



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.

A61K 31/7008 (2006.01)

(45) 공고일자 2007년04월24일
 (11) 등록번호 10-0711142
 (24) 등록일자 2007년04월18일

(21) 출원번호	10-2001-7014505	(65) 공개번호	10-2002-0005033
(22) 출원일자	2001년11월14일	(43) 공개일자	2002년01월16일
심사청구일자	2005년04월28일		
번역문 제출일자	2001년11월14일		
(86) 국제출원번호	PCT/EP2000/004311	(87) 국제공개번호	WO 2000/69444
국제출원일자	2000년05월12일	국제공개일자	2000년11월23일

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 리히텐슈타인, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 캐나다, 키르키즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리비아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구아바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 남아프리카, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨, 탄자니아,

AP ARIPO특허 : 캐나다, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 탄자니아,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 리히텐슈타인, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀란드, 사이프리스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베냉, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장

MI99A001066

1999년05월14일

이탈리아(IT)

(73) 특허권자

코리넬리 움베르토

이탈리아 아이-20129 밀라노 코르소 인디펜덴자 1 코르넬리 컨설팅 에스.아.에스 내

(72) 발명자

코리넬리 움베르토

이탈리아 아이-20129 밀라노 코르소 인디펜덴자 1 코르넬리 컨설팅 에스.아.에스 내

데엠브로시루이기

이탈리아아이-13048산띠아'비아카르두씨8

하나이스라엘
미국일리노이60610시카고엔.디어본피케이더블유와이아파트먼트17에
스1530

파리드자웨드
미국일리노이60154웨스트체스터이튼코트11061

리준
미국일리노이60091월미트포니920

로렌스스탠리
미국일리노이60130포레스트파크록포드8133

머비스로날드에프.
미국오하이오43214콜럼버스죽로드384

(74) 대리인 리엔폭특허법인

(56) 선행기술조사문헌

US 4847338 US 4351938

* 심사관에 의하여 인용된 문헌

심사관 : 신진섭

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 노인성 치매의 치료에 적합한 2,400 돌턴의 평균 분자량을 갖는 글라이코자미노글리칸

(57) 요약

본 발명은 노인성 치매, 특히 알츠하이머 씨 병 또는 SDAT(Senile Dementia Alzheimer's Type)의 치료 및 졸중(ictus)과 외상으로 인한 뇌신경계 손상의 치료에 적합한 약학적 조성물의 제조에 2,400 돌턴의 평균 분자량을 가지는 글라이코자미노글리칸(glycosaminoglycan)의 사용 용도에 관한 것이다.

내포도

도 2

특허청구의 범위

청구항 1.

삭제

청구항 2.

삭제

청구항 3.

약학적으로 허용 가능한 희석제 또는 부형제와 혼합된 $2,400 \pm 200$ 돌턴의 평균 분자량을 갖는 글라이코자미노글리칸의 유효량을 포함하는, 노인성 치매의 치료 및 졸중(ictus)과 외상으로 인한 뇌신경계 손상의 치료에 적합한 약학적 조성물.

청구항 4.

제 3항에 있어서, 상기 $2,400 \pm 200$ 돌턴의 평균 분자량을 갖는 글라이코자미노글리칸은 1.20보다 낮은 복합분산 지수 (polydispersion index)를 갖고, 웨터드 구성성분이 전혀 없으며, 환원성 말단부(reducing end)에 탈황산화된 부분 (desulfated unit)이 없는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5.

제 3항에 있어서, 감마 방사선(γ -radiation) 처리에 의한 해파린(heparin)의 중합해체반응(depolymerization) 후 겔 투과 (gel permeation)에 의해 상기 글라이코자미노글리칸을 획득하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6.

제 3항에 있어서, 피하 투여, 근육내 투여, 정맥내 투여 및 경구투여에 적합한 제형으로 제조된 약학적 조성물.

청구항 7.

제 3항에 있어서, 단위 투여량마다 50 내지 200mg의 상기 글라이코자미노글리칸의 양을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 8.

삭제

청구항 9.

삭제

청구항 10.

삭제

청구항 11.

제3항에 있어서, 상기 노인성 치매는 알츠하이머(Alzheimer)병 또는 노인성 치매형 알츠하이머병(SDAT:Senile Dementia Alzheimier's Type)으로 구성되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

명세서

기술분야

본 발명은 노인성 치매의 치료 및 졸중(ictus)과 외상으로 인한 뇌신경계 손상의 치료에 적합한, 저분자량을 갖는 글라이코자미노글리칸 (glycosaminoglycan)에 관한 것이다.

배경기술

노인성 치매, 특히 알츠하이머(Alzheimer) 씨 병은 뇌혈관 내(혈관 아밀로이드) 또는 뇌세포 내(뇌 아밀로이드)에 플라크 (plaque) 형태의 아밀로이드(amyloid) 계 물질이 축적되는 것이 주요 특징인데, 두 경우의 물질 모두 β -아밀로이드 또는 A β 로서 정의된다. 병리학적 수준에서 노인성 치매의 또 다른 전형적인 특징은 NFT(neurofibrillary tangles)라고 불리는 신경 근원섬유(fibril)의 말려진(tangled) 형태가 존재하는 것이다.

프로테오글리칸(proteoglycan), 특히 해파란 설페이트 프로테오글리칸

(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)이 알츠하이머 씨 병 및 일반적인 노인성 치매에 관계된 다른 병리학적 사건뿐만 아니라, A β 의 중합반응 또는 NFT의 응집화에 관계한다고 알려져 있다(참조: Snow AD; Sekiguchi R; Nicholin D et al. "An important role of heparan sulfate proteoglycan(Perlakan) in a model system for the deposition and persistance of fibrillar beta amyloid in rat brain." *Neuron* 1994; 12: 219-234 및 Perry G; Sieslak SL; Richey P; Kawai M et al."Association of heparan sulfate proteoglycan with neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease". *J. Neurosci.* 1991; 11:3679-3683).

