



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0111351  
(43) 공개일자 2015년10월05일

- |  |   |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/> <b>A61K 31/737</b> (2006.01) <b>A61K 38/06</b> (2006.01)<br/> <b>A61K 38/48</b> (2006.01) <b>C08B 37/00</b> (2006.01)<br/> <b>C08L 5/00</b> (2006.01) <b>C12N 9/50</b> (2006.01)<br/> <b>C12P 13/12</b> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/> <b>A61K 31/737</b> (2013.01)<br/> <b>A61K 38/063</b> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 <b>10-2015-7020125</b><br/>                 (22) 출원일자(국제) <b>2014년01월23일</b><br/>                 심사청구일자 <b>없음</b><br/>                 (85) 번역문제출일자 <b>2015년07월23일</b><br/>                 (86) 국제출원번호 <b>PCT/EP2014/051308</b><br/>                 (87) 국제공개번호 <b>WO 2014/114706</b><br/>                 국제공개일자 <b>2014년07월31일</b><br/>                 (30) 우선권주장<br/>                 MI2013A000117 2013년01월25일 이탈리아(IT)</p> | <p>(71) 출원인<br/> <b>그노시스 에스.피.에이.</b><br/>                 이탈리아 아이-20121 밀라노 피아짜 델 카르미네 4</p> <p>(72) 발명자<br/> <b>미라글리아 니콜로</b><br/>                 이탈리아 아이-20033 데시오(엠아이) 비아 라보라토리 아우토비안치 1 그노시스 에스.피.에이.<br/> <b>로시니 마우로</b><br/>                 이탈리아 아이-20033 데시오(엠아이) 비아 라보라토리 아우토비안치 1 그노시스 에스.피.에이.<br/>                 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/> <b>리앤목특허법인</b></p> |
|--|---|

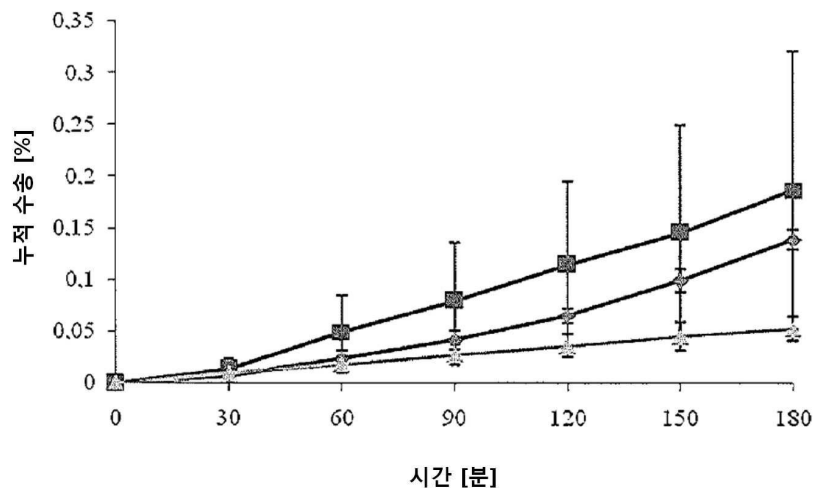
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **콘드로이틴 술페이트, 단백질 분해성 효소 및 스피드릴 화합물을 포함하는 콘드로이틴 술페이트의 생체 이용율을 개선하기 위한 조성물**

(57) 요약

본 발명은 콘드로이틴 술페이트(CS), 하나 이상의 효소 또는 단백질 분해성 활성을 갖는 효소적 혼합물, 및 스피드릴 화합물을 포함하는 관절염 및 관련된 급성 및 만성 염증성 과정의 치료 및 예방을 위한, 또는 건강 기능성 조성물로서 인간 및 동물의 근골격의 건강을 유지하기 위한 조합을 설명한다. 상기 조합의 특성은 이들이 경구 투여시의 CS의 장내 흡수를 증가시키는 것이다. 상기 조합의 효과는, 높은 분자량을 가진 샘플보다 더 큰 생체 이용율을 이미 갖는 것으로 알려진 매우 낮은 분자량을 갖는 CS 샘플을 포함하여, 넓은 범위의 분자량의 CS에 대하여 발휘된다. 상기 효과는 임의의 기원의 CS 샘플에 대하여 발휘된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A61K 38/48* (2013.01)  
*C08B 37/0003* (2013.01)  
*C08B 37/0069* (2013.01)  
*C08L 5/00* (2013.01)  
*C12N 9/50* (2013.01)  
*C12P 13/12* (2013.01)

(72) 발명자

**비안키 다비데**

이탈리아 아이-20033 테시오(엠아이) 비아 라보라  
토리 아우토비안치 1 그노시스 에스.피.에이.

**트렌틴 안토넬라**

이탈리아 아이-20033 테시오(엠아이) 비아 라보라  
토리 아우토비안치 1 그노시스 에스.피.에이.

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

콘드로이틴 술페이트, 프로테아제 및 선택적으로 술피드릴화 화합물을 포함하고, 상기 콘드로이틴 술페이트/프로테아제/술피드릴화 화합물의 비율은 1.0/0.05-0.8/0.001-0.05이고, 상기 프로테아제가 나토키나제와 다른 경우에는, 상기 술피드릴화 화합물이 존재하는 것인 조성물.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 프로테아제는 나토키나제이고, 술피드릴화 화합물이 없는 것인 조성물.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 프로테아제는 나토키나제이고, 술피드릴화 화합물이 존재하는 것인 조성물.

