소르빈산칼륨 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0048] 본원에서 사용되는 용어 "치료(treatment)"는 일반적으로 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 달성하는 것을 의미한다. 이 효과는 질병이나 그 증상의 전체 또는 부분적 예방에 따라 예방적일 수 있고/있거나, 질병 및/또는 질병으로 인한 부작용의 부분적 또는 완전한 안정화 또는 치유에 따라 치료적일 수 있다. 본원에서 사용된 것처럼 "치료"는 하기를 포함하여 환자의 질병에 대한 모든 치료를 포함한다: (a) 질병 또는 증상에 민감하지만 아직 질병으로 진단되지 않은 환자에게 발생하는 질병 또는 증상의 예방; (b) 질병의 증상 억제, 즉 발병 예방; 또는 (c) 질병의 증상, 즉 질병 또는 증상의 악화 유발을 완화.

[0049] **만누론 이산 올리고당 조성물**

[0050] 본 발명의 파킨슨병 치료용 만누론 이산 올리고당 조성물은 화학식 (III)을 갖는 만누론 이산 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함한다.

[0051] [화학식 III]



[0052] 여기서 n은 1 내지 9에서 선택된 정수이고, m은 0, 1 또는 2에서 선택되고, m'는 0 또는 1에서 선택되고,

[0054] 여기서,

[0055] n= 1 내지 5인 만누론 이산의 총 중량은 조성물의 총 중량의 60% 이상을 차지하고,

[0056] n= 1 내지 2인 만누론 이산의 총 중량은 조성물의 총 중량의 60% 이하를 차지한다.

[0057] 일 예시적인 실시예에서, 파킨슨병 치료용 만누론 이산 올리고당 조성물의 제조 방법은 하기의 단계를 포함한다:

[0058] (1) 만누론 이산 생성물의 제조

[0059] M 세그먼트 중간체 제조. 상기 기재된 바와 같이, 본 발명에서 사용되는 원료 M 세그먼트 중간체는 종래 기술 분야에서 공지된 방법, 예를 들어 중국 특허 출원 번호 98806637.8 및 CN02823707.2에 개시된 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적인 방법은 하기와 같이 간단하게 설명할 수 있다. 알긴산을 미리 분해하여 폴리만누론산(polymannuronic acid)과 폴리글루론산(polyguluronic acid)의 혼합 다당류를 생성한다. 그런 다음 혼합된 다당류를 산성 침전시켜 그 안의 폴리글루론산을 제거하고 추가 정제를 수행하여 순도 90% 이상의 호모폴리만누론산(homopolymannuronic acid), 즉 M 세그먼트 중간체를 수득한다.

[0060] 오존 산화 분해(ozone oxidative degradation). M 세그먼트 중간체를 적절한 양의 물에 용해시키고 실온 또는 가열 조건에서 교반한다. 오존이 지속적으로 유입되면 반응이 시작된다. 반응의 pH값은 묽은 염산 또는 묽은 NaOH 용액을 한 방울씩 첨가하여 3 내지 13, 바람직하게는 4 내지 10, 더 바람직하게는 6 내지 8로 조정할 수 있다. 온도는 바람직하게는 0 내지 70°C, 보다 바람직하게는 10 내지 45°C이다. 반응 완료 후 오존 유입을 중단하고 pH를 중성으로 조정한다.

[0061] 막 분리 및 정제. 상기에서 수득한 반응 생성물은 약 10% 농도의 용액으로 제형화되고 분자 컷-오프 막(molecular cut-off membrane)으로 분리되어 단당류 이하의 분해 생성물을 제거한다. 투석유물(retentate)이 수집된다. 사용된 분자 컷-오프 막의 MWCO는 1000 내지 3000Da, 바람직하게는 2000Da이다. 수집된 액체를 회전 증발기에서 농축하고 진공하에서 건조하여 올리고만누론 이산 혼합물을 수득하였다. 분석 후, 이들 생성물은 모두 함량이 일정 비율 범위 내에 있는 이당류에서 십당류에 이르는 올리고당의 조성물임이 밝혀졌다. 이 제조 방법의 구체적인 예시는 실시예 1 내지 3에서 찾을 수 있고, 세 가지 조성물 A, B 및 C는 각각 앞서 언급된 방법에 따라 제조되었다.

[0062] (2) 단일 중합도를 갖는 올리고당의 제조

[0063] 단계 (1)에서 수득한 올리고당 혼합물을 약 10%의 농도로 용해시키고 P6 겔 크로마토그래피 칼럼(P6 gel chromatographic column)에서 분리하고 자외선 검출을 하여 각 용출액 성분을 수집한다. 동일한 중합도를 갖는 성분이 조합된다. 이당류 내지 십당류의 9가지 성분을 수집하고, G10 겔 칼럼 크로마토그래피(G10 gel column

chromatography)로 탈염하고, 회전 증발기로 농축하고 진공에서 건조시켰다. 구체적인 정제 및 제조 공정이 실시예 4에 제시되어있다. 칼럼 크로마토그래피, 탈염 및 건조와 같은 작업은 당업자에게 공지되어 있다.