게다가, 스노우(Snow)의 원래 논문(참조: Willmer JP; Snow AD; Kisilevski R. "The demonstration of sulfate glycosaminoglycans in association with the amyloidogenic lesions in Alzheimer's disease". *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 1986; 45: 340-346)은 노인성 치매로 고생하는 환자의 뇌세포 아밀로이드 플라크에 프로테오글리칸 (proteoglycan, PG) 및 글라이코자민노글리칸(glycosaminoglycan, GAG)이 존재한다는 것을 개시하였다.

여러 가지 연구에서(참조: Kalaria RN; Kroon SN; Grahovak I; Perry G. "Acetylcholinesterase and its association with heparan sulfate proteoglycans in cortical amyloid deposits of Alzheimer's disease". *Neuroscience* 1992; 51:177-184), PG 및 아밀로이드 사이의 연합(association)은 β 아밀로이드 전구체(precursor, A β PP)와의 직접적인 연결 또는 A β 의 신경독성 서열을 포함하는 A β 1-41 또는 A β 1-43과의 연결에 의해 유발될 수 있다는 것이 알려졌다.

PG는 또한 NTF 형성의 원인이 되는 Tau-2 단백질의 중합반응을 증가시킨다는 것이 증명되었다(참조: Perry G; Sieslak SL; Richey P, Kawai M et al."Association of heparan sulfate proteoglycan with neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease". *J. Neurosci.* 1991; 11: 3679-3683).

게다가, 로렌스(Lorens) 등에 의해 수행된 연구에서(참조: Lorens SA; Gushawan BS; Van De Kar L; Walegnga JM; Fareed J."Behavioural, Endocrine, and Neurochemical effects of Sulfomucopolysaccharide Treatment in the Aged Fischer 344 Male Rat". *Semin Thromb. Haemost.* 17 Suppl. 1993; 2:164-173), 고분자량을 갖는 글라이코자민노글리칸(GAP 또는 glycosaminoglycans polysulfated 또는 Ateroid \textcircled{R})을 늙은 랫(rat)에 경구 투여후 행동 결핍의 개선을 관찰하였다.

콘티(Conti) 등(참조: Conti L; Placidi GF; Cassano GB; "Ateroid \textcircled{R} in the treatment of dementia: Results of a clinical trial(Eds. Ban E; Lehmann HE) diagnosis and treatment of old age dementias" *Mod. Probl. Pharmacopsychiatry*. Basel, Larger 1989 vol. 2, pp 76-84)은 노인성 치매로 고생하는 환자들에 Ateroid \textcircled{R} 처리후, 위약(placebo) 처리한 환자들에 비해 정신병리학적 척도 행동 및 사회적 행동에서 유의적으로 높은 개선을 관찰하였다.

파네티(Parnetti) 등(참조: Parnetti; Ban TA; Senin U."Glycosaminoglycan polysulfate in primary degenerative dementia". *Neuropsychobiology* 1995; 31: 76-80)은 Ateroid \textcircled{R} 가 예를 들어 혈액 플라크의 모노아민 산화효소 (monoamine oxidase) B 및 뇌 액(cerebral fluid) 내의 도파민(dopamine)과 세로토닌(serotonin) 레벨 등의 생화학적 척도(parameter)를 유의적으로 증진시킴을 보여주었다.

상기 관찰들은 Ateroid \textcircled{R} 가 노인성 치매의 치료에 도움을 줄 수 있다는 것을 제시하며 이미 1988년에 코넬리(U. Cornelli) 및 반(T. Bann)은 노인성 치매의 치료에 전기 생산물을 사용하는 특허를 획득하였다(EP 293974).

요약

본 발명자들은 해파린/heparin 중합해체반응(depolymerization)에서 얻은 2,400 돌턴의 평균 분자량을 갖는 글라이코자민노글리칸 분획이 β 아밀로이드의 형성을 억제하고 신경세포의 성장을 증진시키는데 효과를 나타냄을 *in vivo* 실험에서 발견하였다.

640 돌턴보다 낮은 평균 분자량을 갖거나 4800보다 높은 분자량을 갖는 분획은 훨씬 더 낮거나 무시할만한 효과를 나타내었다.

따라서, 평균 분자량 2,400 돌턴을 갖는 글라이코자미노글리칸 분획을 노인성 치매, 특히 알츠하이머 씨 병이나 SDAT (Senile Dementia Alzheimer's Type)의 치료 및 출중(ictus)과 외상으로 인한 뇌신경계 손상의 치료에 적합한 약학적 조성물의 제조에 사용할 수 있다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 노인성 치매, 특히 알츠하이머 씨 병이나 SDAT(Senile Dementia Alzheimer's Type)의 치료 및 출중(ictus)과 외상으로 인한 뇌신경계 손상의 치료에 적합한 약학적 조성물의 제조를 위해 평균 분자량 2,400 돌턴을 갖는 글라이코자미노글리칸 (glycosaminoglycan) 분획을 사용하는 용도에 관한 것이다.

전기 글라이코자미노글리칸 분획은 바람직하게는 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 해파린을 중합해체반응시킴으로써 획득할 수 있다:

- (a) 미합중국 특허 제 4,987,222호에 의하여, Co 60 으로부터의 감마 방사선을 해파린 수용액에 처리하는 단계;
- (b) 단계 (a)로부터 얻은 용액을 Sephadex G/50 수지에서 겔투과(gel permeation)하여 분획화시키는 단계;
- (c) 1000 내지 3000 돌턴의 분자량을 갖는 분획 혼합물을 600 돌턴 컷-오프(cut-off)로 한외여과(ultrafiltration)하고, 세척한 후 동결건조시키는 단계;
- (d) 동결 건조 산물을 용해하고 Sephadex G/25 수지에서 겔투과하여 분획화시키는 단계; 및
- (e) 평균 분자량 2400 돌턴에 해당하는 1920 내지 2560 돌턴에 걸치는 분자량을 갖는 분획을 수집하고 혼합하는 단계.

본 발명의 바람직한 방법으로 평균분자량 2400 돌턴을 갖는 글라이코자미노글리칸 분획의 제조를 위해, 먼저 10% 해파린 수용액을 120 KGY 내지 150 KGY 범위의 강도로, 해파린 분자량에 대해 25 KGY의 후속 용량으로 Co 60으로부터의 감마선으로 처리한다.