#### 청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 상기 콘드로이틴 술페이트는 1 내지 95 kDa의 분자량을 갖는 것인 조성물.

#### 청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 상기 콘드로이틴 술페이트는 동물 출처로부터 추출되어 얻은 것인 조성물.

#### 청구항 6

청구항 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 상기 콘드로이틴 술페이트는 가수 분해에 의한 프룩토스 잔기의 제거 후 대장균(*E. coli*)의 협막 다당류 K4의 화학적 황산화에 의해 얻은 것인 조성물.

#### 청구항 7

청구항 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 상기 콘드로이틴 술페이트는 가수 분해에 의한 프룩토스 잔기의 제거 후의 대장균의 협막 다당류 K4의 화학적 황산화 및 그 후의 산 또는 라디칼 해중합화에 의해 얻은 것인 조성물.

#### 청구항 8

청구항 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 상기 콘드로이틴 술페이트는 대장균의 유전적으로 조작된 균주의 협막 다당류의 화학적 황산화에 의해 얻은 것이고, 상기 다당류는 처음부터 프룩토스 잔기가 없는 것인 조성물.

#### 청구항 9

청구항 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 상기 콘드로이틴 술페이트는 대장균의 유전적으로 변형된 균주의 협막 다당류의 화학적 황산화 및 그 후의 산 또는 라디칼 해중합화에 의해 얻은 것이고, 상기 다당류는 처음부터 프룩토스 잔기가 없는 것인 조성물.

#### 청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 상기 프로테아제는 브로멜라인, 파파인, 피신 및 나토키나제로부터 선택된 것인 조성물.

#### 청구항 11

청구항 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 상기 술피드릴화 화합물은 메티오닌, 시스테인, 호모시스테인, S-아데노실메티오닌, 아세틸시스테인, 환원된 또는 산화된 글루타티온, S-아세틸-글루타티온으로부터 선택된 것인

조성물.

**청구항 12**

청구항 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 급성 및 만성 염증의 예방 또는 치료에 사용되는 유효 성분 및/또는 하나 이상의 인간 및 동물의 근골격의 건강(wellness)을 유지하기 위해 사용되는 건강 기능성 물질을 더 포함하는 것인 조성물.

**청구항 13**

청구항 12에 있어서, 상기 하나 이상의 유효 성분은 글루코사민 히드로클로리드, 글루코사민 술페이트, N-아세틸글루코사민, 히알루론산, 아미노산, 콜라겐, 가수분해된 콜라겐, 다중불포화 지방산, 케라틴, 메틸sul포닐메탄, 폴레이트(folate), 환원된 폴레이트, 비타민, 그룹 B 비타민, S-아테노실메티오닌(SAME), 아스코르브산 및 망간 아스코르베이트로 구성된 군으로부터 선택된 것인 조성물.

**청구항 14**

청구항 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 미결정 셀룰로스, 스테아르산, 마그네슘 스테아레이트, 콜로이드성 실리카, 에틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 셀락 수성 염, 소듐 알기네이트, 녹말, 변형된 녹말, 메타크릴산 코폴리머, 말토덱스트린 및 폴리올로부터 선택된 약학적으로 또는 건강 기능적으로 허용 가능한 하나 이상의 부형제를 더 포함하는 것인 조성물.

**청구항 15**

청구항 1 내지 14 중 어느 하나에 있어서, 급성 및 만성 염증을 예방 또는 치료에 사용하기 위한 것 및/또는 인간 및 동물의 근골격의 건강을 유지하기 위한 것인 조성물.

**청구항 16**

청구항 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 캡슐, 연질 겔 캡슐, 타블렛, 과립, 액상 음료 또는 재구성된 분말 음료를 포함하는 고체 경구용 제형인 것인 조성물.

**청구항 17**

콘드로이틴 술페이트의 장내 투과성을 향상시키기 위한 나토키나제.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 콘드로이틴 술페이트(chondroitin sulphate: CS), 단백질 분해 활성을 갖는 효소 또는 효소 혼합물을 포함하는 조성물 단독 또는 슬퍼드릴 화합물 존재하의 조성물, 및 이의 관절염(osteoarthritis) 및 이와 관련된 급성 및 만성 염증성 반응의 치료 및 예방에서의 용도, 또는 인간 및 동물의 근골격계 건강(well-being)을 유지하기 위한 건강 기능성 조성물(nutraceutical composition)로서의 용도에 관한 것이다.

[0002] 상기 조합은 경구 투여시의 CS의 장내 흡수를 증가시킨다. 상기 조합의 효과는, 높은 분자량을 갖는 샘플보다 생체 이용률(bioavailability)이 더 크다고 이미 알려진 매우 낮은 분자량(1-10 kDa)을 특징으로 하는 올리고당으로 구성된 시료를 포함하여, 넓은 범위의 분자량의 CS에 대하여 발휘된다.

**배경 기술**

[0003] CS는 광범위한 임상적 증거에 기초하여 무릎, 둔부 및 손의 관절염의 치료에서 관절염의 증상의 진행을 늦추는 약물(symptomatic slow-acting drug for osteoarthritis: SYSADOA)로서 EULAR(European League against Rheumatism)에 의해 추천된다. CS는 또한 건강 기능 식품으로서, 단독으로 또는 다른 성분과 함께 결합된 국부적 및 전신적 수준에서 항-염증성 활성을 수행하는 조성물로서 사용된다.