[0064] (3) 올리고당 조성물의 활성 비교

[0065] 제조된 조성물은 단계 (2)에서 정제된 옥당류와 약리학적 활성에 대해 비교된다. 결과는 본 발명의 올리고당 조성물이 단일 중합도를 갖는 올리고당에서 가장 활성이 높은 옥당류보다 더 우수한 반면, 이당류와 삼당류를 포함하지 않는 조성물의 활성이 옥당류보다 약간 낮은 것을 보여준다. 따라서 상이한 중합도를 갖는 올리고당이 조합된 후 시너지 효과를 낼 수 있음을 알 수 있다. 조성물에서 이당류 내지 옥당류의 비율이 60% 이상이고 이당류 내지 삼당류의 비율이 60% 이하일 때, 조성물의 활성이 가장 높다. 그러나 이당류 내지 삼당류의 비율이 60% 이상이면 조성물의 활성이 감소할 것이다.

[0066] **약력학적 활성 평가를 위한 동물 모델 및 단계**

[0067] 항-파킨슨병(PD) 약력학적 평가를 위한 동물 모델

[0068] 마우스는 무작위로 하기의 8개의 군으로 나누어진다: 블랭크(blank) 대조군, MPTP 모델군 및 투여군, 각 군의 동물은 14마리씩이다. 동물들은 동일한 날에 군으로 나누어지고 약물이 투여된다. 블랭크 대조군과 MPTP 모델군은 위 내 투여로 식염수를 투여 받았고, 다른 군들은 해당 약물을 1일 1회 17일 연속으로 투여 받았다. 모델링 약물은 6일째부터 투여되었다. 블랭크 대조군의 동물에 10ml/kg의 식염수를 피하로 투여하고 다른 동물에는 25mg/kg의 MPTP를 1일 1회 5일 동안 피하로 투여하였다.

[0069] 행동 실험은 각각 11일째, 14일째 및 17일째에 수행되었다. 마우스 머리를 위쪽으로 하여 표면이 거친 막대의 상단(직경 8mm, 높이 55cm)에 부드럽게 두었다. 머리를 들어올리고 내리기까지의 마우스의 조정 시간은 지연 시간(T-턴)이며, 마우스가 아래쪽으로 움직이기 시작하여 모든 다리가 막대의 바닥에 도달하기까지의 시간은 하강 시간(climbing-down time, T-LA)으로 기록된다. 30초 이상은 30초로 기록된다. 각 마우스를 5회 실험하고 결과는 평균을 내었다.

[0070] MPTP는 흑질 내의 도파민성 뉴런에 대해 선택적인 파괴 효과를 가지고 있다. MPTP-유발 PD 동물 모델은 인간 파킨슨병의 병리학적 변화 및 임상적 특징과 유사한 가장 고전적인 동물 모델이다. PD의 주요 증상은 안정 떨림, 근육 긴장 증가, 움직임 감소 등이다. 막대 등반(rod climbing) 실험의 터닝 시간과 하강 시간은 마우스의 전반적인 활동과 조정 능력을 나타낼 수 있다.

[0071] 본 발명의 이점은 하기 비제한적인 실시예에서 추가로 설명된다. 그러나, 실시예에서 사용된 특정 물질 및 그 양뿐만 아니라 기타 실험 조건은 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 달리 명시하지 않는 한, 본 발명에서 부, 비율, 백분율 등은 모두 질량으로 계산된다.

[0072] **실시예**

[0073] **실시예 1**

[0074] 단계 1): 만누론 이산 올리고당 혼합물의 제조

[0075] M 세그먼트 중간체를 선행 특허에 개시된 방법으로 제조하였다. 구체적인 작업은 하기에 간략하게 설명되어 있다. 5kg의 알긴산나트륨을 약 10%의 용액으로 제형화하고 묽은 염산을 첨가하여 pH를 약 3.0으로 조정하였다. 용액을 80℃로 가열하고 교반하였다. 가열이 중단되기 전에 10시간 동안 반응시켰다. 상온으로 냉각한 후, NaOH를 첨가하여 pH를 9.0으로 조정하고 묽은 염산을 첨가하여 2.85로 추가로 조정하였다. 용액을 10분 동안 5000rpm에서 원심 분리하였다. 상청액을 수집하고 HCl을 첨가하여 pH 1.0으로 조정하였다. 원심 분리 후, 침전물을 수집하고 회전 증발기로 농축하고 진공 건조하여 M 세그먼트 중간체 1500g을 수득하였다. M 세그먼트 중간체 500g을 칭량하고 증류수에 용해하여 5L 부피의 용액을 제조하였다. 용액을 NaOH로 pH 6.5로 조절하고 수조에서 가열하여 반응 온도를 75℃로 조절하였다. 산소 실린더 출구의 가스 유량과 오존 발생기의 동력은 반응 용액에 오존이 8g/hr의 질량 농도 유량으로 공급되도록 조정되었다. 반응 4시간 후, 오존 공급을 중단하고, 물을 적당량 첨가하여 용액의 농도를 약 10%로 조절하였다. 용액을 분자량 컷-오프(Molecular weight cut-off)가 2,000Da인 한외여과막을 통해 여과하여 투석유물을 수집하였다. 수집된 액체를 회전 증발기에서 농축하고 진공 하에서 건조하여 350g의 만누론 이산 생성물 A를 수득하였다.