감마선 처리된 용액을 300 돌턴 컷-오프로 한외여과하고, 정제하고, 멸균여과한 후 동결 건조하여 "중합해체된 모체 (mother depolymerized)" 해파린을 획득한다.

상기 "중합해체된 모체" 해파린을 0.3M 염화나트륨 용액에 용해시키고 Sephadex G/50 수지위에서 겔 투과하여 분획화 한다. 3000 돌턴 이하의 분자량을 갖는 분획(전체의 약 10%)이 본 발명의 원료물질이 된다.

이 혼합물의 첫번째 처리는 중합해체반응 공정으로부터 생겨난 분자 절편의 제거를 위해 600 돌턴 컷-오프로 한외여과를 한다.

울트라 필터된 혼합물을 투과액 속에서 카바졸(carbazole)에 대한 반응이 사라지도록 0.3M 염화나트륨 용액으로 세척한다.

증류수로 최종농도가 8%가 되도록 조정된 최종 혼합물을 0.2μm 막으로 멸균여과하고 동결건조한다.

동결건조 산물을 10 내지 15% (w/v) 범위의 농도가 되도록 0.3M 염화나트륨 용액에 용해시킨다.

평균 분자량 2400 돌턴을 갖는 분획을 획득하기 위해서, Sephadex G/25 수지를 사용하여 첫번째 겔 투과와 동일한 조건을 유지하면서 두 번째 겔 투과를 적용한다.

사용된 파일럿(pilot) 컬럼은 하기와 같은 특징을 지닌 BP 252/15 종류이다:

높이 ----- : 105cm

수지 볼륨 ----- : 5200ml

플럭스(flux) ----- : 1000ml/h

채택된 척도는 다음과 같다:

Ve ----- = 17,000ml

Ve/Vo ----- = 1/R = 1.26

R ----- = 0.79

K ----- = 0.09 = (Ve - Vo) / (Vt - Vo)

여기서,

Ve = 용출 부피

Vt = 수지의 총부피

Vo = 공제 부피(dead volume: initial solution in output)

R = 분해능(파크의 크기)

두 번째 젤 투과로부터, 3000 내지 1500 돌턴의 분자량을 갖는 일련의 10 내지 12 분획을 획득한다. 본 발명에 의한 글라이코자미노글리칸 분획 제조를 위해 1920 내지 2560 돌턴 범위의 분자량을 갖는 분획만을 수집하고 혼합한다.

염화나트륨 제거를 위해 최종용액을 300 돌턴 컷-오프로 한외여과한다.

용액을 10% 농도로 맞추고 0.2 μ m 막으로 필터하고 동결건조한다.

이 분획은 3000 돌턴 이하의 분자량을 갖는 전체 분획의 약 80%를 차지한다.

본 발명의 방법에 의하면, 공정 수율 또는 분자 조성의 일정함 측면에서 놀라울만한 재현성으로 글라이코자미노글리칸의 원하는 분획을 획득할 수 있다.

본 발명의 글라이코자미노글리칸 분획의 특징이 하기에 기술되어 있다.

물리화학적 특성

외양 ----- : 밝은 노란색 분말

평균 분자량 ----- : 2,400 돌턴(± 200)

분자량 분포 ----- : 95% < 2,560 돌턴 > 1,920 돌턴

복합분산지수 ----- : < 1.20

유기 황 ----- : 9.5 - 11.5%

SO₃/COOH 비율 ----- : 2.3 - 2.6

비선광도(Specific rotation) ---- : > + 35°

HPLC ----- : 도 1

NMR ----- : 도 2

분자량 3,700에서 Calibration Reference Substance Batch no. 1a(PH.EUR)를 위해 LMW 혼합화물 비교하면서 배제 크로마토그래피(exclusion chromatography) 컬럼을 사용하여 HPLC로 평균분자량을 결정하였다.

황산화 퍼센트 비율(Sulphation percent ratio)

세 개의 시료를 검사하였고 그 결과가 표 1에 있다.

[표 1]

탈황산화된 유론 산(Desulfated uronic acids) %	GlcNSO ₃ · 6SO ₃ %	GlcNAc %	GlcNSO ₃ · 3, 6SO ₃ %
34	85	13	7
33	85	13	6
31	85	14	7

NMR 분석으로부터 고려된 두 개의 특정 영역의 합으로 퍼센트 값을 계산하였다.

탈황산화된 유론 산: 100.5 및 106 ppm의 전체 유론 산에 대하여 102.2 및 106 ppm의 시그널 영역.

6-황산화된 글루코자민·NSO₃: 68 ppm의 6-황산화된 글루코자민 영역에 대하여 62.5 ppm의 시그널 영역.

N 아세틸 글루코자민: 61 내지 54 ppm의 시그널 영역에 대하여 55.5 ppm의 시그널 영역.

3-황산화된 글루코자민·NSO₃: 61 내지 54 ppm의 시그널 영역에 대하여 59 ppm의 시그널 영역.

글루코자민 6번 탄소의 황산화 값은 4,500 돌턴(평균 84)의 분자량을 갖는 분획의 값보다 낮음이 판명되었다.

이것은 분자량이 낮아짐에 따라, 6-탈황산화된 글루코자민의 6번 탄소 영역으로 시그널이 떨어지는, 환원된 말단기 내에 존재하는 2차 알코올 기가 증가한다는 사실에 기인한다.

구조적 특성

도 1은 약 4-5개의 연속적인 이당류(disaccharide)에 해당하는 2,560 돌턴부터 1,920 돌턴까지의 95%에 걸치는 분자량 분포의 글라이코자미노글리칸 분획의 HPLC 플랏(plot)이다.

도 2는 감마 방사선 처리에 의한 중합해체 반응으로 제거된 연결부위의 특징인 84 내지 85 ppm의 시그널이 결여된, 상기 도 1과 같은 분획의 NMR 플랏이다. 갈락토시딕 체인(galactosidic chain) 및 그것의 질소성분이 떨어져 있음으로 인해서, 상기 당 분획은 특징적으로 다른 아미노산 조성을 가지는 펩티드 구조의 존재로부터 유도되는 간섭(주로 병리학적 특성이 되는) 없이 작용한다.