[0004] 콘드로이틴 술페이트(CS)는 척추 동물 및 무척추 동물 모두에 존재하는 글리코사미노글리칸(GAG)에 속하는 다당류이고, 베타 1-3 결합으로 결합된 글루쿠론산 잔기와 N-아세틸-D-갈락토사민(GalNAc) 잔기가 번갈아 나타나고 여러 위치에서 황산화된 이당류 서열로 구성된다. 상기 이당류는 차례로 베타 1-4 결합에 의해 결합된다. CS는

주로 GalNAc의 4 위치 또는 6 위치(각각 이당류 A 및 C로 지칭)에서 단일 황산화된 이당류 단위로 구성된다. CS A 및 C는 다당류의 기원에 따라 다른 비율로 나타난다. CS에는 또한, 적지만 가변적 범위에서 특정 동물 출처에 따라, 비-황산화 이당류 및 다양한 위치에서 산소 원자에 결합된 2개의 술페이트기를 갖는 이황산화 이당류가 존재한다: GlcA의 2 위치 및 GalNAc의 4 위치, 또는 GalNAc의 4 및 6 위치(이당류 E)(Volpi N.J. Pharm. Pharmacol. 61, 1271, 2009. Volpi N.J. Pharm. Sci. 96, 3168, 2007. Volpi N. Curr. Pharm. Des. 12, 639, 2006).

- [0005] 다른 동물 출처의 CS는 또한 다른 분자량을 특징으로 한다.
- [0006] 예를 들면, 육상 동물로부터 기원한 CS들은 서로 유사하지만, 높은 분자량 값을 갖는 어류 종으로부터 기원한 것들과는 다른 분자량 값을 갖는다. 육지 기원의 CS는 평균 분자량의 범위가 14 내지 26 kDa인 반면, 오징어, 연골성 및 골성(bony) 물고기로부터의 해양 기원의 CS는 50 kDa을 초과하는 평균 분자량을 갖는다.
- [0007] 동물 출처의 CS 이외에도, 몇몇 CS 산물은 박테리아 기원의 다당류 뼈대에 기초하고, 이후 합성에 의해 변형되어 자연적 CS와 유사한 폴리머를 얻는 것으로 설명된다. 이러한 박테리아-합성 기원의 생명공학적 CS는 잔류 불순물 사이의 바이러스 및/또는 프리온 또는 다른 잠재적인 알레르기성 고분자의 존재 가능성; 최종 생산물의 높은 동물성 단백질 함량; 동물성 제품의 종교적 또는 식이적 제한과의 비호환성; 및 제한된 전세계적인 수요의 충족이 가능한 출처와 같은, 동물 출처의 추출된 CS와 관련한 단점을 극복한다.
- [0008] 박테리아 합성 기원의 CS의 예시는, 예를 들면, EP 1304338에 설명되어 있고, 본래의 폴리머의 추출 및 가수 분해 이후 대장균(*E. coli*) 균주 05:K4:H4의 협막 다당류(capsular polysaccharide)가 화학적으로 황산화되는 것이 기재되어 있다. 다른 박테리아 합성 CS의 예시는 WO 2012/152872, WO 2012/159655, 및 WO 2013/174847에 개시되어 있으며, 박테리아 협막 다당류가 화학적으로 황산화되어 동물 출처의 것과 유사한 CS를 얻는 것이 기재되어 있다.
- [0009] 마지막으로, 몇몇 예시에서는 저분자량 CS가 추출된 다당류((Cho SY et al. Biol. Pharm. Bull. 27, 47, 2004, Das A. et al. Osteoart. Cartil. 8, 343, 2000) 및 박테리아 기원의 다당류(WO 2013/174847, WO 2012/152872)의 해중합화(depolymerization)에 의해 얻어진다. CS의 이러한 형태의 작은 분자 치수(dimension)는 자연적 CS의 많은 알려진 활성을 유지하면서 더 나은 경구 흡수에 이르게 한다.
- [0010] 경구 투여시, CS는 소장 및 말초 기관(distal tract)에서 장내 점막에 의해 흡수된다. CS는 대부분이 맹장 및 결장에서 올리고당의 형태로 흡수되는 동안, 일부는 소장에서 고분자량 다당류로서 흡수된다(Lauder R.; Compl. Ther. Med. 17, 56-62, 2009). 상기와 같은 올리고당은 소화기관의 하부기관에서 장내 미생물에 의해 생산된 가수분해 효소에 의한 본래의 다당류의 부분적 해중합화에 의해 생성된다.
- [0011] 비록 CS를 구성하는 다당류의 장내 흡수에 관한 상기 메커니즘은 완전히 명확하지는 않지만, 장내 상피세포의 세포층의(paracellular) 공간을 통한 흡수는 대부분의 고분자를 위한 경우로서, 양적인 면에서 중요한 것으로 여겨진다; CS의 올리고당 조각 또한 상기 경로를 통해 흡수된다. 그 운송이 장내 점막을 통한 특정 분자 담체에 의한 매개를 포함하지 않는 큰(large) 분자와 관련하여, 큰 분자의 흡수를 제한하는 보호막을 형성하는 밀착 접합(tight junction)이 본 수준에서 존재한다.
- [0012] 고분자량 CS의 흡수는 약 1-5% 정도로 추정된다. 상기 언급한 바와 같이, 흡수되는 대부분의 CS는 장내 미생물에 의해 생산된 콘드로이티나제에 의한 이의 효소적 소화(digestion)로부터 유래된 올리고당으로 구성된다. 그러나, 올리고당의 흡수를 계산해 보면, 장내 점막에 의한 총 CS의 흡수는 소화된 다당류의 20-23%를 초과하지 않는다(Lauder R.; Compl. Ther. Med. 17, 56-62, 2009 - Barthe L. et al. Arzneimittelforsch./Drug Res. 2004; 54: 286-92).
- [0013] 일반적으로, 경구 섭취 후 CS의 흡수는 문제로 남으며, 상기 글리코사미노글리칸의 장내 흡수를 증가시키는 임의의 방법이 매우 화제가 된다.
- [0014] 브로멜라인은, 브로멜리아세아에(Bromeliaceae) 과에 속하는, 파인애플(*Ananas comosus*)의 열매 및 줄기로부터 추출된 시스테인 프로테아제 혼합물이다. 이의 추출을 위한 주요 출처는, 이의 농도가 가장 높은, 열매의 줄기이다. 이 혼합물의 4개의 분리된 분획이 구별될 수 있고, 또는, 질량 분석법에 의해 수행되는 더 세련된 분석적 특징에 따라서, 모두 유사한 단백질 분해 활성을 갖는 8개의 단백질 분해성 성분으로 구별될 수 있다. 자연 형태의 상기 혼합물은 보통 이러한 이유로 사용된다. 브로멜라인은 C1A 펩티다제(MEROPS 명명)의 서브-패밀리에 속하는 엔도펩티다제로 분류된다. 상기 프로테아제 혼합물 이외에도, 상기 추출물은 퍼옥시다제, 산 포스파타제 및 글리코시다제를 포함한다. 상기 성분들의 분자량은 8 내지 28.5 kDa이다. 상기 브로멜라인의 농도는 종종 무