[0076] 단계 2): 만누론 이산 생성물 A에서 다양한 중합도를 갖는 올리고당의 비율 및 구조 분석

[0077] 상기 건조된 만누론 이산 생성물 A 100mg을 정확하게 칭량하고 물에 10mg/mL의 농도가 될 때까지 용해하고 0.22

μm의 필터 막에 통과시켜 실험 시료 용액을 획득하였다. 조성물에서 중합도가 상이한 올리고당의 비율은 Superdex 썬타이드 분자 배제 크로마토그래피(GE Co.)로 다각도 레이저 광 산란기(multi-angle laser light scattering, MALS, Wyatt Co.)와 조합하여 결정하였다. 실험 조건은 하기와 같다.

- [0078] 크로마토그래픽 칼럼: Superdex 썬타이드 10/300G1
- [0079] 이동상: 0.1 mol/L NaCl
- [0080] 주입 부피: 10 μL
- [0081] 유속: 0.3 mL/min
- [0082] 실험 결과: 이당류에서 십당류까지 각각 dp2 내지 dp10으로 표시되었으며, dp2는 19%, dp3은 25%, dp4는 22%, dp5는 13%, dp6는 9%, dp7은 6%, dp8은 3%, dp9는 2%이고 dp10은 1%이다.
- [0083] 단계 3): 만누론 이산 생성물 A에서 다양한 중합도를 갖는 올리고당 구조의 LC-MS 분석
- [0084] 실험 조건:
- [0085] 크로마토그래픽 칼럼: Superdex 썬타이드 10/300G1
- [0086] 이동상: 20% 메탄올 + 80% 80 mmol/L NH₄Ac
- [0087] 유속: 0.1 mL/min
- [0088] 칼럼 온도: 25°C ± 0.8°C
- [0089] 질량 분석 조건: Agilent 6540 QTOF; 이온 소스: ESI 충돌 전압 120V; 음이온 모드. 획득된 신호의 폭(m/z)은 100 내지 1000이다.
- [0090] 다양한 중합도를 갖는 올리고당의 질량 스펙트럼(mass spectra)은 도 1 내지 3에 나타나 있다. 질량 스펙트럼의 다양한 신호 피크를 지정하여 생성물 A의 모든 올리고당의 분자 구조, 즉 일반식 (III)에 표시된 구조를 확인하였다. 신호 지정 및 신호에 해당하는 구조는 하기 표 1을 참조한다.

표 1

생성물 A 내의 상이한 중합도를 갖는 올리고당의 6 가지 이산 구조와 질량 스펙트럼 상에서 이들의 질량-대-전하 비율

번호	분자 구조	분자식	질량-대-전하 비(m/z)								
			n=1 [M-1] ⁻	n=2 [M-1] ⁻	n=3 [M-1] ⁻	n=4 [M-1] ⁻	n=5 [M-1] ⁻	n=6 [M-1] ⁻	n=7 [M-2] ²⁻	n=8 [M-2] ²⁻	n=9 [M-2] ²⁻
1		(C ₆ H ₈ O ₆) ₂ C ₆ H ₁₀ O ₈ n=1-9	385	561	737	913	1089	1265	720	808	896
2		(C ₆ H ₈ O ₆) ₂ C ₆ H ₈ O ₇ n=1-9	355	531	707	883	1059	1235	705	793	881
3		(C ₆ H ₈ O ₆) ₂ C ₆ H ₈ O ₇ n=1-9	355	531	707	883	1059	1235	705	793	881
4		(C ₆ H ₈ O ₆) ₂ C ₆ H ₈ O ₆ n=1-9	325	501	677	853	1029	1205	690	778	866
5		(C ₆ H ₈ O ₆) ₂ C ₆ H ₈ O ₆ n=1-9	325	501	677	853	1029	1205	690	778	866
6		(C ₆ H ₈ O ₆) ₂ C ₆ H ₈ O ₆ n=1-9	295	471	647	823	999	1175	675	763	851

- [0091]
- [0092] 상기 질량 분석법의 구조 분석으로부터 생성물 A의 당 사슬의 환원 말단에 있는 만누론산이 이산 당 구조(구조에 대해서는 일반식 III 참조)로 산화되었으며, 이는 6개의 탄소 원자(m+m'=3)를 포함하고 함량이 약 10 내지 30%인 만나르 이산의 구조, 또는 만나르 이산(mannaric diacid)의 탈탄산 생성물, 즉 5개의 탄소를 포함하는 이산 당(m+m'=2)(30 내지 50%) 및 4개의 탄소를 가지는 이산 당(m+m'=1)(30 내지 40%)일 수 있다.

[0093] **실시예 2**

[0094] 실시예 1의 M 세그먼트 중간체 100g을 칭량하고, 증류수에 용해시켜 0.8L 부피의 용액을 제조하였다. 용액을 NaOH로 pH 4.0으로 조절하고 실온(25℃)에서 반응을 수행하였다. 산소 실린더 출구의 가스 유량과 오존 발생기의 동력은 반응 용액에 오존이 1g/hr의 질량 농도 유량으로 공급되도록 조정되었다. 반응 10시간 후, 오존 공급을 중단하고 물을 적당량 첨가하여 용액의 농도를 약 15%로 조절하였다. 용액을 분자량 컷-오프 1,000Da의 한외여과막을 통해 여과하여 투석유물을 수집하였다. 수집된 액체를 회전 증발기에서 농축하고 진공하에서 건조하여 80g의 만누론 이산 생성물 B를 수득하였다.