게다가, NMR 분석으로 말단부에 손상되지 않은 환 구조만이 존재하거나 지방족(aliphatic) 잔기(residues)로 구성되어 있다는 것을 알았다.

환원성 말단부(reducing end)의 환은 탈황산화되지 않는다.

환원성 말단부에 있는 탈황산화된 글루쿠로닉(glucuronic) 구조는 감마선 처리때 파괴되기 때문에 특별히 지적하지 않았다.

비환원성 말단부에 있는 환에서, 말단 4번 탄소는 비말단 4번 탄소와 구분하기 어려운데, 그 이유는 둘 다 모두 같은 영역으로 떨어지기 때문이다; 활성적인 오합체(pentamer)의 글루쿠론산(glucuronic acid)에 바로 인접한 NS, 3S 글루코자민의 탄소들만이 단일 방법으로 식별되는 유일한 것들이다.

구조 핵심부는 실제적으로 변하지 않은 황산화 지수를 가지며 초기 혼화물에 해당한다.

GlcNSO₃6SO₃ 및 IdoA2SO₃ 환원기로부터 유도되는 아노머(anomer) 시그날에 의해 본 발명의 글라이코자미노글리칸 분획은 자연산 혼화물 절편의 말단부와 비슷한 말단부를 갖는 물질이라고 확인된다.

본 발명의 용도에 특히 적합한 분획은 복합분산지수(polydispersion index)가 1.20보다 낮고, 웨티드 구성성분이 전혀 없으며, 환원말단부에 탈황산화가 되어있지 않으며, 촉매의 비준재하에 재황산화(resulfation) 처리 없이 획득되는 평균 분자량 2,400 돌턴을 갖는 글라이코자미노글리칸 분획이다.

생물학적 특성

Ph. E. 혼화물 활성 = 결여

USP 혼화물 활성 = 결여

항 Xa 활성 = < 50 U aXa/mg

항 IIa 활성 = < 10 U aIIa/mg

상기 보고된 특성으로부터, 본 발명의 글라이코자미노글리칸 분획은 저분자량 혼화물으로서 혼화물 분자 구조적 특성을 유지하고 있음에도 불구하고, 혈액 응고 척도에 대한 혼화물 활성이 결여되어 있음이 판명되었다.

실시예

14,000 돌턴의 분자량 및 190 U/mg 활성을 가지는 돼지 소장 점막으로부터의 혼화물 나트륨 100 g을 기포제거된 중류수 1 L에 용해시켰다. 아르곤 가스 베블링 후 유리 덮개로 밀봉된 파이렉스 용기에 전기 용액을 쏟아 부었다.

25 KGY의 후속 용량으로 Co 60으로부터의 감마선을 전체 130 KGY가 되도록 용액에 처리하여 혼화물의 중합해체반응물을 획득하였다.

방사선 조사된 용액을 300 돌턴 컷-오프에서 울트라 필터하고 3% 염화나트륨에서 후속 경로에 의해 정제하고, 10% 농축 후에 동결건조하였다.

상기 "중합해체된 모체(mother depolymerized)" 혼화물을 0.3M 염화나트륨 용액에 10%로 용해시키고 Sephadex G 50 Medium을 포함한 겔 투과 컬럼으로 분획화하였다.

8,000 돌턴 이상의 분자량을 갖는 성분 및 4,500 돌턴의 혼화물에 속하는 부분을 분리한 후, 3,000 돌턴 이하의 분자량 분획을 회수하였다.

중합해체 반응 과정 후의 분자 절편을 제거하기 위해 상기 분획을 600 돌턴 컷-오프로 정제하였다.

투과액 내의 카바졸(carbazole)에 대한 반응이 사라지도록 0.3M 염화나트륨으로 3번 세척한 후, 혼합물을 8%로 농축하고 0.2μm 필터로 여과된 용액을 동결건조하였다.

최종 농도 10%(w/v)가 되도록 동결건조물을 0.3M 염화나트륨 용액에 용해시켰다. 전기 용액을 Sephadex G/25 Medium 을 포함하는 겔 투과 캘럼으로 분획화하였다.

1,920 내지 2,560 돌턴 범위의 분자량을 갖는 분획을 수집하였다.

염화나트륨 제거를 위해 수집된 용액을 300 돌턴 컷-오프로 정제하였다.

상기 용액을 10%로 농축하고 동결 건조하였다.

수득: 약 9g의 밝은 노란 색 분말.

분석: 평균 분자량 = 2,400(± 200); 유기 황 = 9.9%.

황산/카르복실기 비율 = 2.5; 항 Xa 활성 = 45 U 항 Xa/mg.

HPLC 테스트: 도 1.

NMR 테스트: 도 2.

비교 목적으로, 상기와 같은 방법으로 하기 글라이코자미노글리칸 분획을 제조하였다:

* 평균 분자량 640 돌턴(320 내지 1,600 돌턴)을 갖는 분획;

* 평균 분자량 4,800 돌턴(3,350 내지 6,060 돌턴)을 갖는 분획.

하기 보고된 실험으로부터의 약학적 특성을 때문에, 평균 분자량 2,400 돌턴을 갖는 글라이코자미노글리칸을 노인성 치매, 특히 알츠하이머 씨 병이나 SDAT(Senile Dementia Alzheimer's Type)의 치료, 졸중(ictus)과 외상으로 인한 뇌신경계 손상의 치료 및 신경세포 쇠퇴의 치료에 적합한 약학적 조성물의 제조에 사용할 수 있다.

전기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 희석제 또는 부형제와 혼합된 전기 글라이코자미노글리칸의 약학적으로 효과적인 양을 포함하며, 피하, 근육내, 정맥내 및 경구 투여에 적합한 제형으로 제조될 수 있다.

전기 조성물은 단위 투여량마다 50 내지 200mg 범위의 전기 글라이코자미노글리칸의 양을 포함한다.