계 단위보다는, 단백질 분해성 단위(proteolytic unit)(GDU 단위 또는 국제 단위, IU)로 표현된다.

- [0015] 이의 단백질 분해성 특성의 관점에서, 브로멜라인은 췌장 프로테아제와 유사한 활성을 갖고, 따라서 소화를 촉진한다. 이는 췌장 추출물과 함께 조합으로 소화 불량에 사용된다. 브로멜라인은 또한 긴-사슬 지방을 분해(split)한다.
- [0016] 브로멜라인은 또한 다른 약리적 활성들을 가지고 있는데, 이 중 가장 중요한 것은 외상 또는 수술 후 반응 및 국소적 염증과 관련한 연부 조직의 염증 상태의 치료에 그것을 효과적이게 하는 강력한 항-염증성 활성이다. 브로멜라인은 항-염증성 프로스타글란딘(E2 프로스타글란딘과 같은)의 생합성을 증가시키고 반대로 염증-촉진성(pro-inflammatory) 프로스타글란딘의 생합성을 저해함으로써 이러한 활성을 발휘하는 것이 증명되었다.
- [0017] 브로멜라인의 다른 약리적 활성은 항-혈전성 및 섬유소 용해-촉진성(pro-fibrinolytic) 작용, 혈압 강하 활성 및 동맥 경화성 플라크의 감소를 유도하는 능력을 포함한다. 이의 항생 및 항암 치료에서의 상승 작용적 능력 또한 설명되었다.
- [0018] 브로멜라인은 약 40%로 추정되는 우수한 경구의 생체 이용율을 특징으로 하고, 이는 단백질에서는 드문 특징이다. 더욱이, 흡수되지 않은 브로멜라인의 대부분은, 위액 또는 타액에 존재하는 시스타틴에 의해 강하게 공격받지 않기 때문에, 그대로 남아 장 내강에서 이의 효소적 활성을 발휘할 수 있다. 이의 특성의 관점에서 보자면, 이는 각각 파파야(*Carica papaya*) 및 무화과(*Ficus carica*)로부터 유래된 유사한 추출물인 파파인 및 피카인(ficain)과 유사하다.
- [0019] 나토키나제는, 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 특정 종류인, B. 서브틸리스 나토(*B. subtilis natto*)로 발효된 끓인 대두에 기초한 전통적인 일본 음식인 나토(*natto*)로부터 처음 분리된 효소이다.
- [0020] 나토키나제는 강력한 피브린 용해성 활성을 갖는 약 32kDa의 세린 프로테아제이다. 이의 수브틸리신과의 상동성은 72%를 초과한다. 이의 피브린 용해성 활성은 우로키나제 및 플라스민의 생산의 증가를 유도하는 능력과 함께 피브린 용해에서의 직접적인 작용을 포함한다. 나토키나제는 온도 및 낮은 pH 값에 대하여 상대적으로 높은 안정성을 특징으로 한다; 이러한 특성은 본 단백질에 위장 환경(gastric environment)에 대한 우수한 저항성을 주고, 경구 투여에 의한 사용을 가능하게 한다.
- [0021] 위장 환경에 대한 상대적 안정성의 특성 및 이의 단백질 분해성 활성은 이 효소를 여기 설명된 브로멜라인과 그 사용에서 유사성을 나타낼 수 있게 한다.
- [0022] US 5679344는 글루코사민 및 항-염증성 특징을 갖는 단백질 분해성 효소를 포함하는 관절 질병에 사용하기 위한 영양제 조성물을 개시한다.
- [0023] US 5888514는 비타민 및 식물 추출물과 함께, 연골, 단백질 분해성 효소, 글루코사민 술페이트 및 콘드로이틴 술페이트를 포함하는 뼈 및 관절의 염증의 치료에 사용하기 위한 조성물을 개시한다.