[0095] B에서 다양한 중합도를 갖는 올리고당 성분의 비율은 Superdex 펩타이드 분자 배제 크로마토그래피(GE Co.)로 다각도 레이저 광 산란기(multi-angle laser light scattering, MALS, Wyatt Co.)와 조합하여 결정하였다. 측정 방법은 실시예 1의 관련 부분과 동일하였다. 실험 결과: 이당류에서 십당류까지 각각 dp2 내지 dp10으로 표시하였으며, dp2는 20%, dp3은 25%, dp4는 19%, dp5는 12%, dp6은 9%, dp7은 5%, dp8은 5%, dp9는 3%, dp10은 2%이었다.

[0096] **실시예 3**

[0097] 실시예 1의 M 세그먼트 중간체 100g을 칭량하고 증류수에 용해시켜 1.5L 부피의 용액을 제조하였다. 용액을 NaOH로 pH 9.0으로 조절하고, 45℃ 수조에서 반응을 수행하였다. 산소 실린더 출구의 가스 유량과 오존 발생기의 동력은 오존이 반응 용액에 3g/hr의 질량 농도 유량으로 공급되도록 조정되었다. 반응 2시간 후 오존 공급을 중단하고 물을 적당량 첨가하여 용액의 농도를 약 5%로 조절하였다. 용액을 3,000Da의 분자량 컷-오프를 갖는 한외여과막을 통해 여과하여 투석유물을 수집하였다. 수집된 액체를 회전 증발기에서 농축하고 진공하에서 건조하여 60g의 만누론 이산 생성물 C를 수득하였다.

[0098] C에서 다양한 중합도를 갖는 올리고당의 비율은 Superdex 펩타이드 분자 배제 크로마토그래피(GE Co.)로 다각도 레이저 광 산란기(multi-angle laser light scattering, MALS, Wyatt Co.)와 조합하여 결정하였다. 측정 방법은 실시예 1의 관련 부분과 동일하였다. 실험 결과: 이당류에서 십당류까지 각각 dp2 내지 dp10으로 표시하였으며, dp2는 8%, dp3은 20%, dp4는 28%, dp5는 19%, dp6은 13%, dp7은 6%, dp8은 3%, dp9는 2%, dp10은 1%이었다.

[0099] **실시예 4**

[0100] 단일 중합도를 갖는 만누론 이산 올리고당의 제조, 이는 하기와 같다:

[0101] 1. 시료 제조: 실시예 1에서 제조된 만누론 이산 생성물 A 300g을 칭량하여 물에 용해시켜 1000mL의 농축 용액으로 제조하고 4℃ 냉장고에 넣어 사용하였다. 사용시마다 50mL를 꺼내 물로 1:2 희석한 후 0.22 μm 한외여과막을 통해 흡입 여과하였다.

[0102] 2. 크로마토그래피 분리(Chromatographic separation) 조건: 크로마토그래피는 UV 검출기와 자동 수집기가 장착된 AKTA pure 150(GE Co.에서 구입)이었다. 분리 크로마토그래피 칼럼: 1.2kg의 BioGel P6(Bio-Rad Co.에서 구입)을 탈이온수와 혼합하고 진공 탈기하고 유리 칼럼(내 직경: 10cm)에 수동으로 채우고 10칼럼 부피의 순수(pure water)로 행구었다. 크로마토그래피 칼럼 베드(bed)는 안정적이었고 높이는 1.0m였다. 그런 다음 이동상을 0.02M NaCl 용액으로 변화시키고 10칼럼 부피로 평형화한 후 시료 로딩을 시작하였다.

[0103] 3. 시료 로딩(sample loading) 및 분리: 펌프의 유속은 1mL/min으로 설정되었다. 100mL의 시료 용액을 크로마토그래피 자체 펌프를 통해 칼럼 상단으로 펌핑한 후 이동상으로 전환하고 5mL/min의 유속으로 용리하였다. 사수량(dead water volume)이 유출된 후, 자동 수집이 시작되고 관(tube)당 50mL가 수집되었다.

[0104] 4. 시료 로딩을 반복하고, 20회 반복 제조 후 동일한 분획을 조합하고 회전 증발기로 농축하고 동결 건조하여 이당류에서 십당류까지의 단일 중합도를 갖는 총 9개의 올리고당을 수득하였다.

[0105] **실시예 5**

[0106] 조성물과 육당류 사이의 약리학적 활성 평가를 수행하여 조성물 내 상이한 중합도를 갖는 올리고당과 올리고당의 비율 범위의 시너지 효과를 조사하였다.

[0107] 시료 제조:

[0108] 조성물 생성물 D:

- [0109] 실시예 4에서 제조된 단일 중합도를 갖는 만누론 이산 올리고당을 중합도에 따라 이당류에서 십당류까지 정확하게 칭량하였다. 추출한 각 당류의 중량은 하기와 같다. 이당류 3.0g, 삼당류 3.0g, 사당류 1.5g, 오당류 1.5g, 육당류 0.4g, 칠당류 0.2g, 팔당류 0.2g, 구당류 0.1g, 및 십당류 0.1g. 이들을 균일하게 혼합하여 10g의 조성물 생성물 D를 수득하였다.
- [0110] 비교 실험 시료의 제조
- [0111] 사당류 내지 십당류 함유 혼합물을 선행 특허 문헌 CN106344592A의 실시예 1 및 2에 개시된 방법을 참조하여 제조하였다.
- [0112] 1g의 폴리만누로네이트나트륨(sodium polymannuronate)(중량 평균 분자량 8235Da, Shanghai Green Valley Pharmaceutical Co., Ltd. 제공)을 칭량하고 적절한 양의 증류수를 첨가하여 1%(중량%) 폴리만누로네이트나트륨 수용액을 제조하였다. 1% 폴리만누로네이트나트륨 수용액의 pH값을 염산으로 4로 조정하는 다음, 수용액을 오토클레이브에 투입하였다. 반응을 110℃에서 4시간 동안 가열하였다. 반응 용액을 오토클레이브에서 제거하고 냉각시켰다. 냉각 후 반응 용액의 pH값을 NaOH 용액으로 조정하여 중성 액체를 수득하였다. 교반 조건하에서 중성 액체를 액체 부피의 4배 부피의 에탄올에 천천히 첨가하였다. 알코올 침전을 수행하고 용액을 밤새 방치하였다. 알코올 침전으로 수득한 고체 물질을 여과 분리하고, 무수에탄올(absolute ethanol)을 사용하여 여과 및 분리 과정에서 여과 및 분리를 통해 수득한 고체 물질을 세척하였다. 마침내 백색의 여과 케이크가 생성되었다. 여과 케이크를 60℃ 오븐에서 여과하여 조 알지네이트 올리고당(crude alginate oligosaccharide)을 수득하였다.
- [0113] 5g의 조 알지네이트 올리고당을 5%(중량%) 수용액으로 제조하였다. 5%(중량%) 황산구리 용액 25ml를 10%(중량%) 수산화나트륨 용액 50ml에 첨가하고 즉시 혼합하여 새로운 산화제(oxidant) 수산화구리를 제조하였다. 새로운 산화제 수산화구리를 상기의 5%(중량%) 알지네이트 올리고당 용액 40ml에 즉시 첨가하고, 붉은 벽돌색의 침전물이 더 이상 생성되지 않을 때까지 끓는 수조에서 가열하였다. 반응계를 원심 분리하여 침전물을 제거하여 상청액을 수득하였다. 약간의 상청액을 산화제에 다시 첨가하여 붉은 벽돌색의 침전물이 여전히 생성되는지 확인하였다. 붉은 벽돌색의 침전물이 여전히 생성되면 원심 분리에서 수득한 모든 상청액은 붉은 벽돌색의 침전물이 생성되지 않았음이 확인될 때까지 산화제의 다른 부분과 계속 반응시킨다. 최종 반응계를 원심 분리하여 상청액을 수득하였다. 95% 에탄올 부피의 4배를 알코올 침전을 위해 상청액에 첨가하고, 용액을 밤새 방치하였다. 알코올 침전에 의해 수득된 고체 물질을 여과 및 분리하고, 고체 물질을 무수에탄올로 세척하였다. 수득된 고체 물질을 60℃ 오븐에 넣고 건조시켜 화학식 (II)로 표시되는 조 알지네이트 올리고당을 수득하였다.
- [0114] 조 알지네이트 올리고당 1g을 10%(중량%) 수용액으로 제조하고 95% 에탄올 용액을 사용하여 다시 알코올 침전을 수행하였다. 다시 알코올 침전으로 수득한 침전물을 여과 및 분리한 다음, 임의로 무수에탄올로 세척하였다. 침전물을 분리하고 건조하여 고체 물질을 수득하였다. 고체 물질은 5%(중량%) 수용액으로 제조되었다. 수용액을 3 μm 기공 크기의 막으로 여과하고 여과액을 수집하였다. 여과액을 분자 배제 크로마토그래피 Bio-Gel-P6 겔 칼럼(1.6x180cm, Bio-Rad Company에서 구입 가능)에서 용리하고 분리하였다. 이동상으로서 용리액(eluent)은 0.2mol의 L-NH₄HCO₃이었다. 칼럼 크로마토그래피에서 수득한 용출액(eluate)을 복수의 5ml의 시험관에 순차적으로 수집한 다음, 각 시험관 내의 용출액의 당 함량을 황산-카르바졸법(sulfuric acid-carbazole method)을 사용하여 측정하였다. 검출 결과에 따라, 상이한 분자량을 갖는 알지네이트 올리고당 성분을 함유하는 용출액을 각각 수집하였다. 상이한 분자량을 갖는 알지네이트 올리고당 성분을 함유하는 용출액을 각각 감압 농축하고 동결 건조하였다. 성분 1을 버리고, 상이한 분자량을 갖는 화학식(II)(n은 각각 0 내지 10의 값을 가짐)에 나타난 알지네이트 올리고당 성분 2 내지 12를 수득하고, n= 2 내지 8을 갖는 화학식 (II)에 나타난 알지네이트 올리고당 용리액을 수집하고, 조합하고 건조시켰다. n= 2 내지 8을 갖는 화학식 (II)에 나타난 알지네이트 올리고당 혼합물(사당류 내지 십당류 혼합물)을 비교 실험 시료로 제조하였다.
- [0115] 비교 실험 시료에서 다양한 중합도를 갖는 올리고당 성분의 비율은 다각 레이저 산란기(MALS, Wyatt)와 조합된 Superdex 썬타이드(GE Co.) 분자배제 크로마토그래피를 사용하여 검출되었다. 결정 방법은 실시예 1의 관련 부분과 동일하다. 실험 결과: 사당류 내지 십당류는 dp4 내지 dp10으로 표시되며, 이는 각각 10% dp4, 12% dp5, 13% dp6, 14% dp7, 15% dp8, 19% dp9 및 17% dp10이다.
- [0116] 실시예 1, 2 및 3에서 각각 제조된 생성물 A, B 및 C, 본 실시예에서의 생성물 D 및 비교 실험 시료 내의 올리고당 비율은 하기 표 2에 나타나있다.