본 발명은 또한 노인성 치매, 특히, 알츠하이머 씨 병 및 SDAT, 졸중 및 외상으로 인한 뇌신경계 손상으로 고생하는 환자들을 치료하는 치료방법을 포함하는데, 전기 방법은 하루 10 내지 400mg의 평균 분자량 2,400 돌턴을 갖는 글라이코자미노글리칸 양을 투여하는 것이다. 특히, 피하, 근육내 및 정맥내 투여에 대해 하루 10 내지 200mg의 양을 투여하며, 경구투여에 대해 하루 25 내지 400mg의 양을 투여한다.

약물학적 실험

본 발명의 글라이코자미노글리칸 분획의 약물학적 활성연구를 위해 노인성 치매의 전형적인 손상을 재현하는 랫트에 실험 모델을 적용하였다(참조: Sigurdsson EM; Lorens SA; Hejna MJ; Dong WX; Lee JM."Local and Distal Histopathological Effects of Unilateral Amyloid- β 25-35 Injections into the Amygdala of Young F344 Rats". Neuro. Biol. Aging 1996; 17: 893-901).

특히, 하기 척도들을 연구하였다:

* β 아밀로이드 물질에 대한 반응의 실체와 상호연관된 Tau-2 단백질(간접적 반응);

* β 아밀로이드에 대한 성상세포(astrocyte)의 반응과 상호연관된 GFAP(glial fibrillary acid protein) 단백질(직접적 반응).

실험에 사용된 물질

* β 아밀로이드:

82 내지 89%의 펩티드 함량(BACHEM, Torrance, CA)을 갖는 TFA(Trifluoroacetic acid, VEH1) 용액의 A β 25-35 나트륨 염.

사용 바로 전에, 5nmol/3.0ml의 농도가 되는 양으로 각각의 부형제(vehicle, VEH1)에 녹인 β 아밀로이드를 증류수로 희석하고 4°C로 유지하였다.

* 글라이코자민노글리칸, TGSS:

하기 표 2의 각기 다른 분자량을 갖는 3가지 유형의 TGSS(tailored glycosaminoglycan)를 상기 기술된 방법으로 제조하였다.

[표 2]

TGSS의 종류	평균 분자량(돌턴)	단당류의 평균 숫자
C8	640(320-1600)	2
C3	2400(1920-2560)	8
C7	4800(3520-6060)	15

상기 산물들은 밝은 노란색을 띠는 수용성 분말이고, 실온에서 건조기에 보관한다.

랫트에 주입하기 위해, 1mg/ml의 생리적 용액(VEH2)를 제조하였다.

2주보다 짧은 기간동안 용액을 4°C에서 보관하였다.

* VEH 1:

TFA(trifluoroacetic acid, 10nmoles in 3 μ l 증류수), β 아밀로이드의 비이클.

* VEH 2:

생리적 용액, TGSS의 비이클.

실험적 방법

실험에 사용된 모델은 편도핵(amygdala)의 중뇌 지역에 A β 25-35를 주입한 효과에 기초한 것이다.

A β 25-35의 아미노산 서열은 A β 1-41 또는 A β 1-43의 전형적인 손상을 일으키기 때문에 신경독성이 있다고 간주되는 서열이다(참조: Yankner BA; Duffy LK; Kirscner DA; "Neurotrophic and Neurotoxic Effects of Amyloid- β Protein. Reversal by Tachykinin Neuropeptides". Science 1990: 250-282).

실험을 위해서, Fischer 344 종의 어린(3-4개월) 수컷 랫트를 사용하였으며, 우편도핵(right amygdala)의 뇌 속으로 5nmol/3.0 μ l의 A β 25-35 또는 그것의 비이클(VEH 1)을 투여하였다.

TGSS 또는 그것의 VEH 2 비이클을 하기에 명시된 투여용량으로 A β 의 뇌 속 주입 2일전 부터 전기 주입 후 32일 동안 1일당 2회 피하 투여하였다.

조직학적 분석을 위해 펜토바비탈(pentobarbital) 나트륨으로 동물을 마취시키고 4% 포름 알데히드 용액으로 동맥에 관류시켰다.

0.2mm 간격으로 5개 관상 셙션(40 μ m)에서 수행하였다.

전기 부위를 Tau-2 단백질에 대한 항체 및 GFAP에 대한 항체로 접촉시켰다.

Fischer 344 랙트를 Harlan Sprague-Dawley Inc.(Indianapolis In)로부터 구하였다.

도착시 랙트들은 250 내지 300g 이었으며 3-4 개월 정도 되었다.

AAALAC(American Association Animal Laboratory and Care)에 의해 승인된 사육 조건에서 12시간의 명암 주기(명-오전 7시)로 각각의 장(cage)에 동물을 간수하였다.

동물은 자의로(ad libitum) 음식 및 물에 접근하였으며 실험전 2 내지 3주 동안 상기 환경조건에서 간수되었다.

펜토바비탈 나트륨(50mg/kg, 복강 투여; Butler, Columbus, OH)으로 마취하에서 A β 25-45의 뇌 속 주입을 행하였다.

동물의 마취상황에서, 황산 아트로핀(0.4mg/kg; Sigma, St. Louis, MO) 및 암피실린 나트륨 염(50mg/kg; Sigma, St. Louis, MO)을 또한 근육내 경로로 투여하였다. 이간 선(interaural line) 아래로 깊이가 3.3mm보다 크지 않도록 Kopf (stereotaxic) 도구 세트를 사용하여 우편도핵으로의 뇌내 주입을 수행하였다.

AP-3.0, ML-4.6 및 DV-8.8의 좌표로 두개골 정수리 부분으로부터 측정된 Paxinos and Watson atlas에 기초하여 투여 좌표를 결정하였다.

편도핵 구조가 더 넓어지는 곳에서 전후(anteroposterior) 좌표를 위치시켰다.

편도핵의 내측 아래옆(medial and basolateral) 핵심부와 관계하여 중측면(medium lateral, ML) 좌표의 중심을 잡고 마침내 편도핵의 배복방향 역치값에 배복(dorsoventral, DV) 좌표의 중심을 잡았다.

CMA/100 종류(Carnegie Medici AD, Soln, Sweden)의 미세주사기용 펌프를 사용하여 3 μ l의 주입 부피를 6분 동안 주입하였다. 주입후 2분간 캐뉼라를 원위치에 놔 두었으며 그 후 조심스럽게 제거하였다.

