



(51) 국제특허분류:

A61K 31/575 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61K 31/702 (2006.01) A61P 1/04 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2011/002490

(22) 국제출원일:

2011년 4월 8일 (08.04.2011)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **경북대학교 산학협력단 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 대구시 북구 산격동 1370 번지 경북대학교 내, 702-701 Daegu (KR).

(72) 발명자: 겸

(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **강영모 (KANG, Young Mo)** [KR/KR]; 대구광역시 수성구 황금동 캐슬골드파크 1407 동 1501 호, 706-040 Daegu (KR). **변영로 (BYUN, Young Ro)** [KR/KR]; 서울특별시 도봉구 도봉2동 한신아파트 118 동 1708 호, 132-731 Seoul (KR). **강진희 (KANG, Jin Hee)** [KR/KR]; 대구광역시 동구 신서동 513-1 신일해피트리 102 동 702 호, 701-794 Daegu (KR). **황승림 (HWANG, Seung Rim)** [KR/KR]; 서울특

별시 송파구 문정동 올림픽해밀리타운 307 동 1002 호, 138-769 Seoul (KR).

(74) 대리인: **이희숙 (LEE, Hee Sook)** 등; 서울시 강남구 역삼동 테헤란로 33 길 11 JS 빌딩 9층 시원국제특허법률사무소, 135-915 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

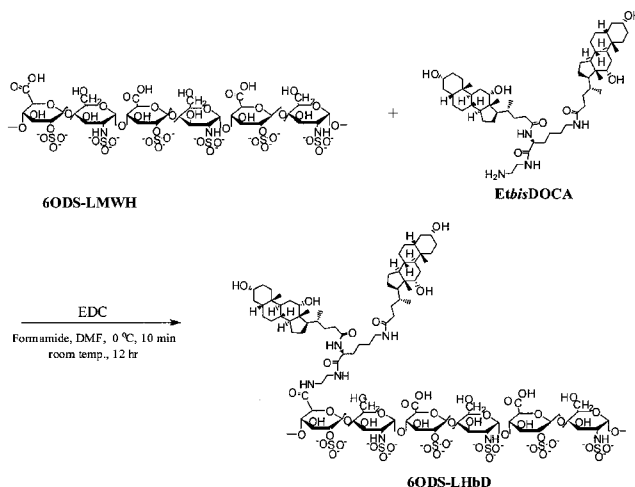
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: USES OF A DESULFATED HEPARIN-BILE ACID DERIVATIVE FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF INFLAMMATORY DISEASES

(54) 발명의 명칭: 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체의 염증성 질환의 예방 및 치료 용도

Fig. 3



(57) Abstract: The present invention relates to the uses of a desulfated heparin-bile acid derivative for the prevention and treatment of inflammatory diseases. More particularly, the present invention relates to a composition for preventing and treating inflammatory diseases, which includes a heparin-bile acid derivative the anticoagulation reactive site of which is partially desulfated in order to enhance absorbability into the body and reduce the side effects thereof, to the uses of the desulfated heparin-bile acid derivative for the prevention and treatment of inflammatory diseases, and to a method for preventing and treating inflammatory diseases using the desulfated heparin-bile acid derivative. The novel desulfated heparin-bile acid derivative improves the absorption of heparin drugs into the body through the combination thereof with bile acid in order to utilize the anti-inflammatory activity of heparin, and reduces side effects such as bleeding caused by the anticoagulation activity of heparin drugs due to the partial desulfation of the heparin.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

**규칙 4.17 에 의한 선언서:****공개:**

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v)) — 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체의 염증성 질환의 예방 및 치료 용도에 대한 것으로, 보다 상세하게는 체내 흡수 촉진 및 부작용의 개선을 위하여 항응고 활성 부위를 부분적으로 탈황산화 시킨 헤파린 담즙산 유도체를 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물, 염증성 질환의 예방 및 치료를 위한 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체의 용도 및 상기 탈황산화된 헤파린 담즙산 유도체를 이용한 염증성 질환의 예방 및 치료 방법에 관한 것이다. 상기 신규한 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체는 헤파린의 항염 활성을 이용하기 위하여, 담즙산염을 결합하여 헤파린 제제의 체내 흡수를 증진시키고, 헤파린의 부분적 탈황산화로 인하여 헤파린 제제의 항 응고 활성에 의한 출혈 등의 부작용이 감소된 효과를 가진다.

【명세서】

【발명의 명칭】

탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체의 염증성 질환의 예방 및 치료 용도

【기술분야】

- <1> 본 발명은 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체의 염증성 질환의 예방 및 치료 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체를 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물, 상기 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체의 염증성 질환의 예방 및 치료 용도 및 이를 이용한 염증성 질환의 예방 및 치료 방법에 관한 것이다.

<2>

【배경기술】

- <3> 염증 반응은 손상이나 박테리아, 곰팡이, 바이러스 등 외부 물질에 의해 자극되어 각종 염증 매개 인자 및 면역 세포에 의한 효소의 활성화, 염증 매개물질 분비, 체액 침윤, 세포의 이동, 조직 파괴 등 일련의 복합적인 생리적 반응이 일어나는 것을 말하며, 이로 인해 홍반, 부종, 발열, 통증 등과 같은 증상이 수반된다. 염증 반응은 외부 감염원을 제거하고 손상된 조직을 재생하여 생명체의 기능을 회복시키는 작용을 하지만, 항원이 제거되지 않거나, 내부 물질이 원인이 되는 등 염증 반응이 과도하거나 지속적으로 일어나면 오히려 점막 손상, 조직 파괴 등이 일어나고, 암, 염증성 피부 질환, 관절염 등을 초래하기도 한다.
- <4> 현재까지는 상기 염증성 질환의 치료를 위하여 주로 항 히스타민제, 비타민 연고, 부신피질호르몬제가 사용되어 왔으나, 이러한 약물은 그 효과가 일시적인 것이 대부분이고, 부작용이 심하여 염증성 질환의 치료 효과가 있는 새로운 물질의 개발이 요구되고 있다.

<5>

- <6> 특히, 상기 염증성 질환 중에서도 관절염은 관절에 어떤 원인에 의해서든 염증성 변화가 생긴 것을 총괄해서 지칭하는 병명으로 뼈와 뼈 마디를 연결하여 매끈하게 움직이게 하는 연골이 소실되는 것을 말한다. 관절염은 퇴행성관절염 또는 골관절염, 류마티스 관절염, 대퇴골두 무혈성괴사, 외상성 관절염, 결핵 및 화농성 관절염 등 여러 종류로 나뉜다.

<7>

골관절염(퇴행성 관절염)은 관절을 구성하는 여러가지 성분 중에서 연골과 그 주위의 뼈에 퇴행성 변화가 나타나서 생기는 관절염으로 주로 체중을 많이 받는

관절, 즉 무릎 관절, 엉덩이 관절 등에 심한 통증이 나타나고 움직이기가 힘들어지며 오랫동안 방치할 경우 관절의 변형까지 초래하는 관절 질환이다. 골관절염은 크게 두 가지 원인이 있는데 관절의 연골이나 뼈는 정상적인데 비해 관절에 과도한 부하가 걸려 관절 조직이 손상을 받거나, 부하는 정상적인데 비해 관절의 연골이나 뼈가 약한 경우가 있다.

- <8> 또한, 류마티스 관절염 (rheumatoid arthritis: RA)은 연골의 파괴와 뼈의 침식을 수반하는 관절의 만성염증성 질환으로서, 면역계가 깊이 관여하는 자기면역 질환의 하나이다. 마우스나 랫트를 II형 콜라겐으로 면역하여 콜라겐 유도성 관절염(collagen-induced arthritis, 이하, 편의상 '라 칭함)을 유도하여 이를 사람 RA의 동물 실험모델로 사용하고 있다.
- <9> 류마티스 관절염이 발병되면 여러 가지 염증 세포의 침윤과 관절 내의 만성 염증 반응이 일어나고 pannus의 형성으로 인하여 연골조직의 파괴와 관절 뼈조직의 부식 및 변형을 초래하게 된다 (Cai L et al., *Cytokine.*, 16(1): 10-21, 2001).
- <10> 류마티스 관절염의 원인은 아직까지 정확하게 규명되지 않았으나, 어떤 항원 물질에 대한 생체 면역 반응의 결과 생산되는 cytokine을 비롯한 주요 면역 반응 매개 물질의 작용에 의해 지속적인 염증 반응이 나타남으로써 연골조직이 손상되고 뼈의 손상을 가져와 관절 기능을 제대로 할 수 없게 되는 것으로 알려져 있다 (Feldmann M et al., *Annu Rev Immunol.*, 14: 397-440, 1996).
- <11>
- <12> 특히, TNF-, IL-1 그리고 IL-6와 같은 염증성 cytokine이 염증 반응 및 관절 손상에 주요 역할을 하는 것으로 보고되어 있고 실제로 류마티스 관절염이 유발된 환자들의 관절 부위에서 많이 발견된다. 관절 내 뼈의 손상은 pannus의 침습에 의하여 일어난다(de Hooge AS et al., *Am J Pathol.*, 157(6): 2081-2091, 2000; Cai L et al., *Cytokine.*, 16 (1): 10-21, 2001; Feldmann M et al. *Annu Rev Immunol.*, 14: 397-440, 1996).
- <13> 종래의 류마티스 관절염에 대한 가장 보편적인 치료 방법은 비스테로이드성 소염제 및 항류마티스 약제 등의 이용이다. 비록 이러한 약물의 이용은 통증을 완화시키고 염증을 억제하며 관절의 기능 소실을 최소화하는 효과를 나타내고 있으나 여러 장기의 기능 저하, 우울증, 세균감염 등의 심각한 부작용이 발생할 수 있다 (The clinical management of rheumatoid arthritis and osteoarthritis: strategies for improving clinical effectiveness. *Br J Rheumatol.* 37(5): 546-554, 1998). 따라서 부작용이 적고 안전성이 높은 더욱 효과적인 류마티스 관절염

치료법의 지속적 개발이 요구되고 있다. 최근 류마티스 관절염 치료제 개발의 국제적 동향으로 생물학적 제제 개발이 신약개발 연구의 주류를 이루고 있으며 병인기전에 근거한 TNF-blocker 개발 후 획기적인 치료 효과로 단기간 내에 높은 매출을 달성하였고 고부가 가치를 창출하였다. 그러나, 현재까지 개발한 대부분의 생물학적 제제는 주사제형이므로, 경구제제에 비해 환자들의 사용에 있어 순응도가 낮고 불편하며 보관이 어렵고 주사 시, 부작용의 위험도가 높은 점 등의 단점이 있다.

<14> 헤파린은 glucuronic acid와 glucosamine 구조가 반복되는 다당류의 일종으로, 근육, 폐, 흉선 및 비장에 존재하는 결합조직 비만 세포에 의해 분비된다. 헤파린은 항응고 활성(anticoagulant activity)뿐만 아니라, 항염증 작용 및 혈관 신생 억제 효과도 가지고 있다. 헤파린은 큰 분자량 및 음성 전하(negative charge)로 인하여 위장관 내(GI tract)에서 흡수되기 어려우며, 헤파린의 친수성에 따른 상피막(epithelial membrane)의 극성 그룹의 반발 작용 및 낮은 투과율로 인하여 상피 세포(epithelial cells)의 투과가 어렵다고 알려져 있다(L.B.Jaques, 31 *Pharmacology rev.*, 100-166, 1980; D.A. Norris *et al.*, 34 *Advanced Drug Delivery Reviews*, 135-154, 1998).

<15> Lee 등은 헤파린의 소수성을 증가시키기 위하여 헤파린과 소수성 물질이 결합된 헤파린 유도체를 제조하였다(Y. Lee *et al.*, 17 *Pharm. Res.*, 1259-1264(2000); Y. Lee *et al.*, 92 *Thromb. Res.*, 149-156 (1998); U.S. Patent No. 09/300,173, U.S. Patent No. 09/852131). 여러 유도체 중 헤파린과 데옥시콜린산(DOCA)의 유도체가 위장 내에서 가장 높은 흡수를 나타내었으며, 이러한 결과는: (1) 소수성 물질과의 결합에 의한 헤파린의 소수성 증가; 그리고 (2) 회장에서 상기 결합된 DOCA와 담즙산 수용체와의 상호 작용에 의해 설명될 수 있다.

<16> 헤파린을 특정 질환에 대한 치료 제제로 이용하기 위하여, 상기와 같이 흡수율이 증가된 형태의 유도체를 개발하였으나, 헤파린이 가진 항응고 활성에 의한 출혈 등의 부작용이 있는 것으로 나타났다. 또한 헤파린과 담즙산 유도체의 결합된 형태를 관절염 치료제로 이용한 예는 아직까지 공지된 바 없으며, 특히, 관절염 치료시 부작용에 해당하는 항 응고 활성을 저하시킨 경구용 제제로서의 헤파린-담즙산 유도체에 대한 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

<17>

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

<18> 이에 본 발명의 발명자들은 상기 헤파린 담즙산 유도체의 관절염 경구 투여

제제에 대하여 연구하던 중, 규칙적인 서열 이외에 항트롬빈 활성 부위에 상응하는 서열 부위의 화학적 변형은 항트롬빈에 대한 헤파린의 친화성을 감소시키며, 이러한 방식으로 헤파린의 항응고 효과를 감소시킬 수 있다는 사실을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

<19> 따라서 본 발명의 목적은, 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체를 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

<20> 본 발명의 다른 목적은, 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체의 신규한 용도로서, 염증성 질환의 치료제로서의 용도를 제공하는 것이다.

<21> 본 발명의 또 다른 목적은, 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체를 이용한 염증성 질환의 치료 방법을 제공하는 것이다.

<22>

【기술적 해결방법】

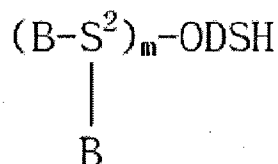
<23> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, B는 담즙산 잔기 또는 담즙산 유사체이고, ODSH는 탈황산화된 헤파린 잔기이고, S^1 또는 S^2 는 스페이서이고, m은 0 내지 16인 정수이고, B의 3번 탄소에 S가 결합하는 하기 화학식 1 또는 화학식 2

<24> <화학식 1>



<25>

<26> <화학식 2>



<27>

<28> 로 표시되는 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

<29>

<30> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 염증성 질환의 치료용 제제를 제조하기 위한 물질로서, 상기 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체들의 용도를 제공한다.

<31>

<32> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 상기 탈황산화된 헤파린

파린-담즙산 유도체를 이를 필요로 하는 개체에 유효량으로 투여하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료 방법을 제공한다.