표 2

비율 조성물	이당류	삼당류	사당류	오당류	육당류	칠당류	팔당류	구당류	십당류
A	19%	25%	22%	13%	9%	6%	3%	2%	1%
B	20%	25%	19%	12%	9%	5%	5%	3%	2%
C	8%	20%	28%	19%	13%	6%	3%	2%	1%
D	30%	30%	15%	15%	4%	2%	2%	1%	1%
비교 시료	0	0	10%	12%	13%	14%	15%	19%	17%

[0117]

[0118]

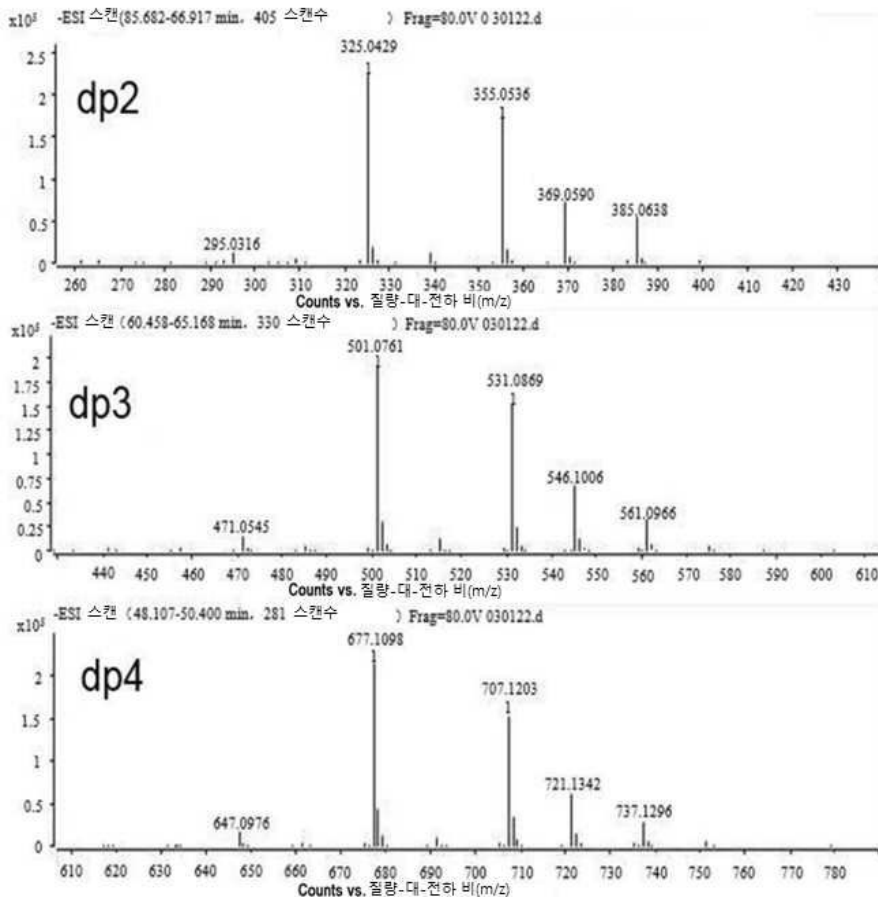
[0119]

상기 4개의 시료 A, B, C 및 D를 각각 10g씩 취하였다. 이들 조성물, 육탄당(6T) 및 비교 실험 시료의 약리학적 활성은 "항-PD 약력학적 평가를 위한 동물 모델"에 기술된 방법에 따라 비교되었다.