시술후, 바로잡기 반사(righting reflex)를 다시 획득할 때까지 동물을 열판위에 세워 놓았다.

처리후 35일 째에, 동물을 펜토바비탈 나트륨(100mg/kg, i.p.)으로 마취시킨 후 pH 7.4의 250ml 0.1M 인산나트륨/칼륨 완충액(PB)으로 대동맥 관류하였다.

그 후, 실온에서 500ml/h의 속도로 500ml PB의 4% 포름알데히드로 관류하였다.

관류 시작후 즉시 1 U/g의 혜파린(Upjohn Kalamzoo. MI)을 대동맥으로 주입하였다.

관류후, 뇌를 분리하고 20% 설탕용액으로 1시간동안 고정한 후, 주입 부위 주위로 6mm 블록에서 셙션화하고 20% 설탕, 0.1% 아자이드 나트륨(sodium azide), 0.01% 바시트라신(bacitracin) PB 용액 내에서 24시간동안 4°C에서 보관하였다.

0.1M 인산나트륨 완충액 내의 20% 글리세롤, 2% 디메틸 설폭사이드(dimethyl sulfoxide) 용액으로 조직 블록을 옮긴 후 4°C에서 계속 보관하였다.

40 μ m의 관상 셙션을 서로 0.2mm 간격으로 5개 연속으로 잘라내어 Tau-2 단백질 및 GFAP 단백질 분석용으로 조직학적으로 분석하였다.

조직학적 분석

크레실 바이올렛(Cresyl violet)

섹션을 크실렌으로 세척한 후 알코올 및 물로 수화시켰다. 0.2M 아세트산 200ml, 0.2M 소듐 아세테이트 133ml 및 0.1% 크레실 바이올렛 아세테이트 67ml을 포함하는 용액에 섹션을 접촉시킴으로써 착색을 수행하였다. 섹션을 에탄올에서 후속 과정에 의해 탈수화시키고 크실렌으로 세척하였다. 현미경 관독을 위해 착색된 섹션을 적당한 슬라이드로 덮었다.

콩고 레드(Congo Red)

섹션을 세척하고 에탄올 및 물로 일련의 처리를 하여 수화시킨다.

1% 콩고 레드 및 50% 에탄올을 포함하는 용액으로 1시간동안 섹션을 접촉시킴으로써 발색화를 수행하였다.

리튬 카보네이트로 충만된 용액에 섹션을 담그고 흐르는 물에서 15분간 세척하였다. 해리스 헤마톡실린(Harris hematoxylin)에서 2분간, 뒤에 물에서 그리고 1% 알코올 산을 첨가함으로써 역발색을 수행하였다. 섹션을 물로 세척하고 황산암모늄 수용액에 담근 후 다시 흐르는 물로 세척하였다. 섹션을 에탄올로 탈수화시키고 크실렌으로 세척하였다. 현미경 관독을 위해 이렇게 발색화된 섹션을 적당한 슬라이드로 덮었다.

Tau-2 단백질

40μm 섹션을 저온보호기로부터 꺼내어 4°C에서 PBS 완충액에 밤새도록 놔두었다.

아침에 섹션을 pH 7.6의 트리스 완충액의 0.3% 과산화수소에 30분간 접촉시키고 PBS에 녹인 0.3% 트리톤(triton) X-100 용액에 10분간 3번 세척하였다. 섹션을 실온에서 1:500으로 희석된 Tau-2 항체(Sigma)와 24시간 동안 반응시켰다.

항체 희석액은 PBS에서 2% 트리톤 X-100, 0.1% 소듐 아자이드, 0.01% 바시트라신, 2% 세력 알부민 및 10% 말 혈청(horse serum)을 포함하였다.

PBS에 녹인 0.3% 트리톤(triton) X-100 용액으로 조직을 10분간 3번 세척한 후, PBS에 녹인 0.3% 트리톤(triton) X-100 용액으로 1:200 희석된 면역글로불린 항체(Vectastatin ABC Elite Kit, Vector Laboratories Burlingame CA)와 1시간동안 반응시켰다. PBS에 녹인 0.3% 트리톤(triton) X-100 용액으로 15분간 2번 세척 후, PBS에 녹인 0.3% 트리톤(triton) X-100 용액으로 1:2000 희석된 서양고추냉이 아비딘 폐록시다아제(horseradish avidin peroxidase, Vector)와 1시간동안 조직을 반응시켰다.

섹션을 1시간동안 PBS로 세척한 후, 다시 15분간 0.2M 소듐 아세테이트 완충액(pH 6.0)으로 세척하였다. 섹션을 3-3 디아미노벤지딘 테트라하이드로클로라이드(diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) 및 니켈 황산암모늄(0.3% 과산화수소의 소듐 아세테이트 완충액 100ml에 대해 35mg의 DAB, 2.5g의 니켈 황산암모늄)과 반응시켰다.

그 후, 4°C에서 섹션을 소듐 아세테이트 완충액 및 곧바로 PBS에 넣고 밤새도록 놔두었다.

상기 조작후, 섹션을 건조시키고 현미경 관독을 위해 슬라이드로 덮었다.

GFAP 단백질

항체를 말 혈청보다는 양 혈청에 희석시켰다는 점을 제외하고는 Tau-2 단백질에 사용된 방법에 의해 발색화를 수행하였다.

GFAP(DAKO, Denmark) 일차항체는 1:500 희석으로 사용되었다.

크레실 바이올렛으로 발색된 섹션을 Aβ축적물 크기를 측정함으로써 분석하였다.

$A\beta$ 축적물의 영역을 0.2mm 간격으로 측정하였다. 콩고 레드로 착색된 슬라이드의 편광을 사용하여 애플 그린 굴절률에 대해 $A\beta$ 축적물을 분석하였다.

상기 조직화학적 관점에서, 모든 관상 섹션에서 Tau-2에 반응을 나타낸 세포의 수를 세면서 0부터 2의 점수로 반응적인 성상 세포작용을 추산하였다.

1 내지 2의 양성 발색을 나타낸 동물을 양성반응으로 간주하였다.

실험과정 및 결과

각 실험에 대해, 4개 군의 랫트를 사용하였다.