**발명의 내용**

**과제의 해결 수단**

- [0024] CS와 브로멜라인의 조합 및 시스테인과 같은 브로멜라인 활성 증폭제(enhancer), 메티오닌, 글루타티온 또는 다른 설피드릴 화합물의 동시 존재는 소장에서의 이의 흡수를 증가시키는 것이 발견되었다.
- [0025] 또한, 나토키나제가 CS의 생체 이용율을 250%를 초과하여 증가시키는 더욱 놀라운 효과를 가지는 것이 발견되었다.
- [0026] 본 발명의 목적은 콘드로이틴 술페이트 및 하나 이상의 프로테아제, 및 상기 프로테아제가 나토키나제 이외의 것일 때는 설피드릴 화합물이 존재하는 것인, 선택적으로 설피드릴 화합물을 포함하는 조성물이다.
- [0027] "설피드릴 화합물(sulphydryl compound)"은 본 명세서에서 적어도 하나의 설피드릴 화합물을 포함하는 자연적 또는 합성적 아미노산 또는 작은 펩티드 또는 다른 화합물을 의미한다. 상기 설피드릴 화합물은 바람직하게는 메티오닌, 시스테인, 호모시스테인, S-아데노실메티오닌, 아세틸시스테인, 환원된 또는 산화된 글루타티온 및 S-아세틸-글루타티온으로부터 선택된 것이다.
- [0028] 본 발명에 따르는 조성물에서, 상기 콘드로이틴 술페이트/프로테아제/설피드릴 화합물의 비율은 1.0/0.05-0.8/0.001-0.05이다.



- [0029] 콘드로이틴 술페이트는 바람직하게는 1 내지 95 kDa의 분자량을 가지고, 더욱 바람직하게는 4 내지 50 kDa의 분자량을 가진다
- [0030] 콘드로이틴 술페이트는 바람직하게는 동물 출처로부터 추출된 것이다. CS는, EP 1304338, WO 2012/152872, WO 2012/159655에 기재된 바와 같이 가수 분해에 의한 프록토스 잔기의 제거 후의 대장균의 협막 다당류 K4의 화학적 황산화, 또는 WO 2013/174847 및 WO 2012/152872에 기재된 바와 같이 가수 분해에 의한 프록토스 잔기의 제거 후의 대장균의 협막 다당류 K4의 화학적 황산화 및 그 후의 산 또는 라디칼 해중합화에 의해 얻어질 수 있다. 대안적으로, CS는 유전적으로 변형된 대장균 균주(즉, DSM23644)의, 처음부터 프록토스 잔기가 없는 협막 다당류의 화학적 황산화에 의해 얻어질 수 있다(WO 2012/159655). WO 2013/174847과 같이, 상기 얻어진 CS의 분자 치수는 이후 산 또는 라디칼 해중합화에 의해 줄어들 수 있다.
- [0031] 상기 프로테아제는 바람직하게는 브로멜라인, 파파인, 피카인 및 나토키나제로부터 선택된 것이다. 나토키나제가 바람직하다. 따라서, 본 발명의 바람직한 일 구체에는 술페이트 화합물이 없는, 콘드로이틴 술페이트 및 나토키나제를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 콘드로이틴 술페이트의 장내 투과성을 향상시키기 위한 나토키나제의 용도에 관한 것이다.
- [0032] 본 발명에 따른 조성물은 또한 하나 이상의 급성 및 만성 염증성 상태의 예방 또는 치료에 사용되는 활성 성분 및/또는 인간 및 동물의 근골격의 건강을 유지하기 위해 사용되는 건강 기능성 물질을 포함할 수 있다.
- [0033] 상기 활성 성분은, 예를 들면, 글루코사민 히드로클로리드, 글루코사민 술페이트, N-아세틸글루코사민, 히알루론산, 아미노산, 콜라겐, 가수분해된 콜라겐, 다중불포화 지방산, 케라틴, 메틸sul포닐메탄, 폴레이트, 환원된 폴레이트, 비타민, 그룹 B 비타민, S-아테노실메티오닌(SAMe), 아스코르브산 및 망간 아스코르베이트로부터 선택될 수 있다.
- [0034] 상기 조성물은 또한 하나 이상의 약학적으로 또는 건강 기능적으로 허용 가능한 부형제를 포함할 수 있다.
- [0035] 글루코사민 및 메틸sul포닐메탄(MSM)과 같은, 콘드로이틴 술페이트와 일반적으로 결합되는 모든 성분은 상기 제제(preparation)에 첨가될 수 있다.
- [0036] 약학적으로 또는 건강 기능적으로 허용 가능한 부형제는, 예를 들면, 미결정 셀룰로스, 스테아르산, 마그네슘 스테아레이트, 콜로이드성 실리콘 디옥사이드, 에틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 수정 셀락 염, 소듐 알기네이트, 녹말, 변형된 녹말, 메타크릴산 코폴리머, 말토덱스트린 및 폴리올이다.
- [0037] 본 발명에 따른 조성물은 바람직하게는, 예를 들면 캡슐, 연질 젤 캡슐, 타블렛, 과립, 액상 음료 또는 재구성되는 분말 음료의 형태로 경구 투여된다. CS의 일일 용량은 건강 기능성 분야에서 400 mg 내지 3600 mg일 수 있고, 약제로서의 일반적인 일일 용량은 1200 mg이다.