<33>

<34> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<35>

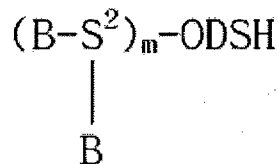
<36> 본 발명은 B는 담즙산 잔기 또는 담즙산 유사체이고, ODSH는 탈황산화된 헤파린 잔기이고, S^1 또는 S^2 는 스페이서이고, m은 0 내지 16인 정수이고, B의 3번 탄소에 S가 결합하는 하기 화학식 1 또는 화학식 2

<37> 화학식 1



<38>

<39> 화학식 2



<40>

<41> 로 표시되는 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

<42>

<43> 상기 화학식 1 및 2에서 B로 표시되는 담즙산 잔기는 이에 제한되지는 않으나, 콜린산(cholic acid), 데옥시콜린산(deoxycholic acid), 케노디옥시콜린산(chenodeoxycholic acid), 리토콜린산(lithocholic acid), 우르소콜린산(ursocholic acid), 우르소디옥시콜린산(ursodeoxycholic acid), 이소우르소디옥시콜린산(isoursodeoxycholic acid), 라고디옥시콜린산(lagodeoxycholic acid), 글리코콜린산(glycocholic acid), 타우로콜린산(taurocholic acid), 글리코디옥시콜린산(glycodeoxycholic acid), 글리코케노디옥시콜린산(glycochenodeoxycholic acid), 디히드로콜린산(dehydrocholic acid), 히오콜린산(hyocholeic acid) 또는 히오디옥시콜린산(hyodeoxycholic acid) 잔기일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 데옥시콜린산일 수 있다.

<44>

<45> 또한 상기 화학식 1 및 2에서 ODSH로 표시되는 헤파린 잔기는 2-O 또는 6-O 부분이 탈황산화된 것이 특징이다. 이러한 특징으로 인하여 헤파린이 가지는 항응

고 활성이 저해되는 것이며, 경구 투여용 제제로서 상기 물질을 활용할 수 있게 된다.

<46>

<47> 상기 탈황산화된 헤파린 잔기에서 헤파린의 경우, 이에 제한되지는 않으나, 비분획 헤파린(unfractionated heparin), 고분자량 헤파린, 저분자량 헤파린, 헤파린 단편(heparin fragments), 재조합 헤파린, 헤파린 유사체, 헤파란(heparan) 설페이트, 헤파린 활성을 갖는 설펜화된 다당류(sulfonated polysaccharides) 등과 같이 모든 형태의 헤파린일 수 있고, 더욱 바람직하게는 저분자량 헤파린(Low molecular weight heparin)일 수 있다.

<48>

<49> 또한, 상기 화학식 1 및 2에서 S로 표시되는 스페이서는 이에 제한되지는 않으나, 알킬 사슬, 폴리에틸렌글리콜, 에틸렌디아민 또는 라이신 잔기일 수 있고, 바람직하게는 에틸렌디아민 또는 라이신일 수 있다.

<50>

<51> 본 발명의 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체는 부분적으로 탈 황산화된 저분자량 헤파린(LMWH)에 담즙산을 결합시킨 것으로, 저분자량 헤파린의 2-O를 탈황산화하여 담즙산을 결합시킨 헤파린-담즙산 유도체를 2ODS-LHD로, 저분자량 헤파린의 2-O를 탈황산화하여 담즙산을 bis 형태로 결합시킨 헤파린-담즙산 유도체를 2ODS-LHbD1으로, 저분자량 헤파린의 6-O를 탈황산화하여 담즙산을 결합시킨 헤파린-담즙산 유도체를 6ODS-LHD로, 저분자량 헤파린의 6-O를 탈황산화하여 담즙산을 bis 형태로 결합시킨 헤파린-담즙산 유도체를 6ODS-LHbD1으로 명명하였다.

<52>

<53> 헤파린은 항응고 활성을 가지는 혈액 내 물질인, 항염증 및 혈관 신생 억제 작용을 가지고 있다고 알려져 있다. 그러나 헤파린은 분자량이 크고, 음성 전하를 띄어 체내 흡수가 쉽지 않으며, 이를 해결하기 위하여 소수성 물질과 결합된 형태의 헤파린 유도체를 제조하여 제제화하여 이용하고 있다. 그러나, 헤파린의 항응고 활성에 의하여 장기간 투여 시, 특히 경구 투여용 제제의 경우, 출혈 등이 유발된다는 문제가 있다.

<54>

<55> 본 발명은 상기 헤파린 제제의 부작용을 해소하기 위하여, 헤파린에 존재하는 항 트롬빈 결합 부위를 화학적으로 변형시켜, 항응고 활성이 저하된 헤파린-담즙산 유도체를 제공하기 위하여, 항 트롬빈 결합 부위에 존재하는 2-O 또는 6-O를

탈황산화시켜 상기 문제를 해결하였다.

<56>

<57> 따라서 본 발명의 조성물의 유효 성분으로서 헤파린-담즙산 유도체는 헤파린의 항 트롬빈 부위에 존재하는 2-O 또는 6-O가 부분적으로 탈황산화된 것이 특징이며, 이러한 특징은 본 발명의 조성물을 경구 투여할 경우, 복강 내 출혈 등의 부작용이 발생하지 않고, 장 내 흡수가 증가된 형태의 헤파린 제제를 제조할 수 있도록 한다.

<58>

<59> 상기 본 발명의 조성물이 적용될 수 있는 염증성 질환은 NO, iNOS, COX-2, PGE2, TNF-, IB 등과 같이 일련의 염증 반응을 일으키는 다양한 자극 요인들로 인하여 유발된 염증을 동반하는 질환을 말한다.

<60>

<61> 상기 염증성 질환은 이에 제한되지는 않으나, 부종 등과 같은 일반적인 염증 증상을 포함하여 염증성 장 질환, 복막염, 골수염, 봉소염, 채장염, 외상 유발 쇼크, 기관지 천식, 알러지성 비염, 낭포성 섬유증, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 급성 세기관지염, 만성 세기관지염, 골관절염, 통풍, 척추관절병증, 강직성 척추염, 라이터 증후군, 건선성 관절병증, 장질환 척추염, 연소자성 관절병증, 연소자성 강직성 척추염, 반응성 관절병증, 감염성 관절염, 후-감염성 관절염, 임균성 관절염, 결핵성 관절염, 바이러스성 관절염, 진균성 관절염, 매독성 관절염, 라임 병, '혈관염 증후군'과 관련된 관절염, 결절성 다발동맥염, 과민성 혈관염, 루게닉 육아종증, 류마티스성 다발성근육통, 관절 세포 동맥염, 칼슘 결정 침착 관절병증, 가성 통풍, 비-관절 류마티즘, 점액낭염, 건초염, 상과염(테니스 엘보), 신경병증성 관절 질환(neuropathic joint disease; 또는 'charcot joint'이라고도 함), 출혈성 관절증(hemarthrosic), 헤노흐-셴라인 자반병, 비후성 골관절병증, 다중심성 세망조직구종, 척추측만증(scoliosis), 혈색소증, 혈색소병증, 고지단백혈증, 저감마글로불린혈증, 가족성 지중해열(familial Mediterranean fever), 베하트 병, 전신성 홍반성 루푸스, 재귀열, 다발성 경화증, 폐혈증, 폐혈성 쇼크, 급성 호흡곤란 증후군, 다발성 장기부전, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 급성 폐손상(acute lung injury) 및 기관지 폐 형성장애(broncho-pulmonary dysplasia) 등을 포함할 수 있고, 바람직하게는 퇴행성 관절염, 골 관절염 및 류마티스성 관절염일 수 있다.

<62>

<63> 본 발명의 상기 조성물은 제형 및 투여 방법에 따라, 약학적 조성물 또는 식품 조성물로 제조될 수 있다.

<64>

<65> 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 조성물을 단독으로 함유하거나 또는 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 함유할 수 있다. 상기에서 약학적으로 허용되는 '이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다.

<66>

<67> 본 발명의 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체는 그 자체 또는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기에서 약학적으로 허용되는 이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때 통상적으로 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 말하며, 상기 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하다. 상기 유리산은 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탄산 및 아스파르트산을 포함한다. 또한, 상기 무기산은 이에 제한되지 않으나, 염산, 브롬산, 황산 및 인산을 포함한다.

<68>

<69> 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

<70>

<71> 본 발명의 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물은 이에 제한되지는 않으나, 인간을 비롯한 포유동물에 경구 투여 방식으로 투여되는 것을 특징으로 한다. 따라서, 상기 약학적 조성물은 경구용 제제로 제형화할 수 있다.

<72>

<73> 경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된

방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성 성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로즈 등을 포함하는 셀룰로즈류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 봉해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 항응집제, 윤향제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 이와 같이 본 발명의 탈황산화된 저분자량 헤파린-담즙산 유도체를 포함하는 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트포키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼(wafer)등의 형태로 제조할 수 있으며 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 포함제 형태로 제조할 수 있다. 바람직하게는 본 발명에 따른 약학적 조성물 0.001~99.999중량% 및 약학적으로 허용되는 담체 99.999~0.001중량%를 포함할 수 있다.

<74>

<75>

본 발명의 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리 할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 캡시에이트 또는 디하이드로캡시에이트의 바람직한 전체 용량은 1일당 환자 체중 1 당 약 0.01 내지 1,000 mg, 가장 바람직하게는 0.1 내지 100 mg일 수 있다. 그러나 상기 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체의 용량은 약학적 조성물의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설율등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체를 관절염의 예방 또는 치료제로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 특히 경구용 제제로 제형화되며, 경구 투여 방식으로 투여할 수 있도록 만드는 것이 특징이다.

<76> 나아가, 상기 약학 조성물은 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

<77>

<78> 식품 조성물의 경우, 상기 본 발명의 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태를 포함한다.

<79>

상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다. 이에 한정되지 않지만 예를 들면, 건강식품으로는 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체를 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용할 수 있도록 액상화, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체와 염증성 질환에 효과가 있다고 알려진 공지의 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다. 또한, 기능성 식품으로는 이에 한정되지 않지만 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지 콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 젓, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체를 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체를 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다.

<80>

본 발명의 식품 조성물 중 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체의 바람직한 함유량으로는 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 최종적으로 제조된 식품 중 0.1 내지 90 중량%이다. 더 바람직하게는, 본 발명의 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체를 유효성분으로 함유하는 식품 조성물은 특히, 염증성 질환에 효과가 있는 것으로 알려진 활성 성분과 함께 혼합하여 건강식품의 형태로 제조될 수 있다.

<81>

<82>

본 발명의 조성물은 염증성 질환에 치료 효과를 가지는 것이며, 특히 관절염의 예방 및 치료에 효과를 가진다. 상기 관절염은 이에 제한되지는 않으나, 퇴행성 관절염, 골 관절염, 류마티스 관절염 및 화농성 관절염일 수 있고, 특히 류마티스 관절염일 수 있다.

<83>

<84>

본 발명의 일 실시예에서는 콜라겐을 주입하여 콜라겐 유도성 관절염(CIA;

Collagen induced arthritis)을 유발시킨 마우스를 대상으로 하여 본 발명의 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체의 관절염 치료 효과를 확인하였으며, 이는 류마티스성 관절염에 대한 치료 효과를 시험할 때 일반적으로 사용하는 모델이다.

<85>

<86>

상기 관절염, 특히 류마티스 관절염에 대한 본 발명 조성물의 작용 기전을 알아보기 위하여, 본 발명의 일 실시예에서는 관절부위의 염증이 진행될수록 조직 내 활막세포의 과증식 및 염증관련 세포의 유입량이 증가하게 되는데 헤파린 유도체가 세포와의 결합을 통해 염증진행을 조절할 수 있는지 조사하고자 하였다. 헤파린이 인테그린 매개 세포의 부착에 영향을 미친다는 사실은 이미 공지되어 있으며, 조직내 피브로넥틴과 같은 기질의 단백 구조 내 헤파린 결합 도메인이 존재하여 헤파린과 세포간 혹은 헤파린과 조직 내 기질의 단백질간의 결합을 통해 염증 작용에 영향을 줄 것이라 예상할 수 있다. 또한 염증진행에 있어 면역림프구의 작용면에서 T 세포가 염증부위로 작용하기 위해서는 내피세포에 발현하는 L-셀렉틴, P-셀렉틴과의 결합을 통해 혈액 내 부유 T 세포가 혈관내벽으로 부착과 이동을 거듭하면서 (Rolling Events) 염증조직내로 유입되는 과정을 거치게 된다. 본 실시예에서는 구조변형 헤파린 유도체에 의한 활막세포의 부착정도를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 그 결과, 본 발명의 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체의 경우, 셀렉틴의 활막 세포에 대한 부착 정도를 차단하는 효과를 가진다는 것을 확인하였다. (실시예 3)

<87>

<88>

또한, 본 발명은 염증성 질환의 치료용 제제를 제조하기 위한 물질로서, 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체는 염증성 질환에 대하여 치료 및 예방 효과를 가진다.

<89>

<90>

아울러, 본 발명은 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 부분적으로 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체를 이를 필요로 하는 개체에 유효량으로 투여하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료 방법에 관한 것이다.

<91>

본 발명의 조성물의 투여 방법은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 경구 투여 방식인 것으로 하며, 투여량은 환자의 상태 및 질병의 강도에 따라 차이를 두어 투여할 수 있다.

<92>

<93> 본 발명에서 '유효한 양'이라 함은 본 발명의 조성물 또는 제제가 투여 대상인 개체 내에서 약물이 전달되거나 항응고 억제 효과 또는 염증성 질환을 예방 또는 치료하는 효과를 나타내는 양을 말하며, 상기 '개체(subject)'란 동물, 바람직하게는 포유동물, 특히 인간을 포함하는 동물일 수 있으며, 동물에서 유래한 세포, 조직, 기관 등일 수도 있다. 상기 개체는 치료가 필요한 환자(patient)일 수 있다.

<94>

【유리한 효과】

<95> 본 발명은 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체의 염증성 질환의 예방 및 치료 용도에 관한 것으로, 헤파린의 항응고 활성을 저하시키기 위하여 항응고 활성 부위를 부분적으로 탈황산화시킨 헤파린과 담즙산의 신규한 유도체의 염증성 질환의 예방 및 치료 용도에 관한 것이다. 본 발명의 상기 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물 제조 시, 경구 투여에 적합한 형태로 제형화가 가능하다.

<96>

【도면의 간단한 설명】

<97> 도 1은 데옥시콜린산(DOCA)으로부터 EtDOCA를 합성하는 단계를 모식화한 것이다.

<98> 도 2는 2-O-탈황산화된 헤파린과 데옥시콜릴에틸렌디아민을 bis로 결합하여 20DS-LHbD1를 합성하는 단계를 모식화한 것이다

<99> 도 3은 6-O-탈황산화된 헤파린과 데옥시콜릴에틸렌디아민을 bis로 결합하여 60DS-LHbD1를 합성하는 단계를 모식화한 것이다.

<100> 도 4는 20DS-LHbD1를 처리한 CIA 생쥐 모델 관절 조직에서 염증 매개 물질의 전사체 수를 측정한 값이다(Control: 헤파린-담즙산 유도체 대신 PBS를 투여한 대조군; 20DS-LHbD1 1mg/kg, 20DS-LHbD1 10mg/kg: 매일 1mg/kg체중, 10mg/kg체중의 양으로 20DS-LHbD1을 투여한 군; TNF-: 종양괴사인자알파; RANKL: Receptor Activator for Nuclear Factor B Ligand; IL-1: 인터류킨1베타; CCL-2: 케모카인(C-C 모티프) 리간드 2; MMP-1: 매트릭스 메탈로프로티나아제-1; MMP-3: 매트릭스 메탈로프로티나아제-3; IL-6: 인터류킨6; VCAM-1: 도관세포 접착 분자-1).