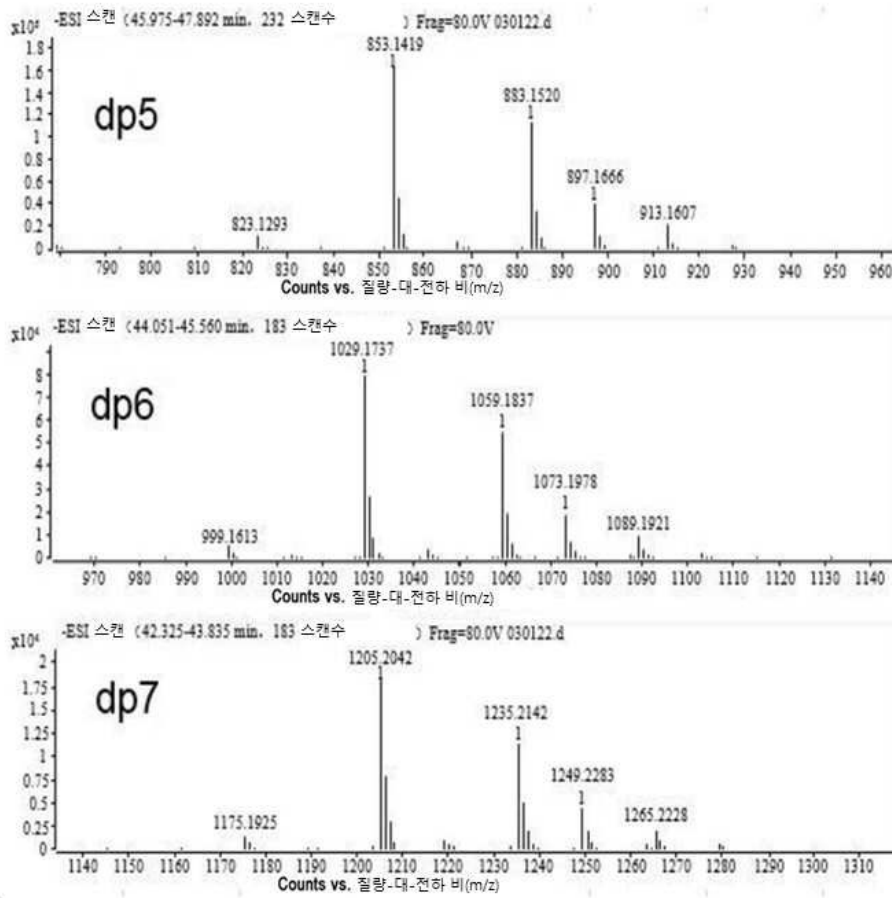
실험 결과는 모델군의 지연 시간과 하강 시간이 블랭크 대조군보다 훨씬 길다는 것을 보여주었다. 모델군과 비교할 때, 각 투여군의 지연 시간과 하강 시간은 상이한 정도로 단축되었다. 이들 중 생성물 A, B 및 C의 약력학적 활성은 모두 비교 실험 시료보다 우수하며 이전에 예상했던 단일 중합도를 갖는 가장 활성이 높은 육당류보다 더 우수하다. 그러나 생성물 D의 활성은 육당류보다 더 약하다. 어떤 이론에도 얽매이지 않고, 조성물 내의 올리고당의 비율은 생성물의 활성에 상당한 영향을 미치며 일정 비율의 이당류와 삼당류를 첨가하는 것은 시너지 효과를 갖는다고 믿어진다. 그러나 이당류와 삼당류의 비율이 너무 높으면 조성물의 활성이 저하될 것이다. 도 4 내지 9를 참조한다.