1. VEH 1 + VEH 2 군: 편도핵에 VEH 1(TFA) 및 피하 경로로 VEH 2(생리적 용액)을 주입한 랫트;
2. $A\beta$ + VEH 2 군: 편도핵에 $A\beta$ 25-35 및 피하 경로로 VEH 2(생리적 용액)을 주입한 랫트;
3. $A\beta$ + TGSS 군: 편도핵에 $A\beta$ 25-35 및 피하 경로로 TGSS를 주입한 랫트;
4. VEH 1 + TGSS 군: 편도핵에 VEH 1(TFA) 및 피하 경로로 TGSS를 주입한 랫트.

각 실험은 군당 적어도 6마리의 랫트를 포함하도록 고안되었다.

상기 실험계획에 따라, 하기와 같이 서로 다른 평균 분자량을 갖는 3가지 유형의 TGSS를 사용하였다:

C3 – 2,400 돌턴, at 2.5mg/kg s.c. dose

C8 – 640 돌턴, at 2.5mg/kg s.c. dose

C7 – 4,800 돌턴, at 2.5mg/kg s.c. dose

결과를 검증하기 위해 각각의 TGSS에 대해 두 번 실험하여 연구하였다.

각각의 처리군에 대해 하기 표 3에 있는 숫자의 동물을 분석하였다.

[표 3]

처리	동물 수
1. VEH 1 + VEH 2	30
2. $A\beta$ + VEH 2	36
3a. $A\beta$ + C3	23
3b. $A\beta$ + C8	17
3c. $A\beta$ + C7	21
4. VEH 1 + TGSS(C3 or C7 or C8)	30

편도핵 내로 VEH 1(아밀로이드가 없는 대조군) 및 TGSS C3, C8, C7 중 어느 하나를 처리한 동물은 VEH 1 + VEH 2로만 처리된 1 군과 실제적으로 동일한 결과를 나타내었다.

a) Tau-2 단백질에 대한 반응성(반응을 나타낸 세포의 수): 평균값 \pm 표준편차.

[표 4]

처 리	경우의 수	조직 섹션 당 반응세포 수
1. VEH 1 + VEH 2	30	11±5
2. A β + VEH 2	36	66±12
3a. A β + C3	23	25±16 p<0.05 vs A β + VEH 2 (Newman-Keuls 시험)
3b. A β + C8	17	60±14
3c. A β + C7	21	22±17 p<0.05 vs A β + VEH 2 (Newman-Keuls 시험)
4. VEH 1 + TGSS(C3 or C7 or C8)	30	10±3

상기 일련의 실험으로부터, C3 및 C7 모두 Tau-2 단백질에 대한 반응성을 감소시키는 반면, 이당류에 해당하는 가장 낮은 분자량을 갖는 C8은 반응성을 나타내지 않았다.

A β 로 처리되지 않은 대조군은 생리적 용액(1 군) 또는 TGSS(4 군)를 피하경로로 주입했을 때와 똑같은 결과를 나타내었다.

C3 화합물 효과를 통한 Tau-2 단백질에 대한 반응성의 강력한 감소는 C3를 또한 경구투여한 실험에 의해 확인하였다.

C3를 20mg/kg의 용량으로 피하경로보다는 경구투여하였다는 차이만 있을 뿐, 실험모델 및 스크리닝 방법은 상기 기술된 것과 동일하였다.

A β 25-35 주입 3일 전부터 주입 후 14일까지 하루에 한 번 C3 투여를 행하였다.

A β 25-35 주입 후 14일 째 랫트를 희생시켰다.

얻어진 결과를 하기 표 5에 나타내었는데, C3가 A β 25-35를 처리한 랫트에서 Tau-2 단백질에 대한 반응성을 대단히 감소시켰음을 관찰할 수 있다.

[표 5]

처 리	경우의 수	조직 섹션 당 반응세포 수
1. A β + VEH 2	6	52±7
2. A β + C3	6	9±2 p < 0.01 (Student T test)

b) 성상세포의 반응성(+1 또는 +2의 반응성을 나타내는 동물의 %): 평균값

[표 6]

처 리	경우의 수	조직 섹션 당 반응세포 수
1. VEH 1 + VEH 2	30	37
2. A β + VEH 2	36	87

3a. A _β + C3	23	35 p<0.05 vs A _β + VEH 2 (χ^2 sec. Fisher)
3b. A _β + C8	17	88
3c. A _β + C7	21	67
4. VEH 1 + TGSS(C3 or C7 or C8)	30	26

성상세포 반응성에 대하여, 유의적인 활성을 나타낸 유일한 물질은 C3(3a 군)이다. C8 및 C7 (3b 군 및 3c군)은 활성을 나타내지 않았다.

상기 조사 결과로부터, 2,400 돌턴의 평균 분자량을 갖는 C3 TGSS가 각각 높거나 낮은 분자량을 갖는 TGSS 보다 훨씬 높은 활성을 가지고 있다는 것을 알 수 있다. 특히, 2,400 돌턴의 평균 분자량은 Tau-2 단백질에 대한 반응성 감소 및 성상세포 반응에 대한 반응성 감소에 최적이다.

랫트에 대한 또 다른 실험에서, C3 산물이 정맥내 투여후 혈액뇌관문을 통과하는지를 연구하였다.

상기 목적을 위해, 삼중수소(tritium)으로 표지된 산물을 사용하였다.

표지는 700,000 DPM/mg ³H-C3에 해당한다.

정맥내 경로로 2.5mg/kg 투여후, 45분 고정된 시간에서 펜토바비탈 나트륨으로 마취하에 랫트를 희생하였다.

혈액, 뇌척수액 및 뇌(혈관으로부터 혈액을 제거하기 위한 주입 후)의 표지 수준을 분석하였다.

유리 모세관으로 4번 째 뇌 공동(ventricle)으로부터 뇌척수액을 취하였다(혈액 완전 제거 후 200 μ l보다 항상 큰 양으로).

20 μ l 뇌균질액을 5ml의 생리적 용액에 희석하여 액체섬광 계수기로 DPM을 측정하였다.