<101> 도 5는 생쥐 관절염 유발 모델(CIA) 모델에서 20DS-LHbD1에 의한 치료적 반응을 eXplore Optix System을 이용하여 관절염의 활성도를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

<102> 도 6은 20DS-LHbD1을 처리한 후, eXplore Optix System을 이용하여 관절염의

활성도를 정량적으로 결과(도 5A) 및 임상관절염지수로 측정한 결과(도 5B)를 나타낸 것이다 (Total photon counts: 전체 광자수; Nor: 비관절염 유도 마우스; Con: 헤파린-담즙산 유도체 대신 PBS를 투여한 대조군; 1, 10: 매일 1mg/kg체중, 10mg/kg체중의 양으로 2,30DS-LHbD1을 투여한 군; Clinical Arthritis Index: 임상적 관절염 지수; Days: 관절염 유도를 위한 콜라겐 주사 투여 후 경과 일 수; Control: 헤파린-담즙산 유도체 대신 PBS를 투여한 대조군; 20DS-LHbD1 1mg/kg, 20DS-LHbD1 10mg/kg: 매일 1mg/kg체중, 10mg/kg체중의 양으로 20DS-LHbD1을 투여한 군).

<103> 도 7은 생쥐 CIA 모델에서 20DS-LHbD1에 의한 관절염 억제 효과를 임상관절염지수로 측정한 결과(A)와 임상적 징후를 등급으로 표시한 결과(B)를 나타낸 것이다(Clinical Arthritis Index: 임상적 관절염 지수; Days: 관절염 유도를 위한 콜라겐 주사 투여 후 경과 일 수; Control: 헤파린-담즙산 유도체 대신 PBS를 투여한 대조군; 20DS-LHbD1 1mg/kg, 20DS-LHbD1 10mg/kg: 매일 1mg/kg체중, 10mg/kg체중의 양으로 20DS-LHbD1을 투여한 군; Days after treatment: 관절염 유도를 위한 콜라겐 주사 투여 후 치료 경과 일 수; 1: 헤파린-담즙산 유도체 투여 전(1일째); 10: 헤파린 투여 후(10일째); 20: 헤파린 투여 후(20일째); 28: 헤파린 투여 후(28일째)).

<104> 도 8은 60DS-LHbD1를 처리한 CIA 생쥐 모델 관절 조직에서 염증 매개 물질의 전사체 수를 측정한 값을 나타낸 것이다(Control: 헤파린-담즙산 유도체 대신 PBS를 투여한 대조군; 60DS-LHbD1 0.5mg/kg, 60DS-LHbD1 1mg/kg, 60DS-LHbD1 10mg/kg: 매일 0.5mg/kg체중, 1mg/kg체중, 10mg/kg체중의 양으로 60DS-LHbD1을 투여한 군; TNF-: 종양괴사인자알파; RANKL: Receptor Activator for Nuclear Factor B Ligand; IL-1: 인터류킨1베타; CCL-2: 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 2; MMP-1: 매트릭스 메탈로프로티나아제-1; MMP-3: 매트릭스 메탈로프로티나아제-3; IL-6: 인터류킨6; VCAM-1: 도관세포 접착 분자-1).

<105> 도 9는 생쥐 관절염 유발 모델(CIA) 60DS-LHbD1를 처리한 후, 조직내 활막세포의 과증식, 연골파괴, 뼈의 부식 및 파누스 형성 정도로 항목을 분화하여 염증의 조직적 심화도를 각각 측정한 것이다.

<106> 도 10은 생쥐 관절염 유발 모델(CIA)에 60DS-LHbD1와 near-infrared (NIR) 형광인 Cy5.5를 레이블링한 후 eXplore Optix System을 이용하여 형광 측정한 결과 (10 A)mg/kg의 60DS-LHbD1 Cy5.5 제제를 경구로 투여 후 1시간, 3시간, 17시간에서 근적외선촬영(NIRF imaging) 후 광자수(TPC)를 정량적으로 측정한 결과(10 B)를 나

타낸 것이다.

<107> 도 11은 생쥐 CIA 모델에서 60DS-LHbD1에 의한 관절염 억제 효과를 임상관절염지수로 측정한 결과(A)와 임상적 징후를 등급으로 표시한 결과(B)이다(Clinical Arthritis Index: 임상적 관절염 지수; Days: 관절염 유도를 위한 콜라겐 주사 투여 후 경과 일 수; Control: 헤파린-담즙산 유도체 대신 PBS를 투여한 대조군; 60DS-LHbD1 0.5mg/kg, 60DS-LHbD1 1mg/kg, 60DS-LHbD1 10mg/kg: 매일 0.5mg/kg체중, 1mg/kg체중, 10mg/kg체중의 양으로 60DS-LHbD1을 투여한 군; Days after treatment: 관절염 유도를 위한 콜라겐 주사 투여 후 치료 경과 일 수; 1: 헤파린-담즙산 유도체 투여 전(1일째); 10: 헤파린 투여 후(10일째); 20: 헤파린 투여 후(20일째); 30: 헤파린 투여 후(30일째)).

<108> 도 12는 헤파린-담즙산 유도체에서 헤파린: 담즙산의 결합 비율은 1:3으로 설정하여, 상기 물질의 L-셀렉틴(도 12A)과 P-셀렉틴(도 12B)의 결합 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

<109> 도 13은 저분자량 헤파린(LMWH)에서 이당체의 황산을 부분적으로 치환시킨 후, 담즙산과 결합시킨 헤파린-담즙산 유도체의 L-셀렉틴(도 13A)과 P-셀렉틴(도 13B) 및 T 세포의 결합 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

<110> 도 14는 탈황산화된 저분자량 헤파린-담즙산 유도체인 20DS-LHbD1, 60DS-LHbD1의 혈관 신생 억제 효과를 정량화하여 저분자량 헤파린-담즙산 유도체와 그 결과를 비교한 결과를 나타낸 것이다(Number of nodal structures: 인간배꼽정맥내피세포의 노드 구조; Concentration(ug/ml): 첨가된 헤파린의 농도).

<111> 도 15는 matrigel에 bFGF와 60DS-LHbD1 처리 후 마우스의 피하에 농도별로 주사하여 혈관 신생 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

<112>

【발명의 실시를 위한 형태】

<113> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<114> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<115>

<실시예 1>

<탈황산화 헤파린-데옥시콜린산 유도체(ODS-LHD)의 제조>

<118>

<1-1> 2-0-탈황산화 헤파린-데옥시콜린산 유도체(20DS-LHD)의 제조

<119>

<120> 2,3-O-탈황산화 헤파린-데옥시콜린산 유도체(20DS-LHD)는 2-O-탈황산화된 저분자량 헤파린(20DS-LMWH)의 카르복시기와 DOCA-아민 유도체(EtDOCA)의 아민기를 결합시켜 제조하였다.

<121> 먼저, 도 1에 도시한 과정에 따라, 4-methylmorpholine은 organic base로 하고, tetrahydrofuran (THF)을 용매로 하여 데옥시콜린산(DOCA)을 용해시킨 후, 에틸클로로포르메이트(Ethyl chloroformate)로 상온에서 활성화시켜 DOCA 무수물을 합성하고 여기에 bis-체의 생성을 방지하기 위해 과량의 에틸렌디아민을 작용시켜 EtDOCA를 합성하였다.

<122> 또한, 2-O-탈황산화된 저분자량 헤파린(20DS-LMWH)을 제조하기 위하여, Nanjing King-Friend Biochemical Pharmaceutical Co. Ltd.로부터 구입한 저분자량 헤파린(LMWH, Product name; Nadroparin Calcium)을 0.2 N NaOH에 녹인 용액을 동결건조시킨 후, 동결건조시킨 건조물을 탈이온수에 녹이고 20% acetic acid 수용액을 가하여 pH를 7로 조정하였다. pH를 조정한 용액을 투석 후 동결 건조시켜 생성물을 수득하였다.

<123>

<124> 상기 합성된 EtDOCA 및 20DS-LMWH를 이용하여, 하기 방법에 따라 2-O-탈황산화된 저분자량 헤파린(20DS-LMWH)를 *N*-데옥시콜릴에틸렌디아민(*N*-EtDOCA)에 결합시켰다. 20DS-LMWH를 천천히 가열하면서 포름아미드에 용해시켰다. 소정의 EDC(1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide hydrochloride)를 헤파린 용액과 0에서 혼합하였고, 포름아미드에 용해된 DOCA-NH₂를 첨가하였다. 제조된 용액을 실온, 질소 환경 하에서 12 시간 이상 교반하였다. 혼합물을 냉각된 에탄올 내에 침전시킨 후, 침전물을 잉여의 DOCA-NH₂를 제거하기 위해 에탄올을 사용하여 주의하면서 세척하였고, 이후 감압 상태에서 건조하였다. 건조된 유도체를 탈 이온수에 용해시킨 후, 동결 건조하여 백색의 분말로 제조하였다.

<125>

<126> <1-2> 2-O-탈황산화 헤파린-*bis*데옥시콜린산 유도체(20DS-LHbD)의 제조

<127> 데옥시콜린산(DOCA)을 테트라하이드로푸란(tetrahydrofuran, THF)에 녹였다. 질소 충전 하에서 4-methylmorpholine을 신속히 첨가하고, 0에서 에틸클로로포르메이트(Ethyl chloroformate)를 천천히 적가했다. 상온에서 5시간 반응 후 얻은 생성물에 라이신 에틸이스터 디하이드로클로라이드(Lysine ethyl ester dihydrochloride)를 첨가해서 12시간 동안 reflux시키며 반응하였다. 반응 종료 후 여과, 추출, 증발, 침전 및 동결건조 등의 과정을 거쳐 Lysine-*bis*DOCA를 얻었다.

Lysine-*bis*DOCA의 카르복실기를 디사이클로헥실카보디이미드(dicyclohexylcarbodiimide, DCC)와 *N*-하이드록시숙신이미드(*N*-hydroxysuccinimide, NHS) 존재 하에서 활성화시키고 이를 에틸렌디아민과 반응시켜 Et*bis*DOCA를 합성하였다.

<128>

<129>

상기 합성된 Et*bis*DOCA와, <1-1>에서 합성된 20DS-LMWH를 이용하여, 하기의 방법으로 20DS-LMWH를 상기 lysine-*bis*DOCA에 결합시켰다. 20DS-LMWH(LMWH)(0.1 g)을 천천히 가열하면서 포름아미드(2.08 ml)에 용해시키고 DMF(1.04)를 가하였다. 소정량의 EDC를 헤파린 용액과 0에서 혼합한 후, 소정량의 DMF와 포름아미드에 용해된 Et*bis*DOCA를 첨가하였다. 제조된 용액을 실온, 질소 환경 하에서 12 시간 동안 교반하였다. 혼합물을 냉각된 에탄올 내에 침전시킨 후, 침전물 중 과량의 Et*bis*DOCA를 제거하기 위해 에탄올을 사용하여 주의하면서 세척하였고, 이후 감압 상태에서 건조하였다. 건조된 유도체를 탈이온수에 용해시킨 후, 동결 건조하여 백색의 분말로 제조하였다. 이와 같은 과정을 도 2에 나타내었다.

<130>

<131>

<1-3> 6-O-탈황산화 헤파린-데옥시콜린산 유도체(60DS-LHD)의 제조

<132>

60DS-LHD는 저분자량 헤파린(LMWH)의 카르복시기와 DOCA-아민 유도체(EtDOCA)의 아민기를 결합시켜 제조하였다. 먼저, 상기 <1-1>의 도 1에서 설명한 과정에 의해 *N*-데옥시콜릴에틸렌디아민(*N*-EtDOCA)을 제조하였다.

<133>

60DS-LMWH는 다음과 같이 제조하였다. Nanjing King-Friend Biochemical Pharmaceutical Co. Ltd.로부터 구입한 저분자량 헤파린(LMWH, Product name; Nadroparin Calcium)의 피리디늄(pyridinium)염을 피리딘(pyridine)에 담그고, *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide를 가한 후, 용액을 80에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 용액을 냉각시킨 후 용액 부피와 동량의 탈 이온수를 가했다. 이 용액을 농축시킨 후 투석시키고, 투석시킨 용액을 Dowex (H⁺) column에 통과시킨 후 NaOH 수용액을 가해 pH 9.5로 조정하였다. pH를 조정한 용액을 투석 후 동결 건조시켜 생성물을 수득하였다.

<134>

<135>

상기 합성된 EtDOCA 및 60DS-LMWH를 이용하여 60DS-LHD를 제조하였다. 60DS-LMWH(0.1g)을 천천히 가열하면서 포름아미드(2.08ml)에 용해시켰다. 소정의 EDC를 헤파린 용액과 0에서 혼합하였고, 소정량의 포름아미드에 용해된 EtDOCA를 첨가하였다. 제조된 용액을 실온, 질소 환경 하에서 24 시간 동안 교반하였다. 혼합물을

냉각된 에탄올 내에 침전시킨 후, 침전물을 과량의 DOCA-NH₂를 제거하기 위해 에탄올을 사용하여 주의하면서 세척하였고, 이후 감압 상태에서 건조하였다. 건조된 유도체를 탈이온수에 용해시킨 후, 동결 건조하여 백색의 분말로 제조하였다.

<136>

<137>

<1-4> 6-O-탈황산화 헤파린-bis데옥시콜린산 유도체(6ODS-LHbD)의 제조

<138>

6ODS-LMWH를 lysine-bisDOCA에 결합시켰다. lysine-bisDOCA는 상기 <1-2>에 기재된 방법에 의해 제조하고, 6ODS-LMWH는 상기 <1-3>에 기재된 방법에 의해 제조하였다.

<139>

6ODS-LMWH(0.1 g)을 천천히 가열하면서 포름아미드(2.08 ml)에 용해시키고 DMF(1.04)를 가하였다. 소정량의 EDC를 헤파린 용액과 0에서 혼합한 후, 소정량의 DMF와 포름아미드에 용해된 EtbisDOCA를 첨가하였다. 제조된 용액을 실온, 질소 환경 하에서 12 시간 동안 교반하였다. 혼합물을 냉각된 에탄올 내에 침전시킨 후, 침전물을 과량의 EtbisDOCA를 제거하기 위해 에탄올을 사용하여 주의하면서 세척하였고, 이후 감압 상태에서 건조하였다. 건조된 유도체를 탈이온수에 용해시킨 후, 동결 건조하여 백색의 분말로 제조하였다. 상기 과정을 도 3에 나타내었다.

<140>

<141>

<실시예 2>

<142>

탈 황산화 헤파린 유도체의 분석

<143>

<144>

상기 실시예 1-1 내지 1-4의 방법에 따라 제조된 ODS-LMWH 유도체들을 IR 및 NMR을 사용하여 분석하였다. NMR 데이터로 ODS-LMWH의 특정 피크를 확인하였으며, 데옥시콜린산 유도체의 IR 데이터로부터 아미드기의 형성을 확인하였다.

<145>

또한, 헤파린 유도체의 항응고 활성을 측정하기 위해 Chromogenix 사의 COATEST HEPARIN Factor Xa 분석 키트를 사용하였다. 결과값은 405nm에서 기록된 것이다. 표 1은 실시예 1에서 제조된 헤파린 유도체의 반응물 비, 담즙산의 결합비 및 항 응고 활성을 나타낸 것이다.