### 도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1은 쥐 장내 점막을 통한 소(bovine) 콘드로이틴 술페이트(20 kDa, 다이아몬드), LMW 콘드로이틴 술페이트(9 kDa, 사각형), 및 HMW 콘드로이틴 술페이트(40 kDa, 삼각형)의 투과성을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### [0039] 실험 부분

- [0040] CS의 투과성을 인 비트로(in vitro) 모델에서 테스트하였고, 여기서 쥐(rat) 장 점막을 안락사 직후에 동물로부터 절개하였고, 공여체 구획(donor compartment)이라 명명되는, 일 구획을 마주보는 장 내강에 본래 노출된 점막의 측면, 및 수용체 구획(acceptor compartment)이라 명명되는, 다른 구획을 마주보는 기저 부분을 갖는 두 개의 구획의 인터페이스에서 적합한 버퍼 중 침지된 어싱 챔버(Ussing chamber)에 놓아 두었다.
- [0041] CS를 다른 조합의 성분의 존재 또는 부재하에서 공여체 구획에 놓아 두었고, CS가 쥐 장 점막으로 구성된 막을 통하여 수용체 구획에 침투하는 동안의 인큐베이션 기간 후에 다당류의 존재를 수용체 구획에서 결정하였다.
- [0042] 다양한 조합에서의 CS의 장 투과성을 평가하는데 사용된 실험적 기법을 이제 하기에서 더욱 자세히 기재한다. 150 내지 170 g 무게의 루이스(Lewis) 쥐를 CO<sub>2</sub> 흡입으로 안락사시켰고, 소장을 즉각적으로 절개하고, 세척하고, 125 mM 소듐 클로리드 (NaCl), 1.3 mM 마그네슘 술페이트(MgSO<sub>4</sub>), 5 mM 포타슘 클로리드(KCl), 20 mM 글루코스 및 25 mM 소듐 카르보네이트(NaHCO<sub>3</sub>)로 구성된 배지로 채워진 어싱 챔버에 놓아 두었다. 용액의 pH를

HEPES로 7.4로 조절하였다. 투과 연구는 95% O<sub>2</sub> 및 5% CO<sub>2</sub>로 구성된 대기에서 37°C의 온도에서 수행하였다. 투과 테스트는 장 점막의 절개 후 15분을 넘지 않도록 수행하였다.

[0043] 테스트에서 사용된 CS 시료는 천연 및 분자 치수의 관점에서 상이하였다. 소 유래 및 생물공학적(박테리아-합성) 유래의 CS 시료에 대해 다양한 조합으로 장 투과 테스트를 수행하였다. 사용된 CS 시료는 또한 1 내지 95 kDa, 또는 바람직하게는 4 내지 50 kDa 범위의 상이한 분자량을 특징으로 한다.

[0044] 콘드로이틴 술페이트를 3%(질량/부피)의 농도로 공여체 구획에 첨가하였다. 브로멜라인의 존재하에서 투과 연구를 위해, 브로멜라인을 CS 용액에 1.5%의 농도로 첨가하였다. 대안적으로 메티오닌, 시스테인, 호모시스테인, S-아데노실메티오닌, 아세틸시스테인, S-아세틸-글루타민 및 환원된 또는 산화된 글루타민으로부터 선택된 술페이트 화합물을 브로멜라인과 함께 0.075%의 농도로 첨가하였다. 나토키나제의 존재하에서 투과 연구를 위해, 브로멜라인에 관하여 효소를 용액에 1.5%의 농도로 첨가하였다.

[0045] 총 인큐베이션 기간은 3시간이었고, 그 동안 100 μl 시료를 매 30분마다 수용체 구획으로부터 취하였고, 제거된 부피를 신선한 배지로 대체하였다. 취해진 시료를 CS를 구성하는 이당류의 존재에 대해 HPLC로 분석하였고, 콘드로이티나아제 ABC(특이 활성: 0.5 U/ml)로의 다당류의 소화 후에 하기에 기재된 방법을 사용하였다.

[0046] 적용된 HPLC 방법은 오로지 산성화된 물 내에서의 5분 동안 제1 등용매 용리(isocratic elution) 후에 강한 음-이온 컬럼(SAX), pH 4로 산성화된 물에 기반한 용리액, 및 25분에서 1.2 M NaCl 0% 내지 100%를 갖는 선형 구배의 사용을 포함하였다. 사용된 유동 속도는 1.0 ml/min이었고, 이당류의 검출은 UV 검출기로 232 nm에서 수행하였다.