하기 표 7에 보고된 결과는 ³H-C3의 유의적인 양이 혈액뇌관문을 통과한다는 것을 보여준다.

[표 7]

조 직	경우의 수	DPM/ml
혈청	5	404±138.3
뇌척수액	5	85±13.0
뇌	5	217±217.2

대조군에서, DPM/ml 값은 모든 분석 조직에서 항상 41보다 낮았다.

상기 실험후, 혈청, 뇌척수액 및 뇌에서 항 Xa 활성의 존재여부를 측정하였다. 인자 Xa(혈액응고 X 인자)는 4개 이상의 연결된 단량체를 포함하는 황-올리고당 분획에 의해서만 억제된다는 것이 알려져 있다.

상기 실험과 같이 처리된 랫트에서, 2.5mg/kg 투여용량으로 C3를 정맥내 투여한지 45분후, 혈장, 뇌척수액 및 뇌 조직에서 항 Xa 활성이 유의적으로 존재함을 관찰하였다.

상기 관찰은 혈액뇌관문을 통과한 산물이 C3로 구성되며 이당류나 사당류같은 분해산물로 구성되어 있지 않다는 것을 확인시켜 준다.

C3와 함께 또는 없이 A β 25-35를 주사한 랫트에서, 신경세포 성장을 또한 분석하였다.

상기 목적을 위해서, 속성 골지 착색법(Rapid Golgi coloration method)을 사용하였으며, 전기 방법의 복잡성 때문에 제한된 숫자의 동물에만 적용하였다.

이미 상기 기술된대로, A β 25-35의 뇌 속 주입 2일전부터 32일 동안 하루 2번 2.5mg/kg의 투여용량으로 피하경로로 C3를 투여하였다.

뇌 대회(cingulate gyrus)의 V 층의 뇌신경세포를 분석하였다.

수상세포(dendrite) 길이 및 말단 가지(end branch)와 원초 가지(primitive branch)의 수 사이의 비율(T/B ratio)을 측정하였다.

T/B 비율이 높을수록 신경세포 연결의 숫자 및 복잡성이 더욱 커진다.

결과를 하기 표 8에 나타내었다.

[표 8]

처 리	경우의 수	수상세포 길이 %	T/B 비율
VEH 1 + VEH 2	7	100 \pm 2.1	4.3 \pm 0.15
A β + VEH 2	8	94 \pm 2.0	4.0 \pm 0.16*
A β + C3	6	110 \pm 3.0	4.7 \pm 0.19**

* p < 0.05 A β + VEH 2 Vs VEH 1 + VEH 2

** p < 0.05 A β + VEH 2 Vs A β + C3

상기 표는 A β 가 신경세포 성장에 손상을 입히며 C3가 손상을 치료한다는 것을 보여준다. 게다가, C3가 신경쇠퇴 및 신경 손상을 입히는 외상의 경우에 아주 유용한 신경성장(neurotrophic) 활성을 가지고 있다는 것을 알아차릴 수 있다.

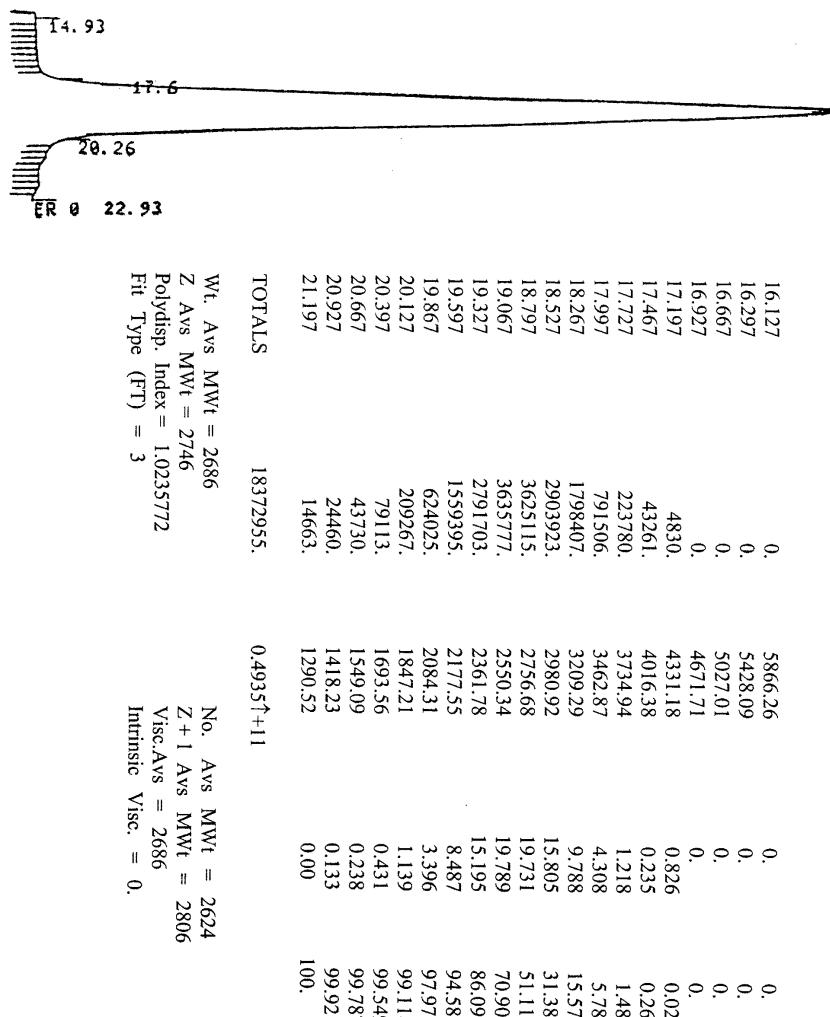
도면의 간단한 설명

도 1은 기술된 실시예에 의해 획득된 평균 문자량 2,400 돌턴(\pm 200)을 갖는 글라이코자미노글리칸의 HPLC 테스트를 나타낸 그림이다.

도 2는 기술된 실시예에 의해 획득된 평균 문자량 2,400 돌턴(\pm 200)을 갖는 글라이코자미노글리칸의 NMR 테스트를 나타낸 그림이다.

도면

도면1



도면2