<146>

【표 1】

	2ODSLHD	2ODSLHbD	6ODSLHD	6ODSLHbD
탈황산화된 프락시파린	1	1	1	1
EDC	3.6	3.6	3.6	3.6
EtDOCA 또는 EtbisDOCA	3	3	3	3
결합비	1.0	1.0	0.8	0.8
항응고 활성	10.21	7.1	0	0

<147>

<실험예 1>20DS-LHbD1 제제의 콜라겐 유도성 관절염(Collagen-induced arthritis; CIA)에 대한 치료 효과<1-1> 동물 모델의 제작

C57BL/6 마우스를 대상으로 만성 관절염을 유발하여 실험 모델을 제작하였다. 사람의 류마티스 관절염과 매우 유사한 특징을 가지고 있는 CIA 생쥐 모델은 공지된 문헌(Protocol for the successful induction of collagen-induced arthritis(CIA) and collagen antibody-induced arthritis(CAIA) in mice. Chondrex, Redmond, WA)에 기재된 바에 따라 다음과 같이 제작되었다: 우형(bovine) 제2형 콜라겐 100ug을 완전 프로인드 보조제(Freund's complete adjuvant)와 섞어 생쥐의 꼬리에 피하 접종한 후 3주후에 우형 제2형 콜라겐 100ug을 불완전 프로인드 보조제(Freund's incomplete adjuvant)와 섞어 생쥐의 꼬리에 재접종하여 제작하고 실험에 사용하였다.

<1-2> 20DS-LHbD 제제의 CIA유발 모델에서의 *in vivo* 항염 활성

상기 1-1에서 제작한 관절염(CIA) 모델을 대상으로, 항염증 효과를 확인하기 위하여 하기와 같이 실험을 실시하였다. 관절염 모델에 20DS-LHbD를 1mg/kg 및 10mg/kg의 농도로 4주간 매일 경구 투여하였다. 4주간의 투여 후, 투여군과 비 투여군의 IL-1, IL-6, CCL-2, MMP-1, MMP-3, VCAM-1, RANKL과 같은 염증 매개성 인자의 발현 여부를 mRNA 수준에서 확인하기 위해 치료 후 상기 모델의 발 조직으로부터 관절 조직을 채취하여semiquantitative RT-PCR을 수행하였다.

그 결과, 도 4에서 보듯이, 투여 용량에 관계없이, 탈황산화 헤파린-담즙산 유도체인 20DS-LHbD를 투여한 군에서 상기 염증성 사이토카인을 포함한 염증 매개성 인자의 발현이 현저히 감소한 것을 알 수 있었다.

<1-3> 관절염 치료 반응에 대한 정량적 평가

관절염의 활성도를 정량적으로 측정하기 위하여 키토산 글리콜에 콜라닌산을 이용하여 소수성 중심을 가진 구형의 나노파티클을 제작하고 near-infrared (NIR) 형광인 Cy5.5를 레이블링한 후 eXplore Optix System을 이용하여 관절염의 활성도를 측정하였다. 1mg/kg와 10mg/kg의 20DS-LHbD1 제제의 투여가 끝나는 4주 후에 HGC-cy5.5를 정맥으로 투여 후 근적외선촬영(NIRF imaging)을 수행하였다.

<160> 그 결과, 도 5에서 보듯이, 20DS-LHbD1을 투여하지 않은 마우스의 발목은 심한 부종이 있었고 강한 강도의 형광반사율을 관찰하였고, 20DS-LHbD1을 투여한 마우스는 근적외선촬영에서 반영된 투여량-의존적 방법으로 관절염증이 억제되었다. 또한, 또한, 도 6에서 보듯이, 근적외선촬영으로부터 정량적 분석은 투여하지 않은 군보다 20DS-LHbD1을 투여한 군에서 전체 광자수(TPC)가 현저하게 낮은 것(도 6B)을 관찰하였다. 이러한 관절염 강도의 시각적 수량화는 임상 관절염의 지표(도 6A)와 비교하였을 때 매우 유사한 형태의 결과를 보였다.

<161>

<1-4> CIA유발 모델의 관절염 치료 효과

<162>

<163> 상기 1-1의 관절염 유발 모델을 이용하여, ODS-LHbD1 제제의 임상적 관절염 치료 효과를 확인하였다.

<164>

CIA 모델에서 관절염의 치료효과를 규명하기 위하여 우형 제2형 콜라겐을 두 번째 주사한 후 관절염이 발생하는 시점(23일째)부터 4주일간 매일 20DS-LHbD1를 1mg/kg 및 10mg/kg의 양으로 경구 투여하였다. 대조군으로는 동일량의 PBS를 복강 투여 하였다. 23일째부터 45일째까지 매일 임상적 관절염 지수(Clinical arthritis index)를 사용하여 관절염의 중증도를 판정하였다. 판정기준은 다음과 같다. <0; 증상 없음, 1; 한 개 관절의 부종 및 가벼운 edema, 2; 2개 이상의 관절의 중증도 부종, 3; 대부분 관절의 심한 부종, 4; 다리 전체의 심한 부종.>

<165>

그 결과, 도 7에서 보듯이, 관절염에 대한 항 염증 효과는 20DS-LHbD1 투여 시, 10mg/kg으로 투여한 군에서 1mg/kg을 투여한 군에 비하여 임상적 관절염 지수가 15% 정도 더 향상된 것을 알 수 있었다(도 6A). 또한, 도 6B에서 보듯이, 관절염의 발생 정도에 대하여는 투여량과 관계없이, 거의 유사한 수준으로(약 28%) 발병되었음을 알 수 있었다.

<166>

<1-5> 독성 검사

<167>

<168>

20DS-LHbD1 경구 제제로 인한 독성 검증을 하기 위해 각 치료 그룹 마우스에서의 혈액과 혈청을 수거하여 검사하고 치료 전후의 체중을 측정하였다. 그 결과 표 2에서 보듯이, 20DS-LHbD1 제제의 치료 전후 체중에서는 비관절염 마우스와 비교 시 별다른 이상 소견은 없었으며, 혈액 검사에서도 RBC, PLT, WBC 수치에서는 이상 소견 없는 것을 확인하였다. 혈청 검사 결과에서는 ALT, AST 수치에 대한 이상 소견이 없었으며 BUN, Crea, T-Bili 수치도 이상 소견은 발견되지 않았다.

【표 2】

Animal D	weight (g)		RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	AST (U/L)	ALT (U/L)	BUN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	T-Bil (mg/dL)
	before	after								
Standard			6 ~ 11	600 ~ 1000	0.5 ~ 1.5	80 ~ 200	35 ~ 45	15 ~ 25	0.465	
Normal	23 $\pm$ 1.1	24 $\pm$ 0.8	11.8 $\pm$ 0.5	1096 $\pm$ 23	5.4 $\pm$ 1.7	65.5 $\pm$ 7.2	32.3 $\pm$ 5.6	22.7 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0
1mg/kg (n=6)	24 $\pm$ 0.6	24 $\pm$ 0.9	12.1 $\pm$ 0.5	1301 $\pm$ 136	5.1 $\pm$ 1.1	89.3 $\pm$ 25	41.9 $\pm$ 17	18.8 $\pm$ 2.14	0.41 $\pm$ 0.0	0.21 $\pm$ 0.05
10mg/kg (n=6)	23 $\pm$ 1.1	25 $\pm$ 1.7	12.1 $\pm$ 0.5	1707 $\pm$ 540	4.9 $\pm$ 0.7	83.9 $\pm$ 15	36.8 $\pm$ 10	16.7 $\pm$ 2.64	0.40 $\pm$ 0.1	0.18 $\pm$ 0.08

<실험예 2>

60DS-LHbD1 제제의 콜라겐 유도성 관절염(Collagen-induced arthritis; CIA)

에 대한 치료 효과

<2-1> 60DS-LHbD1 제제의 CIA유발 모델에서의 *in vivo* 항염 활성

상기 1-1의 동물 모델을 대상으로, 60DS-LHbD1 제제의 관절염 유발 모델에서의 항염 활성을 상기 1-2와 동일한 염증 매개성 인자의 발현 여부에 따라 확인하였다. 그 결과, 도 8에서 보듯이, 60DS-LHbD1 투여군에서도 염증 매개성 인자의 발현이 대부분 농도와 무관하게 감소한 것을 알 수 있었다. 그러나, RANKL의 경우, 저용량 투여 군에서 발현이 더 감소한 것으로 나타났다.

또한, 60DS-LHbD1 제제로 치료 후 발조직을 절편하고 H&E 염색하여 치료농도 별로 구분한 뒤 조직내 활막세포의 과증식, 연골파괴, 뼈의 부식 및 파누스 형성 정도로 항목을 분화하여 염증의 조직적 심화도를 측정하였다. 그 결과, 도 9에서 보듯이, 60DS-LHbD1을 치료한 군에서 각 항목별 심화도가 낮아짐이 관찰되었고 10mg/kg 농도의 헤파린제제 처리 시 정상 관절과 가까운 형태의 관절을 관찰할 수 있었으며 그 정도는 대조군에 비해 2 내지 3배 이상의 심화도가 저해되어 60DS-LHbD1 제제에 의한 치료효과가 조직 내 염증 진행을 지연시켜 관절의 손상정도가 개선되는 결과를 확인하였다.

아울러, 상기 60DS-LHbD1의 경구 투여시 관절 조직내로의 이동을 정량적으로 측정하기 위하여 60DS-LHbD1 제제와 near-infrared (NIR) 형광인 Cy5.5를 레이블링한 후 eXplore Optix System을 이용하여 형광 측정하였다. 5mg/kg의 60DS-LHbD1 Cy5.5 제제를 경구로 투여 후 1시간, 3시간, 17시간에서 근적외선촬영(NIRF imaging)을 수행하였다.

그 결과, 도 10에서 보듯이, 60DS-LHbD1 Cy5.5는 17시간까지 일정량 관절내

에 남아 형광을 나타냈고(도 10A), 근적외선촬영으로부터 정량적 분석에서도 전체 광자수(TPC)도 일정하게 나타나는 것으로 확인되었다.(도 10B)

<181>

<182>

<2-2> CIA유발 모델의 관절염 치료 효과

<183>

상기 관절염 유발 모델을 이용하여, 60DS-LHbD1 제제의 임상적 관절염 치료 효과를 확인하였다. CIA 모델에서 관절염의 치료효과를 규명하기 위하여 우형 제2형 콜라겐을 두 번째 주사한 후 관절염이 발생하는 시점(23일째)부터 4주일간 매일 60DS-LHbD1를 0.5mg/kg, 1mg/kg 및 10mg/kg의 양으로 경구 투여하였다. 대조군으로는 동일량의 PBS를 복강 투여 하였다. 23일째부터 45일째까지 매일 임상적 관절염 지수(Clinical arthritis index)를 사용하여 관절염의 중증도를 판정하였다. 판정 기준은 다음과 같다. <0; 증상 없음, 1; 한 개 관절의 부종 및 가벼운 edema, 2; 2개 이상의 관절의 중증도 부종, 3; 대부분 관절의 심한 부종, 4; 다리 전체의 심한 부종.>

<184>

그 결과, 도 11A에서 보듯이, 60DS-LHbD1 투여군에서는 0.5mg/kg으로 투여한 경우, 48%의 임상적 관절염 지수를 가지는 것으로 나타났으나, 1mg/kg 및 10mg/kg으로 투여한 경우에는 66% 정도의 임상적 관절염 지수를 가지는 것으로 나타나, 60DS-LHbD1 투여 시에는 낮은 농도에서 관절염에 대한 치료 효과가 큰 것으로 나타났다. 또한, 도 11B에서 보듯이, 0.5mg/kg으로 60DS-LHbD1을 투여한 군에서 관절염의 발생 정도가 약 15% 높은 것으로 나타났다.

<185>

<186>

<2-3> 독성 검사

<187>

60DS-LHbD1 경구 제제 투여에 따른 독성 검증을 위해 각 치료 그룹 마우스의 치료전후 체중을 비교하고 혈액과 혈청을 수거하여 검사를 실시하였다. 그 결과 하기 표 3에서 보듯이, 60DS-LHbD1 제제의 치료 전후 체중에는 큰 차이가 없었으며, 혈액 검사 결과에서도 RBC, PLT, WBC 수치에서 정상수치에 비해 이상 소견 없는 것으로 나타났으며 혈청 검사 결과 역시 ALT, AST, BUN, Crea 그리고 T-Bili 수치 모두 이상 소견이 없는 것으로 나타나 60DS-LHbD1 경구 제제의 경우 장기간 투여에도 독성이 없는 것을 확인하였다.

<188>

【표 3】

Animal ID	weight (g)	RBC	PLT	WBC	AST	ALT	BUN	Crea	T-Bil
before	after	($\times 10^5/\mu\text{l}$)	($\times 10^3/\mu\text{l}$)	($\times 10^3/\mu\text{l}$)	(U/L)	(U/L)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)
Standard		6 ~ 11	600 ~ 1000	0.5 ~ 15	80 ~ 200	35 ~ 45	15 ~ 25	0.485	
Normal	24 ± 1.6	24 ± 1.0	11.7 ± 0.3	1099 ± 16	5.5 ± 1.6	44.5 ± 7.2	32.3 ± 5.6	22.7 ± 0.4	0.4 ± 0.0
0.5mg/kg (n=6)	26 ± 1.9	25 ± 1.6	12.5 ± 0.5	1435 ± 353	6.0 ± 1.3	94.4 ± 32	23.5 ± 10	17.3 ± 3.9	0.42 ± 0.0
1mg/kg (n=6)	23 ± 0.9	25 ± 1.7	11.8 ± 1.5	1173 ± 328	4.8 ± 1.2	103 ± 18	43.5 ± 14	21.2 ± 2.36	0.42 ± 0.0
10mg/kg (n=6)	25 ± 1.9	26 ± 1.4	12.1 ± 0.4	1561 ± 591	4.6 ± 0.9	89.5 ± 10	32.2 ± 7	20.2 ± 2.35	0.41 ± 0.1

<189>

<190>

<191>

<실험예 3>

<192>

헤파린-담즙산 유도체의 류머티스 관절염에 대한 작용 효과

<193>

<194>

<3-1> 헤파린의 셀렉틴에 대한 T 림프구 부착 억제 효과

<195>

염증 발생시 림프구들이 염증 발생부위로의 이동하기 위해서는 상피조직을 림프구들이 통과할 수 있도록 도와주는 첫 번째 부착 수용체 중의 하나인 셀렉틴(selectin)과의 결합으로 이들은 세포의 탄수화물 리간드와 결합한다. P-셀렉틴은 트롬빈 또는 히스타민이 분비되면 상피 세포 또는 혈소판의 표면으로 발현되고, L-셀렉틴은 림프구 표면에 발현된다. 헤파린은 L-셀렉틴과 P-셀렉틴을 결합하여 이들의 리간드인 시알리(sialylated)와의 상호 작용을 막음으로써 항염증 효과를 가질 수 있다.

<196>

<197>

탈황산화된 저분자량 헤파린과 담즙산의 결합 비율을 1:3으로 고정시킨 후, 각 이당체의 황산을 부분적으로 탈황산화 시킨 2ODS-LHbD1, 6ODS-LHbD1의 셀렉틴과 poly-SLe^x의 결합 차단 실험을 한 결과, 도 12에서 보듯이, L-셀렉틴에서는 변형시킨 헤파린들은 1/ml 이상의 농도에서 억제효과가 나타나는 것으로 보였다. P-셀렉틴에서는 저분자량 헤파린에 담즙산을 1:3으로 결합시킨 LHbD1에서 가장 높은 억제효과를 보였고 부분적으로 탈황산화한 헤파린 중에서는 6ODS-LHbD1가 저분자량 헤파린보다 효과가 좋은 것으로 나타났다.