[0047] 수용체 구획에서의 CS의 양은 초기 CS 농도  $C$ 의 0.75% 내지 100%의 범위에 대응하는 표준 콘드로이틴 술페이트의 8-점 검정 곡선(eight-point calibration curve)으로 계산하였다. 콘드로이틴 술페이트 표준을 콘드로이티나아제 ABC로 전-인큐베이션 하였고, 실험을 위해 사용하기 위해 동일한 배지에서 희석하였다. 수용체 구획에서 발견된 CS에 기반하여, 겔보기 투과 계수(apparent permeability coefficient)( $P_{app}$ )를 수학적  $P_{app} (cm/sec) = Q/A \cdot C \cdot t$ 로 계산하였고, 여기서  $Q$ 는 투과된 CS의 총량(μg)이고,  $A$ 는 어싱 챔버 (cm<sup>2</sup>)의 확산 면적이고,  $C$ 는 공여체 구획에서의 CS의 초기 농도(μg/cm<sup>3</sup>)이고, 및  $t$ 는 인큐베이션 시간(30 내지 180분)이다. 증가율  $R$ 은  $(P_{app} CS + 프로테아제)/(P_{app} CS 단독)$ 으로  $P_{app}$ 에 대하여 계산하였다.  $P_{app}$ 는 각 시료를 취하였을 때, 즉, 30, 60, 90, 120, 150 및 180 분에 계산하였다. 이후, 이들 시점에서 수득된 상이한  $P_{app}$  값의 평균을 전체 실험에서 모든 시료의 평균 투과 계수를 얻기 위하여 계산하였다. CS 투과 데이터를 개별적으로 측정된, 이당류 Δdi-OS, Δdi-6S, 및 Δdi-4S의 농도 피크의 평균으로 표현하였다.

[0048] 데이터의 통계적 값은 최소의 유의성으로  $p < 0.05$ 를 갖는 스튜던트 "t" 테스트로 분석하였다.

[0049] 이 실험 모델의 유효성은 상이한 분자량, 즉 9, 20 및 40 kDa의 세 개의 CS 시료가 인 비보(in vivo)에서 일어나는 바와 같이 분자량의 기능인 장 막에 대한 투과도를 나타내었다는 사실에 의해 확인될 수 있다. 이것은 실험의 180 분 기간 내에서 고려된 모든 시간 간격에서 CS의 누적되는 수송을 보여주는 그래프에 의해 증명된다(도 1).

[0050] 저(9 kDa) 또는 고(40 kDa) 분자량을 갖는 비-동물성 출처의 CS의 시료를 이후에 프로테아제의 존재 및 부재에서, 및 브로멜라인의 경우에 있어서는 증폭제 화합물의 첨가와 함께 또는 없이, 투과 테스트에 사용하였다.

[0051] CS 시료의 시간 동안의 투과도의 결과는 다른 보강제(adjuvant)의 부재하에서, 또는 브로멜라인, 브로멜라인 및 메티오닌, 또는 나토키나제의 존재하에서 수득하였다.

[0052] 많은 고분자의 세포사이의 투과를 촉진하는 브로멜라인의 활성이 알려져 있고, 이 활성이 밀착연접(tight junction)을 약하게 하는 것과 관련되어 있다 하더라도(Grabovac et al., Int. J. Pharm. 326, 153-159, 2006), 이 테스트에 있어서, 다른 인자의 간섭 없이 브로멜라인 단독의 사용은 저-분자-량 CS의 흡수를 증가시키지 않았다. 이는 표 1에 나타난 바와 같이, 밝혀진 평균  $P_{app}$  값 사이의 비교로부터 알 수 있다. 그러나, 주목할만한 증가가 저-분자량 CS, 브로멜라인 및 메티오닌의 조합에 대하여 관찰되었다. 장 점막 투과도의 놀라운 증가는 또한 저-분자-량 CS 및 나토키나제의 조합의 경우에서 관찰되었다(표 1). 증가율  $R$ 은 CS/브로멜라인/메티오닌의 조합에 대하여 1 초과 값을 갖고, CS/나토키나제의 조합에 대하여 명확히 1보다 높은 값을 갖고, 반면에  $R$ 은 CS/브로멜라인의 조합에 대하여 1 보다 낮다(표 2). 그러므로 메티오닌은 CS의 장 투과도의



증폭제로서 브로멜라인의 작용에 대한 놀랍도록 유리한 효과를 나타내고, 더욱 놀라운 것은 나토키나아제는 다른 인자의 간섭 없이 저분자량 CS의 장 투과도를 거의 두 배 증가시킨다. 대응되는 큰 다당류에 비해 이미 더욱 생체가용한 저분자량의 CS의 생체이용율은 기재된 조합에 의해 더 증가된다는 것이 흥미롭게 주목할 점이다.

표 1

[0053]

	$P_{app}(\text{cm sec}^{-1}) \times 10^{-7}$
LMW 콘드로이틴 술페이트	2.13 ± 0.61
LMW 콘드로이틴 술페이트+브로멜라인+메티오닌	2.65 ± 1.36
LMW 콘드로이틴 술페이트+브로멜라인	1.41 ± 0.76
LMW 콘드로이틴 술페이트+나토키나아제	3.56 ± 0.04

[0054]

단독 또는 브레멜라인; 브로멜라인 + 메티오닌; 나토키나아제와의 조합의 저분자량(LMW) 콘드로이틴 술페이트의 투과에 대해 결정된 평균  $P_{app}$  값

표 2

[0055]