도면

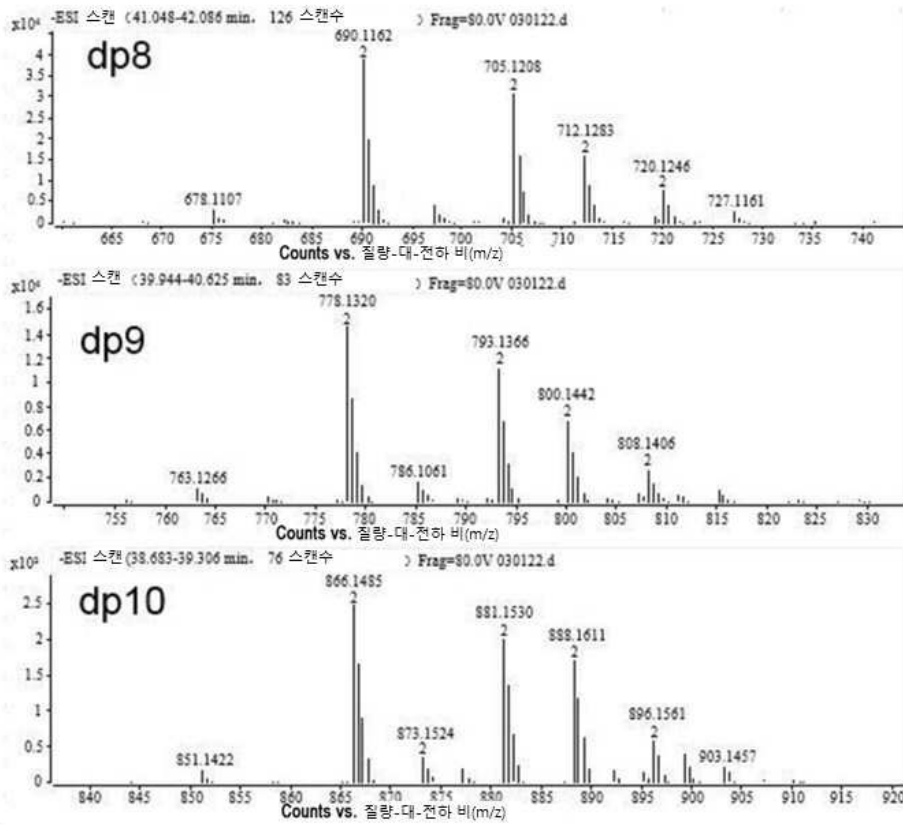
도면1



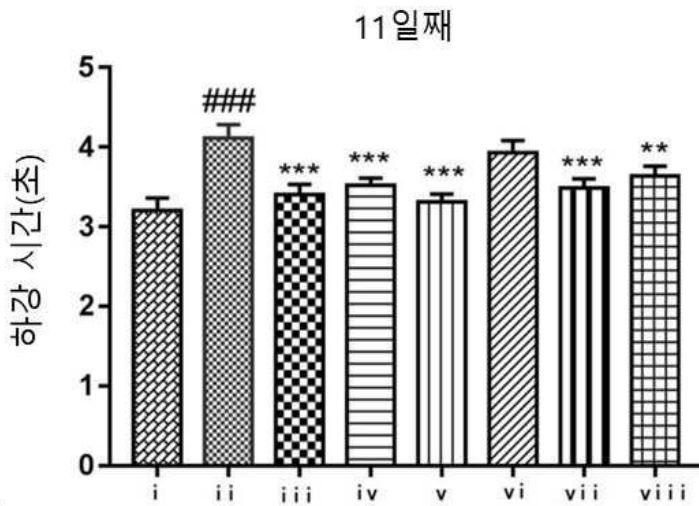
도면2



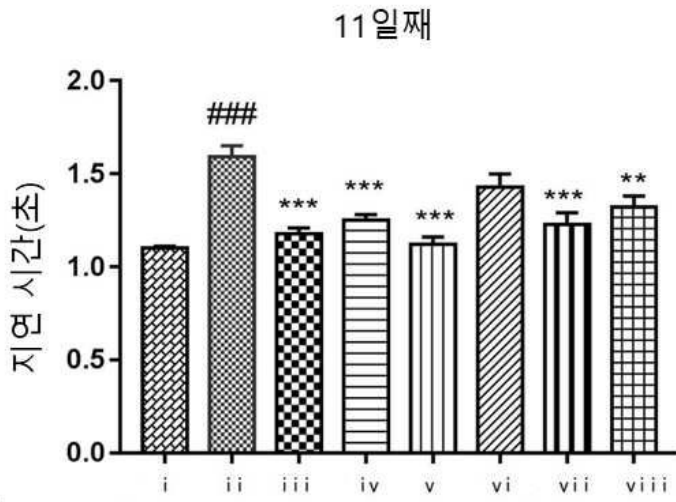
도면3



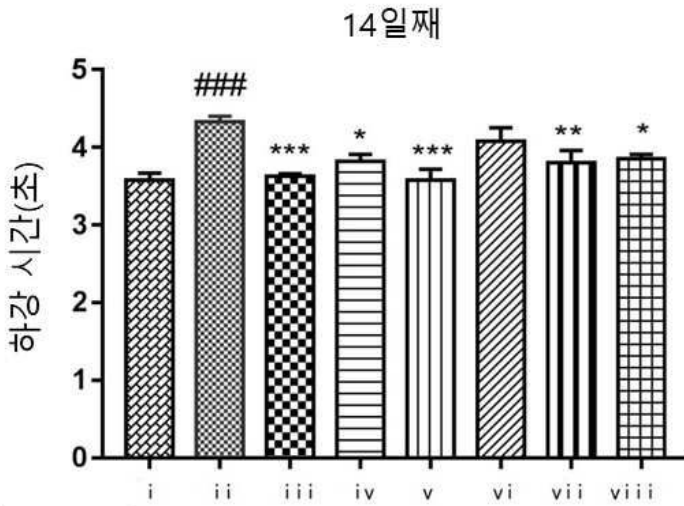
도면4



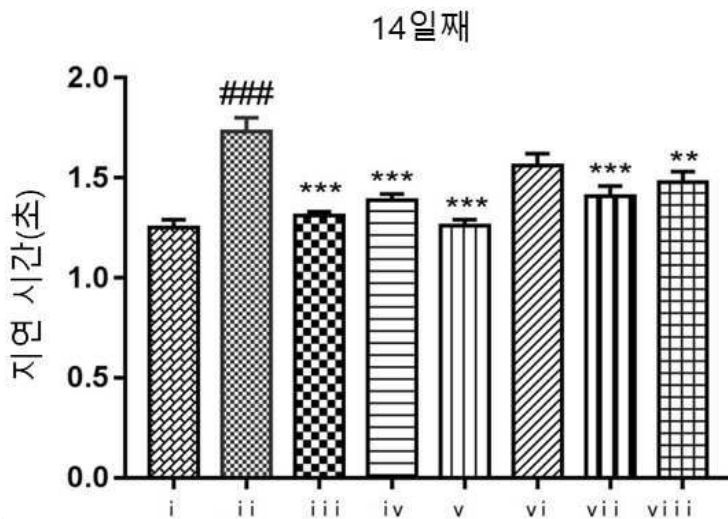
도면5



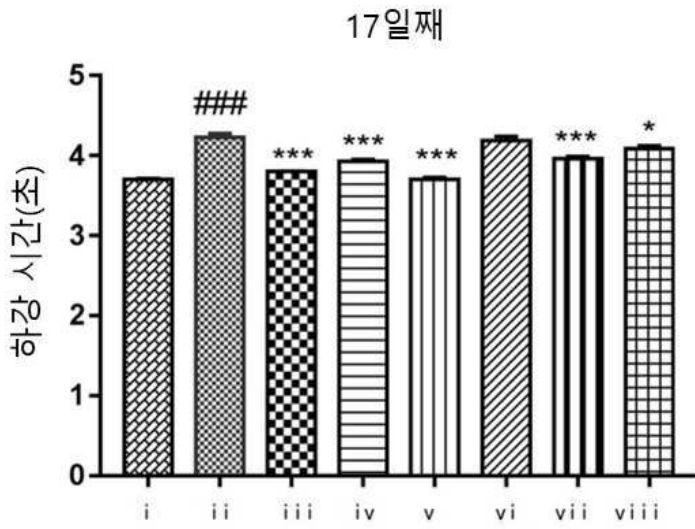
도면6



도면7



도면8



도면9