<198>

이들을 IC₅₀ value로 정량해본 결과, 표 4에서 보듯이, L-셀렉틴에서는 변형시킨 헤파린의 IC₅₀ 수치들은 비슷한 정도로 나타났으며 P-셀렉틴에서는 LHbD1 > 6ODS-LHbD1 > LMWH > 2ODS-LHbD1 순서로 나타났다.

<199>

<200>

【표 4】

Heparinoids	셀렉틴-poly-SLe ^x 결합 억제 효과	
	P-셀렉틴	L-셀렉틴
저분자량헤파린(LMWH)	102	3.06
LHbD1	0.37	6.97
20DS-LHbD1	507	8.2
60DS-LHbD1	20.68	8.5

<201>

<202>

<3-2> 헤파린-담즙산 유도체의 셀렉틴에 대한 T-림프구 부착 억제 효과

<203>

헤파린은 T 세포와 셀렉틴 간의 결합을 효과적으로 저해하는 능력을 가지고 있다는 것을 상기 실험에서 확인하였다. 따라서 본 실시예에서는 다양한 방법으로 탈황산화 한 저분자량 헤파린에 담즙산 잔기(데옥시콜린산; DOCA)를 결합 한 유도체 역시 T 세포와 셀렉틴 간의 결합 저해 효과를 가지는지 여부를 확인하였다.

<204>

먼저, 관절염 유발 모델의 말초혈액에서 T 세포를 분리하여 헤파린 유도체에 의한 셀렉틴 결합 저해 여부를 확인한 결과, 도 13에서 보듯이, L, P-셀렉틴 에서 저분자량 헤파린에 의한 저해도와 비슷한 수준의 저해효과를 나타내었으며 세포의 손상도 없었다. 그 정도는 L-셀렉틴 보다 P-셀렉틴 에서 높게 나타났고 10/ml 농도로 처리 시, 50%이상의 저해 능력을 보여주었으며 20DS-LHbD1 제제의 경우 P-셀렉틴 과의 결합에 있어 100/ml 농도 처리하였을 때 최대 70% 이상의 저해도를 나타내었다.

<205>

<206>

<3-3> 헤파린-담즙산 유도체의 혈관신생 억제 효과

<207>

류마티스 관절염은 백혈구가 활막 조직 내로 이동할 수 있도록 하는 혈관 신생과 관련되어 있다. 따라서, 헤파린-결합 성장 인자 중 VEGF는 중앙 혈관형성 뿐 아니라 활막에서도 중요한 역할을 하므로 류마티스 관절염의 일차적 치료 타겟이 될 수 있다. 따라서 matrigel 상에서 VEGF로 capillary-like tube formation을 유도하여 이에 대한 헤파린 유도체의 억제 효과를 평가하였다.

<208>

그 결과, 도 14에서 보듯이, 합성한 헤파린 유도체들을 10/ml의 농도로 처리하였을 때 대부분의 헤파린 유도체가 VEGF를 처리한 양성대조군에 비해 억제되는 것을 확인할 수 있었으며 LMWH에 비해서도 높은 혈관 신생 억제 효과를 보이는 것으로 나타났다.

<209>

또한, 상기 결과에서 혈관 신생 억제 효과가 높은 것으로 나타난 20DS-LHbD1 과 60DS-LHbD1을 1, 10, 100/ml의 농도로 처리하여 확인한 결과, LMWH에 비해 담즙산 결합 유도체인 20DS-LHbD1과 60DS-LHbD1의 모든 농도범위에서 높은 억제효과를 보이는 것을 확인하였다.

<210>

<211>

<3-4> Matrigel plug assay를 이용한 in vivo 혈관 신생 조절 효과의 확인

<212>

bFGF에 의해 유도되는 생체 내 혈관신생에 대한 60DS-LHbD1의 영향을 증명하기 위해 matrigel plug assay를 실시하였다. 혈관신생 억제 효과를 증명하기 위해 Matrigel 단독으로 주사한 음성대조군, bFGF 500ng을 함께 처리한 양성대조군 그리고 bFGF와 60DS-LHbD1를 농도별로 처리한 실험군으로 나누어 C57BL/6 마우스에 피하주사 한 후 10일째 plug를 회수하여 혈관신생의 정도를 확인하였다.

<213>

그 결과 도 15에서 보듯이, bFGF를 단독으로 처리한 실험군에서는 plug가 붉은색을 나타내어 혈관신생 현상을 확인할 수 있었고, 60DS-LHbD1를 농도별로 처리한 결과 0.5ug/ml의 농도에서는 노란색을 띄는 것을 확인할 수 있었으며 10, 100/ml의 농도에서는 혈관신생이 거의 일어나지 않아 투명한 흰색에 가까워 혈관신생이 억제된 것을 확인할 수 있었다.

<214>

【산업상 이용가능성】

<215>

본 발명은 신규한 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체의 염증성 질환의 예방 및 치료 용도에 대한 것으로, 보다 상세하게는 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체 및 이를 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물, 상기 조성물의 제조를 위한 탈황산화된 헤파린 담즙산 유도체의 용도 및 이를 이용한 염증성 질환의 치료 방법에 관한 것이다. 본 발명의 헤파린-담즙산 유도체는 헤파린의 항응고 활성을 저하시키기 위하여 항응고 활성 부위를 부분적으로 탈황산화시켜, 경구 투여용 제제로 제형화하기에 적합하다.

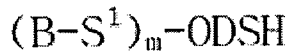
<216>

【청구의 범위】

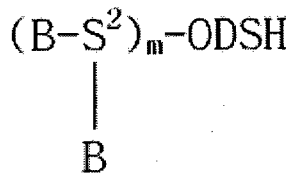
【청구항 1】

B는 담즙산 잔기 또는 담즙산 유사체이고, ODSH는 탈황산화된 헤파린 잔기이고, S^1 또는 S^2 는 스페이서이고, m은 0 내지 16인 정수이고, B의 3번 탄소에 S가 결합하는 하기 화학식 1 또는 화학식 2 로 표시되는 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물.

<화학식 1>



<화학식 2>



【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 B는 데옥시콜린산인 것을 특징으로 하는 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 ODSH는 2-O가 탈황산화된 저분자량 헤파린 또는 6-O가 탈황산화된 저분자량 헤파린인 것을 특징으로 하는 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 S는 에틸렌디아민 또는 라이신인 것을 특징으로 하는 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물.

【청구항 5】

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 염증성 질환은 염증성 피부 질환, 크론씨 질환(Crohn's disease) 및 궤양성 대장염과 같은 염증성 장 질환, 복

막염, 골수염, 봉소염, 뇌막염, 뇌염, 척장염, 외상 유발 쇼크, 기관지 천식, 알러지성 비염, 낭포성 섬유증, 뇌졸중, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 급성 세기관지염, 만성 세기관지염, 골관절염, 통풍, 척추관절병증, 강직성 척추염, 라이터 증후군, 건선성 관절병증, 장질환 척추염, 연소자성 관절병증, 연소자성 강직성 척추염, 반응성 관절병증, 감염성 관절염, 후-감염성 관절염, 임균성 관절염, 결핵성 관절염, 바이러스성 관절염, 진균성 관절염, 매독성 관절염, 라임 병, '혈관염 증후군'과 관련된 관절염, 결절성 다발동맥염, 과민성 혈관염, 루게릭 육아종증, 류마티스성 다발성근육통, 관절 세포 동맥염, 칼슘 결정 침착 관절병증, 가성 통풍, 비-관절 류마티즘, 점액낭염, 건초염, 상과염(테니스 엘보), 신경병증성 관절 질환(charco and joint), 출혈성 관절증(hemarthrosic), 헤노흐-헨라인 자반병, 비후성 골관절병증, 다중심성 세망조직구종, 수르코일로시스(surcoilosis), 혈색소증, 겸상 적혈구증 및 기타 혈색소병증, 고지단백혈증, 저감마글로불린혈증, 가족성 지중해열, 베하트 병, 전신성 홍반성 루푸스, 재귀열, 건선, 다발성 경화증, 패혈증, 패혈성 쇼크, 다장기 기능장애 증후군, 급성 호흡곤란 증후군, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 급성 폐손상(acute lung injury) 및 기관지 폐 형성장애(broncho-pulmonary dysplasia)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 6】

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 경구 투여용 제제로 제형화되는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 7】

염증성 질환의 치료용 제제를 제조하기 위한 물질로서, 상기 제1항의 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체의 용도.

【청구항 8】

상기 제1항의 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 탈황산화된 헤파린-담즙산 유도체를 이를 필요로 하는 개체에 유효량으로 투여하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 및 치료 방법.