	증가율 (R)
LMW 콘드로이틴 술페이트+브로멜라인+메티오닌/LMW 콘드로이틴 술페이트	1.25 ± 0.18
LMW 콘드로이틴 술페이트+브로멜라인/LMW 콘드로이틴 술페이트	0.66 ± 0.35
LMW 콘드로이틴 술페이트+나토키나아제/LMW 콘드로이틴 술페이트	1.67 ± 0.20

[0056]

조합 v. 독립 저분자량 콘드로이틴 술페이트의 증가율

[0057]

비교 효과를 고분자량 CS(40 kDa), 또한 비-동물 유래의 흡수에 대하여 관찰하였다(표 3 및 4). 이 경우에 있어서, 조합의 증폭 효과는 더욱 명백하고, CS 단독의 흡수의 거의 3배이고, 이것은 증폭 효과가 흡수가 더욱 중요한 큰 차원의 다당류의 경우에 있어서도 일어난다는 것을 나타낸다.

표 3

[0058]

	$P_{app}(\text{cm sec}^{-1}) \times 10^{-7}$
HMW 콘드로이틴 술페이트	0.53 ± 0.25
HMW 콘드로이틴 술페이트+브로멜라인+메티오닌	1.27 ± 0.80
HMW 콘드로이틴 술페이트+나토키나아제	1.57 ± 1.10

[0059]

단독 또는 브레멜라인; 브로멜라인 + 메티오닌; 나토키나아제와의 조합의 고분자량(HMW) 콘드로이틴 술페이트의 투과에 대해 결정된 평균  $P_{app}$  값

표 4

[0060]

	증가율 (R)
HMW 콘드로이틴 술페이트+브로멜라인+메티오닌/HMW 콘드로이틴 술페이트	2.42 ± 0.36
HMW 콘드로이틴 술페이트+나토키나아제/HMW 콘드로이틴 술페이트	2.86 ± 1.64

[0061]

조합 v. 독립 rh분자량 콘드로이틴 술페이트의 증가율

[0062]

동물 유래의 CS의 시료(분자량: 15 내지 20 kDa)에 대해 또한 브로멜라인 및 메티오닌의 각테일의 부재 또는 존재하에서 투과도 테스트를 수행하였고, 모든 소스로부터의 CS의 투과도의 증가에 대한 조합의 활성을 확인하였다(표 5).

표 5

[0063]

	$P_{app}(\text{cm sec}^{-1}) \times 10^{-7}$
기준 콘드로이틴 술페이트	1.34 ± 1.24

기준 콘드로이틴 술페이트+브로멜라인+메티오닌	1.45 ± 0.45
--------------------------	-------------

- [0064] 단독 또는 브로멜라인 + 메티오닌과의 조합의 소(bovine) 콘드로이틴 술페이트의 투과에 대해 결정된 평균 Papp 값
- [0065] 다음은 본 발명에 따른 조성물의 예이다.
- [0066] 실시예 1
- [0067] 조성물을 다음의 혼합에 의해 제조하였다:
- [0068] 소 콘드로이틴 술페이트 1200 mg,
- [0069] 브로멜라인 600 mg,
- [0070] L-메티오닌 30 mg.
- [0071] 실시예 2
- [0072] 조성물을 다음의 혼합에 의해 제조하였다:
- [0073] 소 콘드로이틴 술페이트 1200 mg,
- [0074] 나토키나아제 600 mg.
- [0075] 실시예 3
- [0076] 조성물을 다음의 혼합에 의해 제조하였다:
- [0077] 9 kDa의 분자량을 갖는 생물공학적 콘드로이틴 술페이트 1200 mg,
- [0078] 브로멜라인 600 mg,
- [0079] L-메티오닌 30 mg.
- [0080] 실시예 4
- [0081] 조성물을 다음의 혼합에 의해 제조하였다:
- [0082] 9 kDa의 분자량을 갖는 생물공학적 콘드로이틴 술페이트 1200 mg,
- [0083] 나토키나아제 600 mg.
- [0084] 실시예 5
- [0085] 조성물을 다음의 혼합에 의해 제조하였다:
- [0086] 40 kDa의 분자량을 갖는 생물공학적 콘드로이틴 술페이트 1200 mg,
- [0087] 브로멜라인 600 mg,
- [0088] L-메티오닌 30 mg.
- [0089] 실시예 6
- [0090] 조성물을 다음의 혼합에 의해 제조하였다:
- [0091] 40 kDa의 분자량을 갖는 생물공학적 콘드로이틴 술페이트 1200 mg,
- [0092] 나토키나아제 600 mg.
- [0093] 실시예 7
- [0094] 조성물을 다음의 혼합에 의해 제조하였다:
- [0095] 9 kDa의 분자량을 갖는 생물공학적 콘드로이틴 술페이트 1200 mg,
- [0096] 나토키나아제 600 mg,

- [0097] L-메티오닌 30 mg.
- [0098] 실시예 8
- [0099] 조성물을 다음의 혼합에 의해 제조하였다:
- [0100] 40 kDa의 분자량을 갖는 생물공학적 콘드로이틴 술페이트 1200 mg,
- [0101] 나토키나아제 600 mg,
- [0102] L-메티오닌 30 mg.
- [0103] 실시예 9
- [0104] 조성물을 다음의 혼합에 의해 제조하였다:
- [0105] 소 콘드로이틴 술페이트 1200 mg,
- [0106] 나토키나아제 600 mg,
- [0107] L-메티오닌 30 mg.

**도면**

**도면1**