Fig. 1

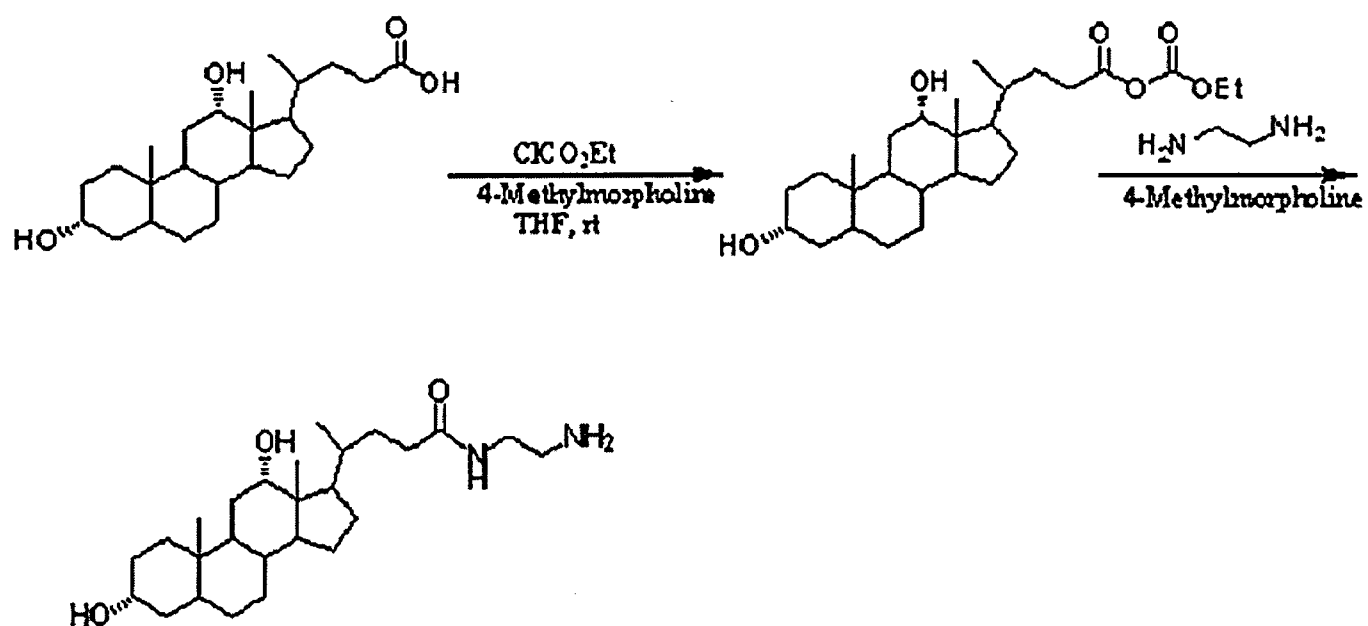


Fig. 2

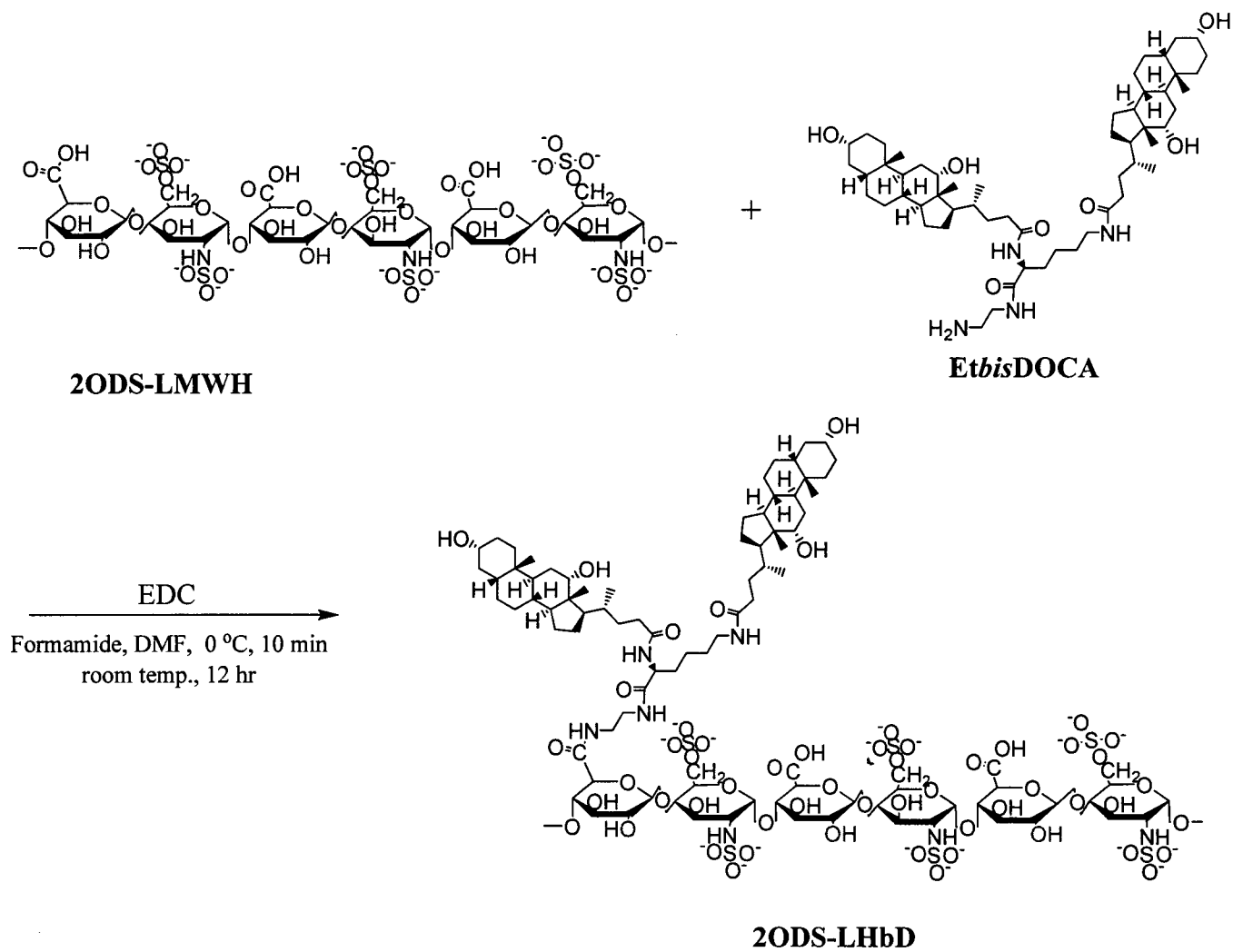


Fig. 3

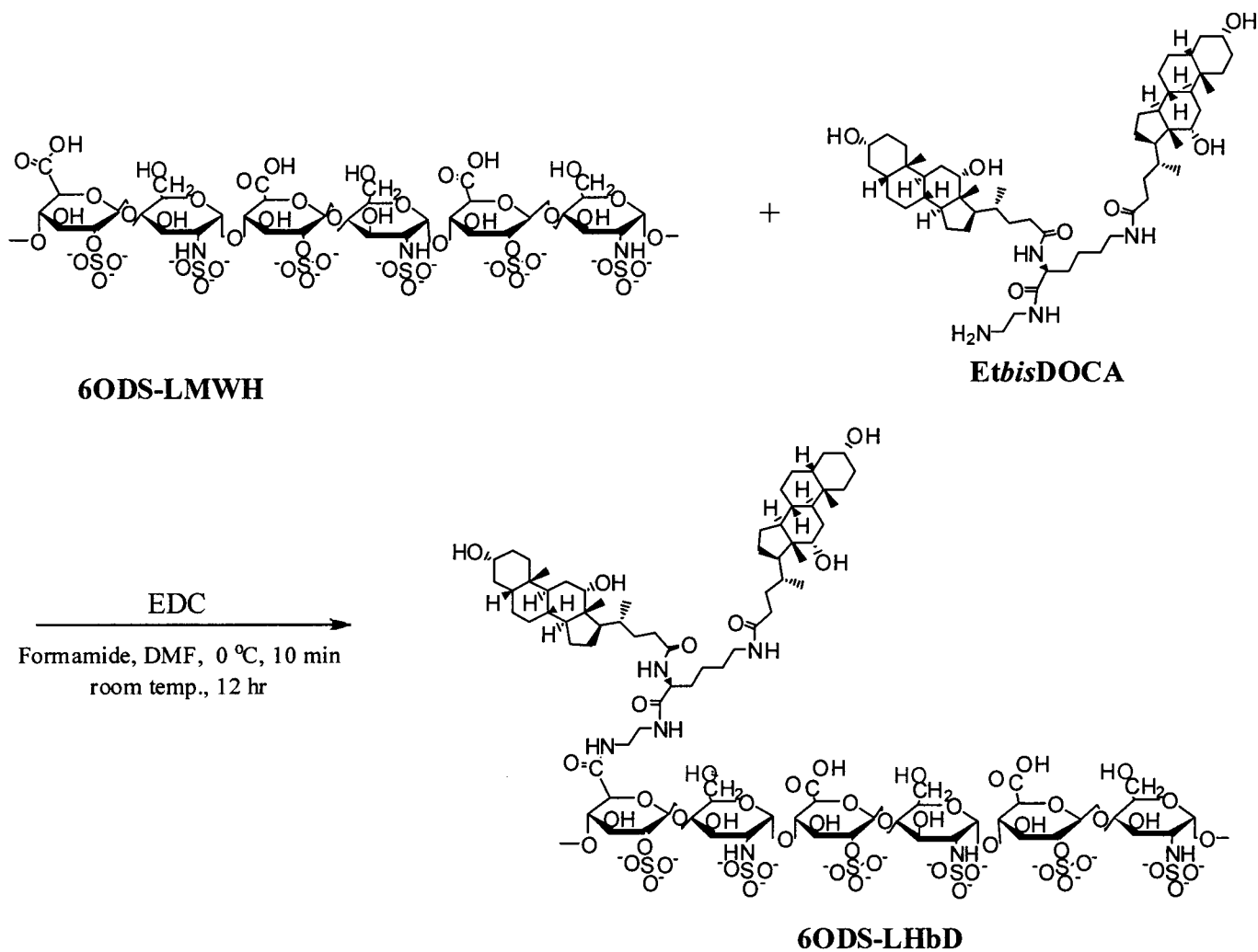


Fig. 4

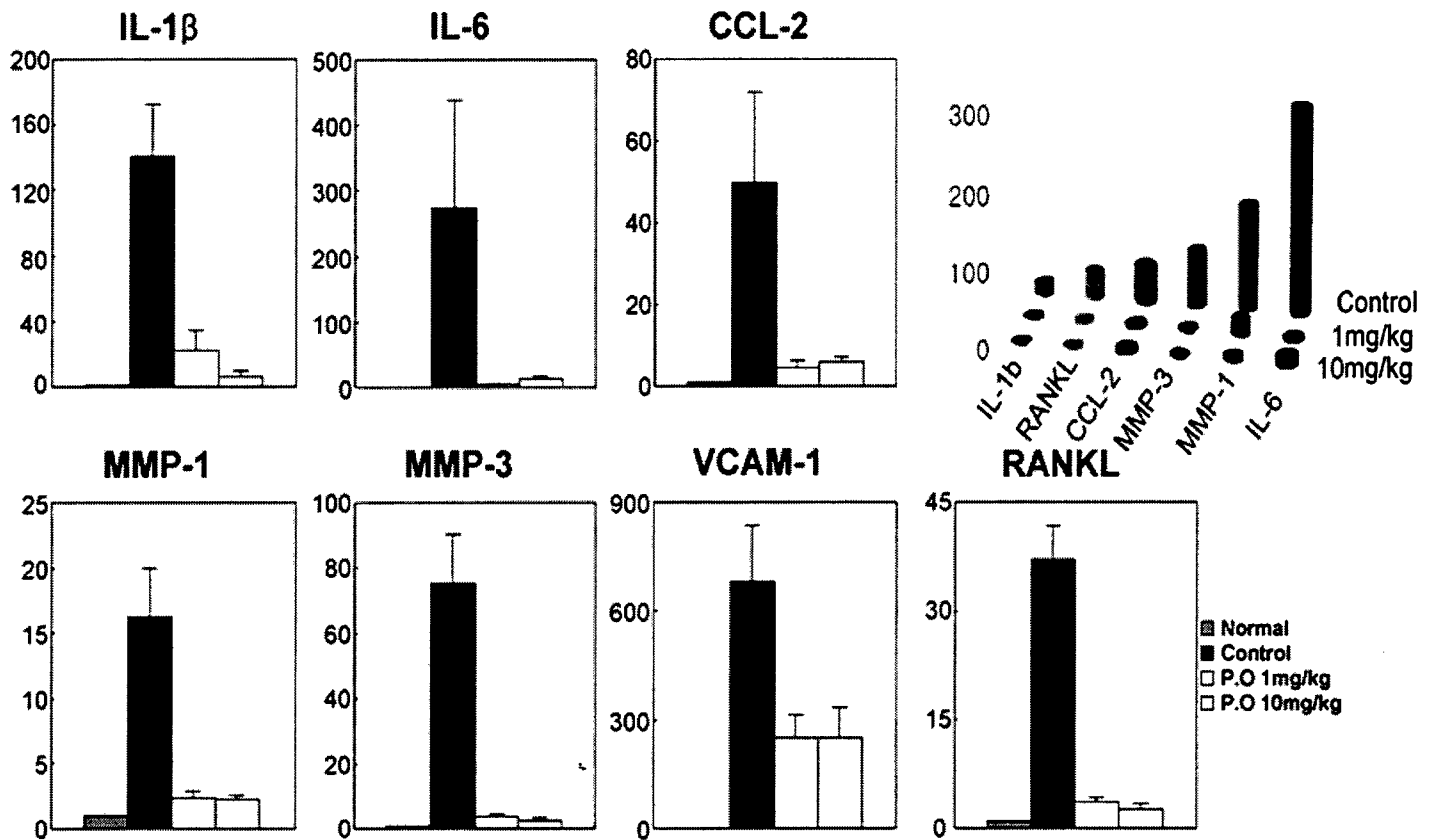


Fig. 5

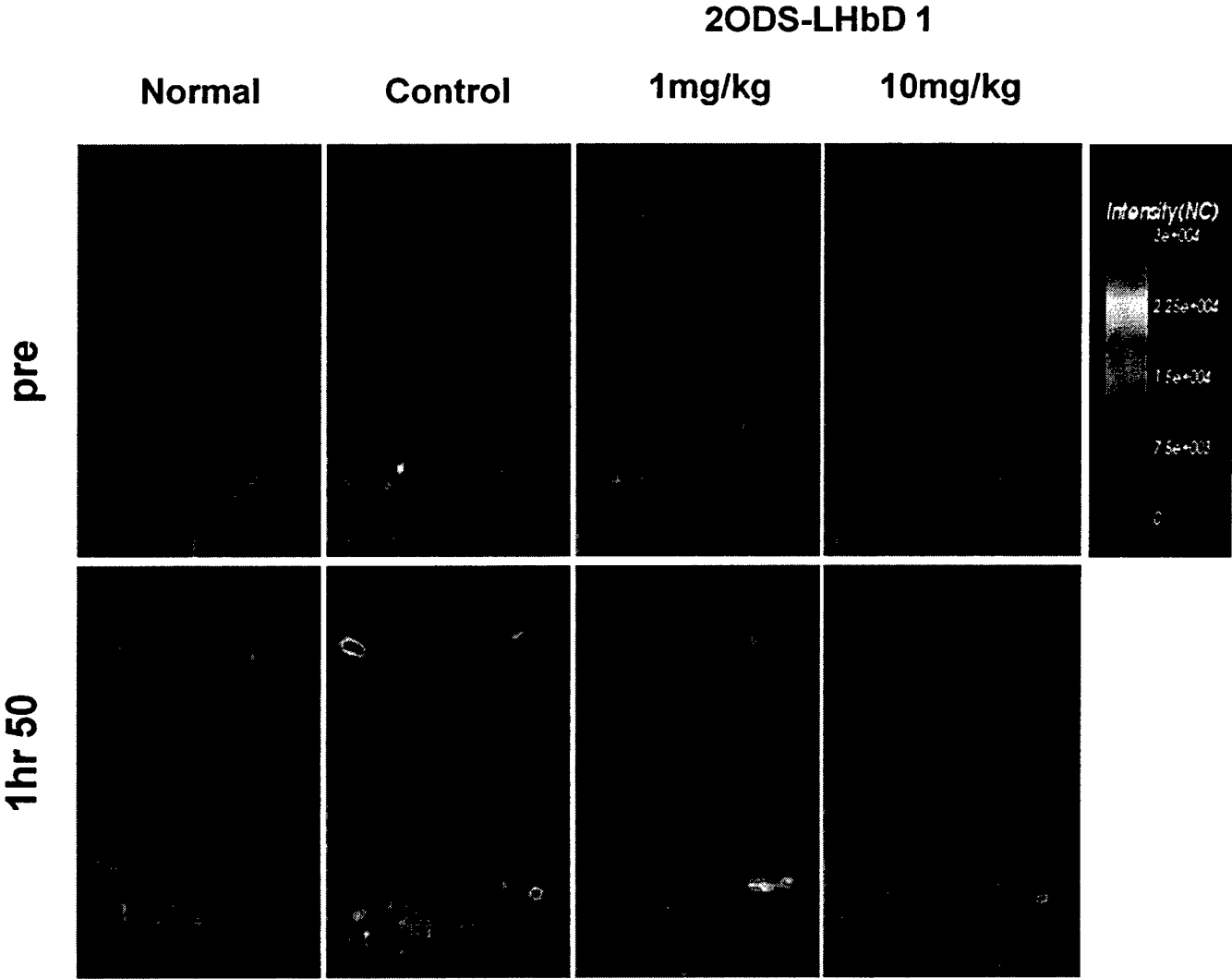


Fig. 6

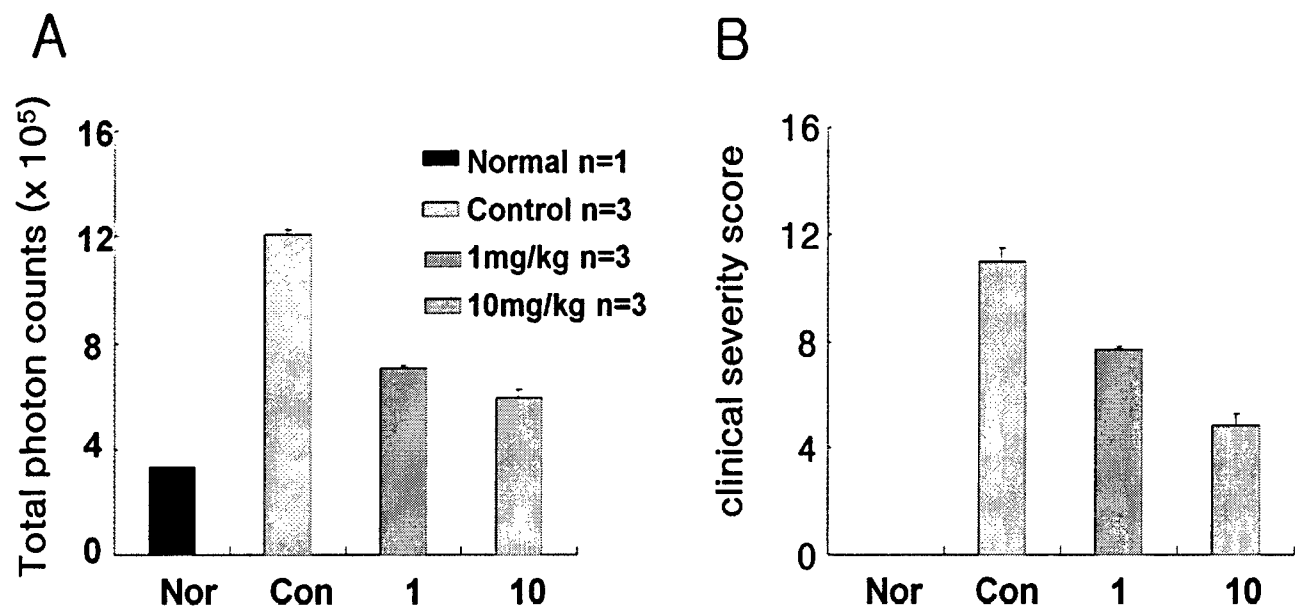


Fig. 7

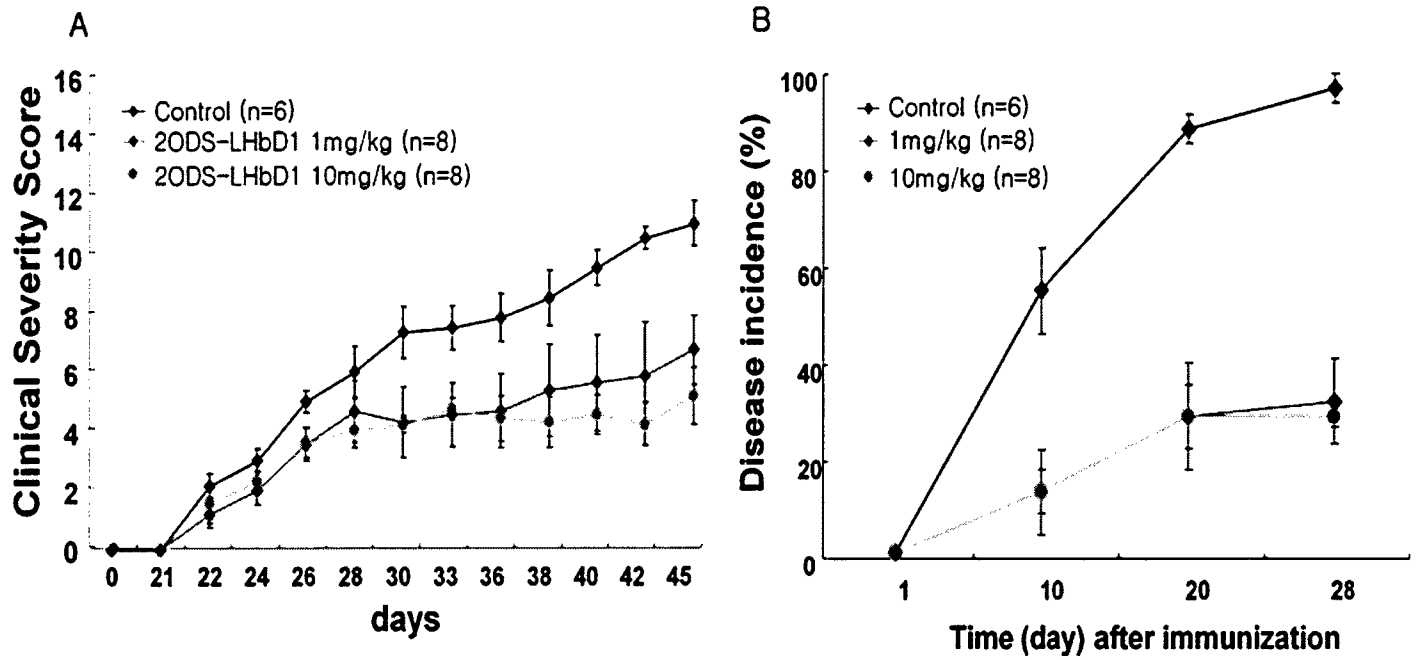


Fig. 8

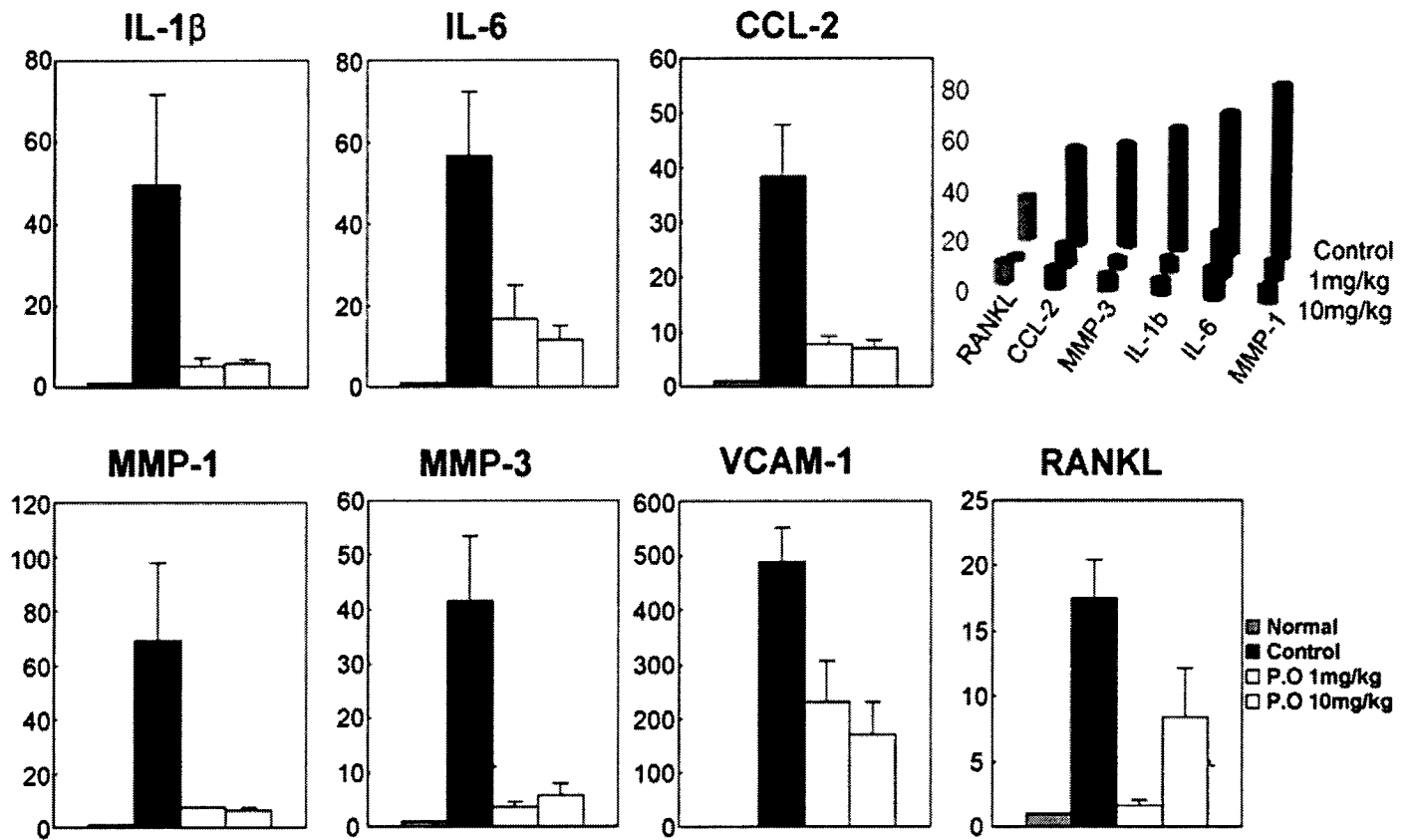


Fig. 9

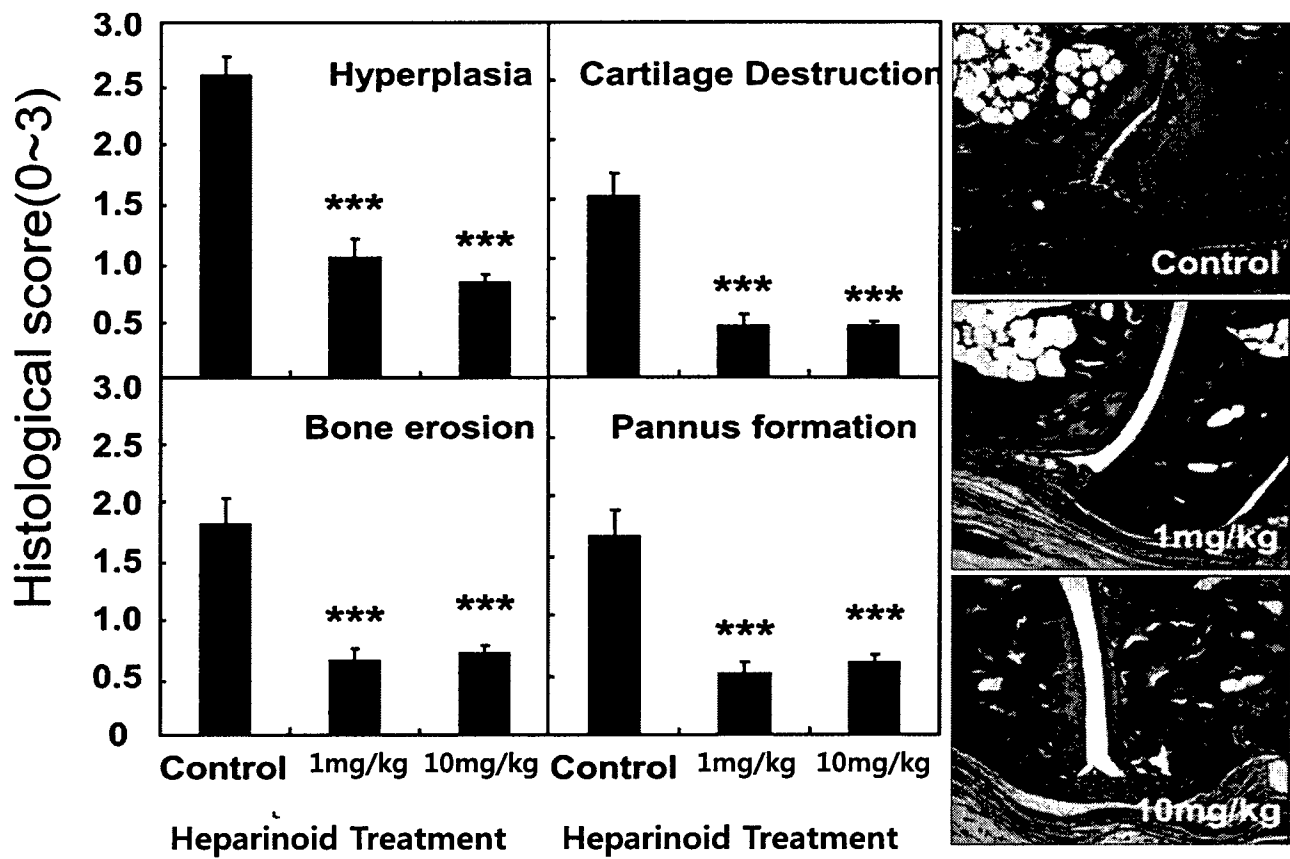


Fig. 10

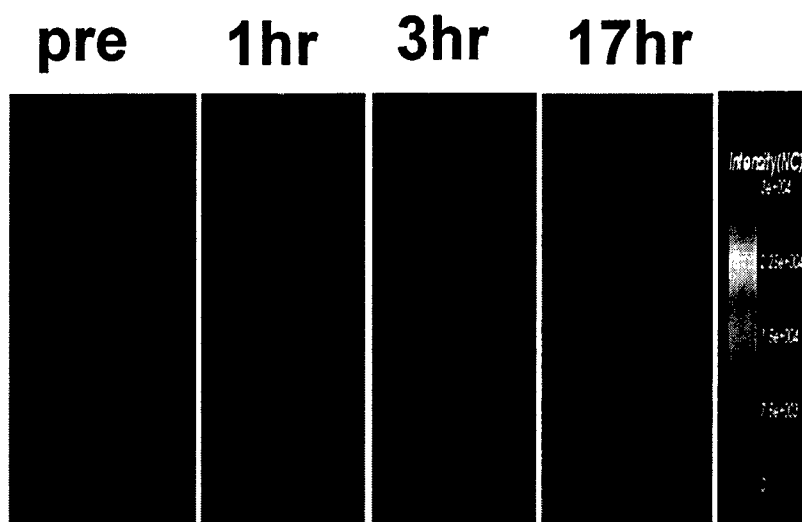
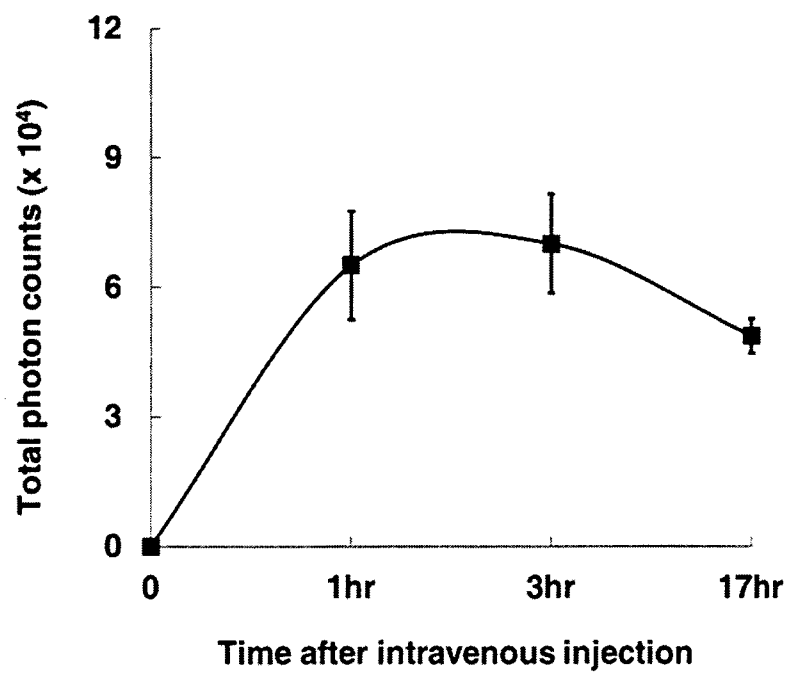
A**B**

Fig. 11

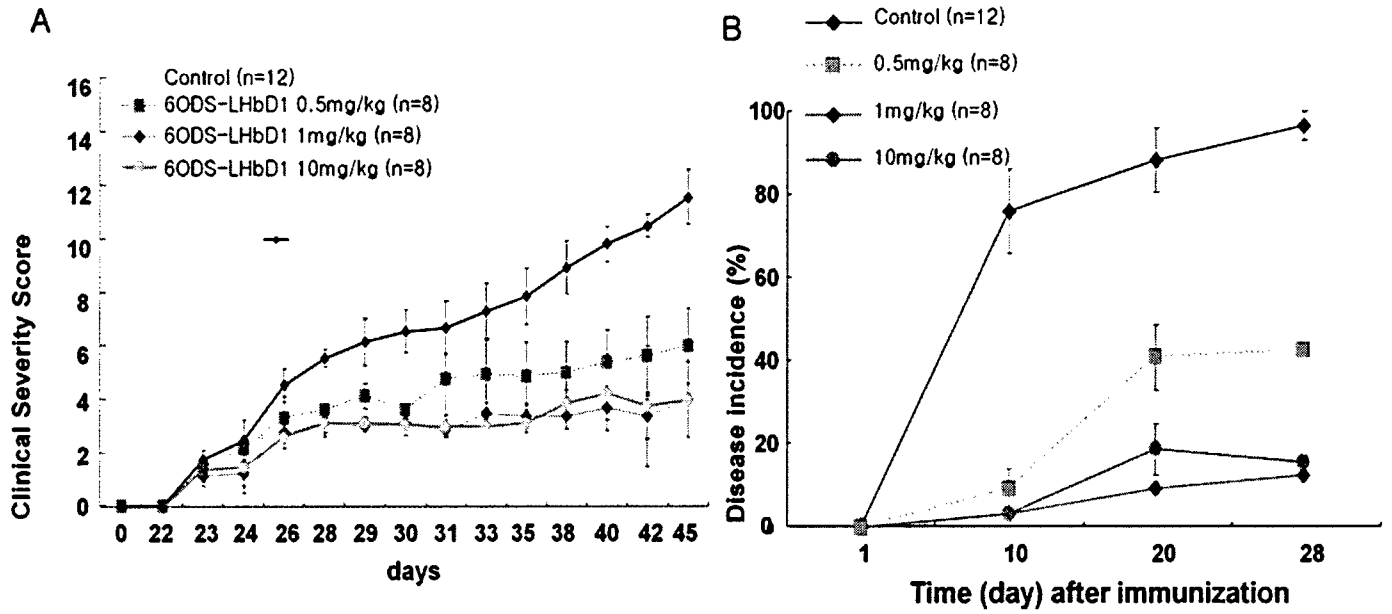


Fig. 12

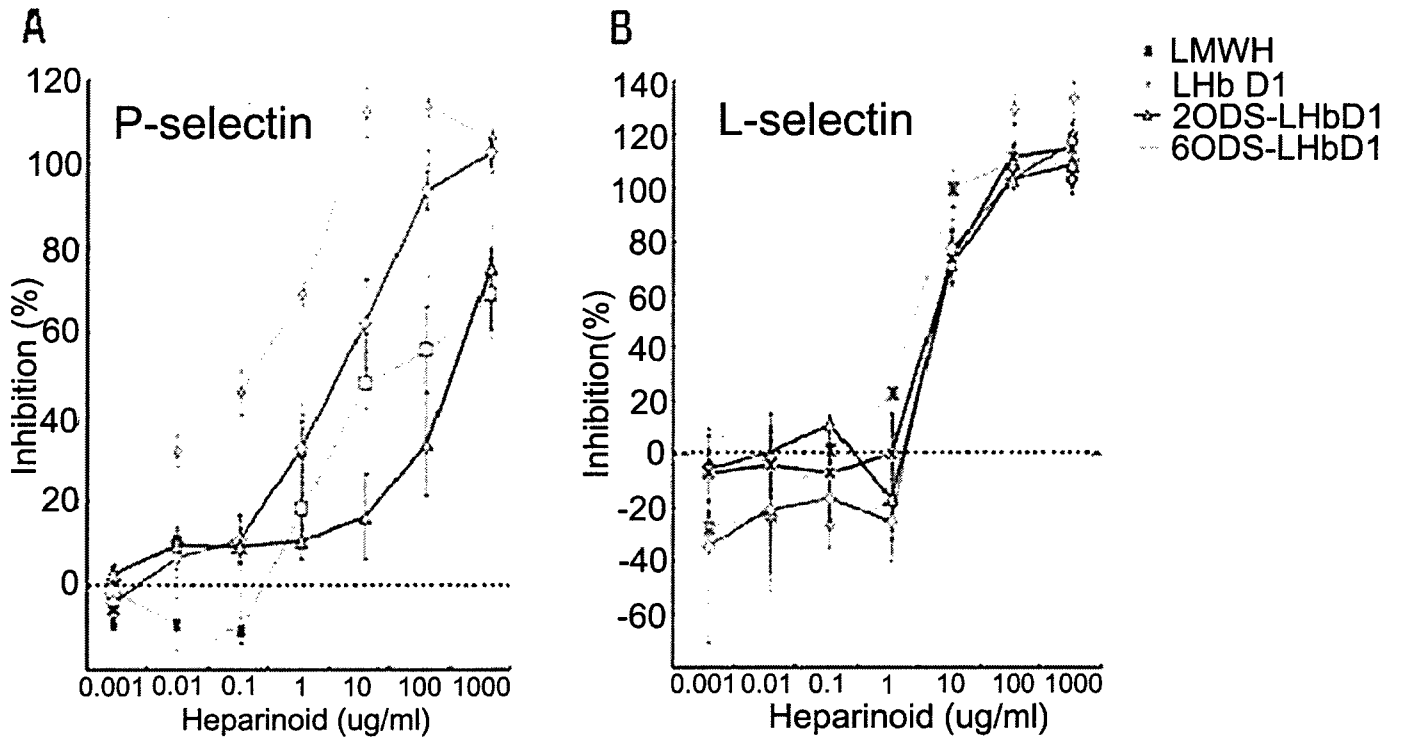


Fig. 13

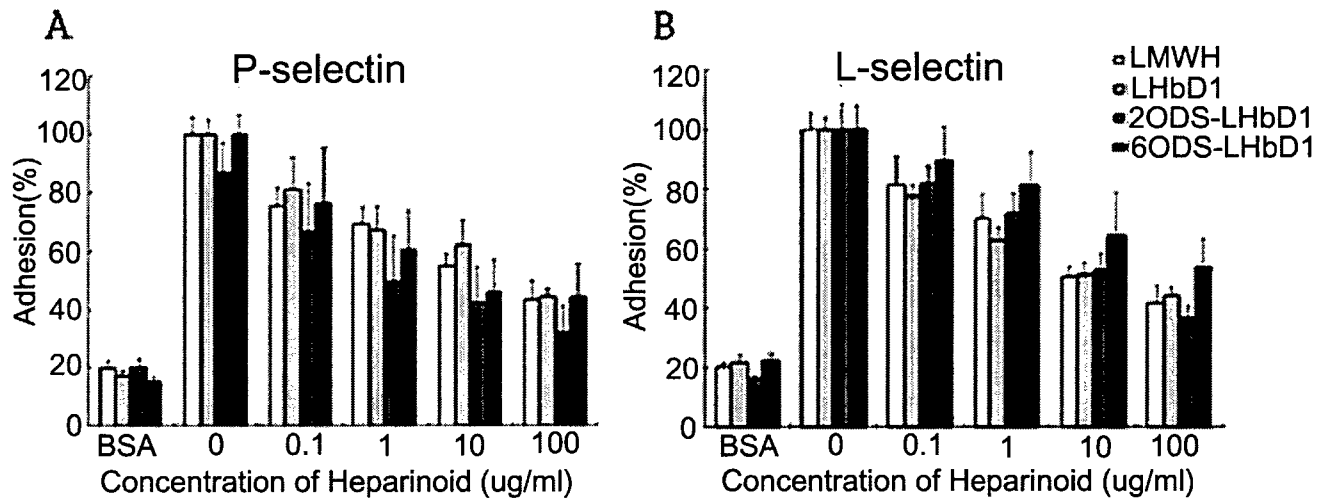


Fig. 14

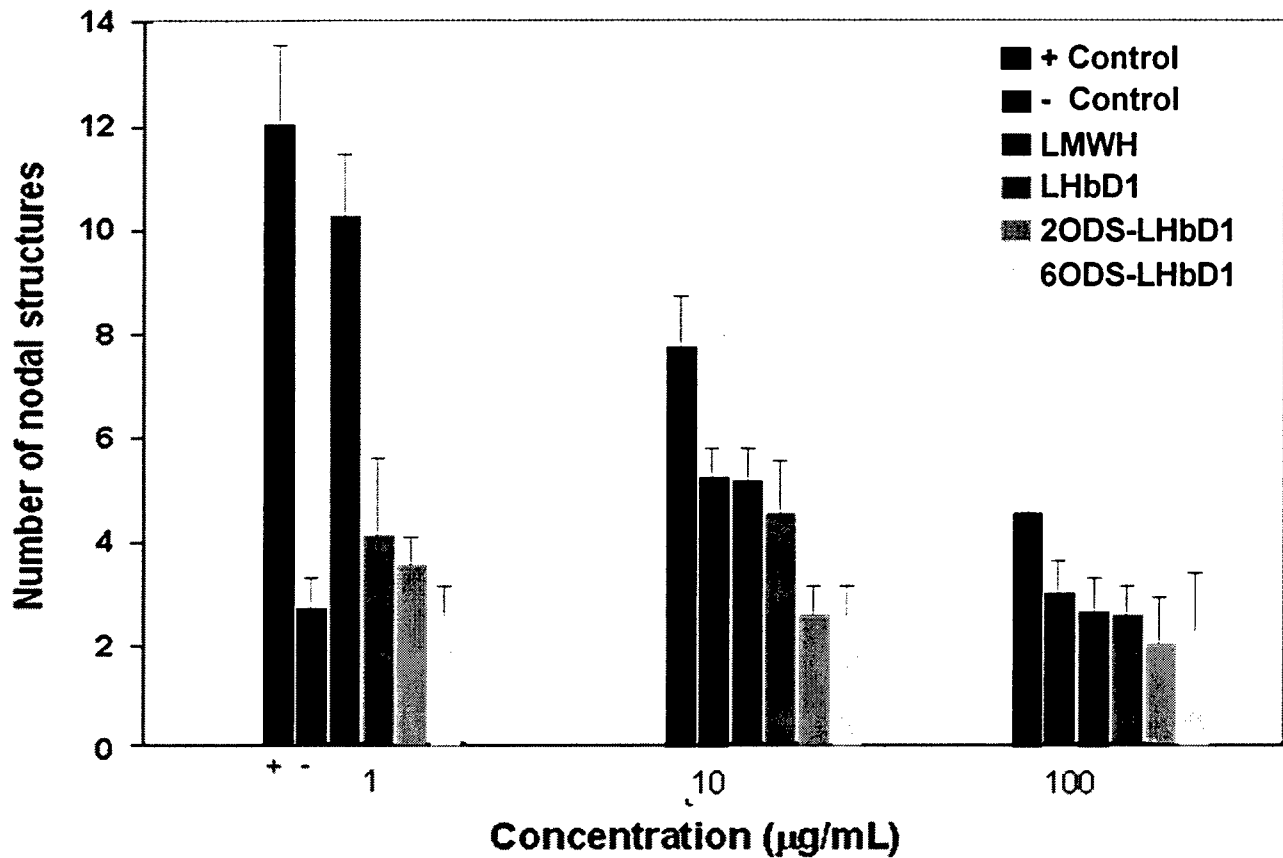
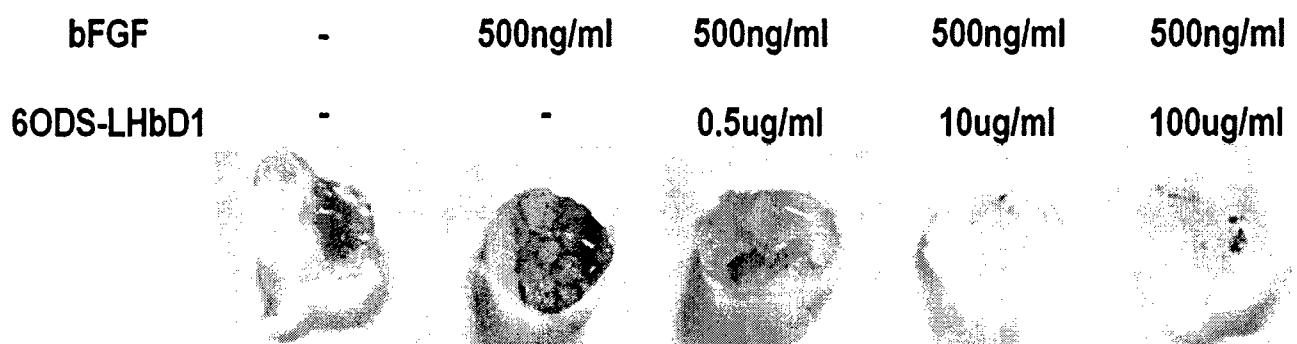


Fig. 15



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/002490**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A61K 31/575(2006.01)i, A61K 31/702(2006.01)i, A61K 9/16(2006.01)i, A61K 9/20(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i, A61P 1/04(2006.01)i, A61P 1/16(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/575; A61K 31/404; A61K 9/00; A61K 9/107

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: heparin, bile acid, inflammation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2006-052712 A1 (BAXTER INTERNATIONAL INC. et al.) 18 May 2006 See the entire document.	1-7
A	WO 2006-050165 A2 (YOO, SEO HONG) 11 May 2006 See the entire document.	1-7
A	EP 1611879 A1 (NOVAGALI PHARMA SA et al.) 04 January 2006 See the entire document.	1-7
A	WO 2004-112747 A2 (BAXTER INTERNATIONAL INC. et al.) 29 December 2004 See the entire document.	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 JANUARY 2012 (04.01.2012)

Date of mailing of the international search report

04 JANUARY 2012 (04.01.2012)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/002490

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **8**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 8 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2011/002490

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2006-052712 A1	18.05.2006	AU 2005-304952 A1	18.05.2006
		BR P10517652A	14.10.2008
		CA 2587276 A1	18.05.2006
		CN 101090720 A0	19.12.2007
		EP 1809279 A1	25.07.2007
		IL 18256300	24.07.2007
		JP 2008-519036 A	05.06.2008
		KR 10-2007-0074610 A	12.07.2007
		MX 2007005434 A	10.07.2007
WO 2006-050165 A2	11.05.2006	AT 491456 T	15.01.2011
		AU 2005-302452 A1	11.05.2006
		CA 2585471 A1	11.05.2006
		CN 101048164 A0	03.10.2007
		DE 602005025391 D1	27.01.2011
		EP 1814558 B1	15.12.2010
		IL 18280500	13.04.2008
		JP 2008-518935 A	05.06.2008
		KR 10-2007-0089926 A	04.09.2007
EP 1611879 A 1	04.01.2006	AT 439123 T	15.08.2009
		DE 602004022523 D1	24.09.2009
		EP 1611879 B1	12.08.2009
		US 2006-0002963 A1	05.01.2006
		WO 2006-003519 A2	12.01.2006
WO 2004-112747 A2	29.12.2004	AU 2004-249172 A1	29.12.2004
		CA 2540695 A1	29.12.2004
		EP 1663158 A2	07.06.2006
		NO 20061537A	04.04.2006
		US 2006-280430 A1	14.12.2006
		WO 2004-112747 A3	03.03.2005
		ZA 200603062A	25.04.2007

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/575(2006.01)i, A61K 31/702(2006.01)i, A61K 9/16(2006.01)i, A61K 9/20(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i, A61P 1/04(2006.01)i, A61P 1/16(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 31/575; A61K 31/404; A61K 9/00; A61K 9/107 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 헤파린, 담즙산, 염증		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2006-052712 A1 (BAXTER INTERNATIONAL INC. 외 6명) 2006.05.18 전문 참조.	1-7
A	WO 2006-050165 A2 (YOO, SEO HONG) 2006.05.11 전문 참조.	1-7
A	EP 1611879 A1 (NOVAGALI PHARMA SA 외 3명) 2006.01.04 전문 참조.	1-7
A	WO 2004-112747 A2 (BAXTER INTERNATIONAL INC. 외 3명) 2004.12.29 전문 참조.	1-7
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2012년 01월 04일 (04.01.2012)		국제조사보고서 발송일 2012년 01월 04일 (04.01.2012)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 이재정 전화번호 82-42-481-8148 

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 8
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

제8항은 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(IV)의 규정에 의하여 국제조사 기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

WO 2006-052712 A1

2006.05.18

AU 2005-304952 A1

2006.05.18

BR P10517652A

2008.10.14

CA 2587276 A1

2006.05.18

CN 101090720 A0

2007.12.19

EP 1809279 A1

2007.07.25

IL 182563D0

2007.07.24

JP 2008-519036 A

2008.06.05

KR 10-2007-0074610 A

2007.07.12

MX 2007005434 A

2007.07.10

WO 2006-050165 A2

2006.05.11

AT 491456 T

2011.01.15

AU 2005-302452 A1

2006.05.11

CA 2585471 A1

2006.05.11

CN 101048164 A0

2007.10.03

DE 602005025391 D1

2011.01.27

EP 1814558 B1

2010.12.15

IL 182805D0

2008.04.13

JP 2008-518935 A

2008.06.05

KR 10-2007-0089926 A

2007.09.04

EP 1611879 A1

2006.01.04

AT 439123 T

2009.08.15

DE 602004022523 D1

2009.09.24

EP 1611879 B1

2009.08.12

US 2006-0002963 A1

2006.01.05

WO 2006-003519 A2

2006.01.12

WO 2004-112747 A2

2004.12.29

AU 2004-249172 A1

2004.12.29

CA 2540695 A1

2004.12.29

EP 1663158 A2

2006.06.07

NO 20061537A

2006.04.04

US 2006-280430 A1

2006.12.14

WO 2004-112747 A3

2005.03.03

ZA 200603062A

2007.04.25