



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

황진수의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 유진철 (인)

위원 조선대학교 교수 지준필 (인)

위원 조선대학교 교수 황승림 (인)

2018년 11월

조선대학교 대학원

초저분자량 헤파린 유도체의 개발에 관한 연구

지도교수 황 승 림

이 논문을 약학 석사학위신청 논문으로 제출함

2018년 10월

조선대학교 대학원

약 학 과

황 진 수

초저분자량 헤파린 유도체의 개발에 관한 연구

A Study on Development of
Ultra-Low-Molecular-Weight Heparin Derivatives

2019년 2월 25일

조선대학교 대학원

약 학 과

황 진 수

2019년 2월
석사학위 논문

초저분자량 헤파린 유도체의 개발에 관한 연구

조선대학교 대학원

약 학 과

황 진 수

Contents

Abstract

1. Introduction.....	1
1-1 Heparin.....	1
1-2 초저분자량 헤파린.....	1
1-3 항응고성이 없는 헤파린.....	2
1-4 헤파린-담즙산 화합물.....	2
1-5 Anti-Factor Xa assay.....	3
2. Materials and Methods.....	4
2-1 Materials.....	4
2-2 저분자량 헤파린의 해중합 반응.....	4
2-3 O-desulfation of bemiparin.....	4
2-4 Desulfated bemiparin과 DOCA의 amine 공유결합.....	5
2-5 Anti-Factor Xa assay.....	6
3. Results and discussion.....	7
3-1 저분자량 헤파린의 해중합 반응.....	7
3-2 Benedict' s reaction 실험.....	7
3-3 Anti-Factor Xa assay.....	7
3-4. FT-IR.....	8
3-5 Nuclear Magnetic Resonance.....	8
4. Conclusion.....	9
5. References.....	10

List of tables

Table. 1. 현재 시판중인 저분자량 헤파린과 각각의 분자량.....	17
Table. 2. 저분자량 헤파린의 해중합 data.....	18

List of Figures

Figure. 1. Heparin의 구조.....	12
Figure. 2. (a) 초저분자량 헤파린의 일종인 Bemiparin의 구조 (b) 0-desulfation 시킨 Bemiparin의 구조변화.....	13
Figure. 3. Bemiparin에 deoxycholic acid와 결합이 가능한 부분이 있는지 확인을 위한 Benedict' s reaction. 왼쪽부터 Benedict 용액, Bemiparin, 0-desulfated bemiparin, Bemiparin-DOCA, Glucose.....	14
Figure. 4. Bemiparin과 합성 물질의 FXa 결과 (a) Bemiparin과 0-desulfation 시킨 Bemiparin의 Factor Xa assay 결과 비교, (b) Bemiparin과 EtDOCA와 결합시킨 Bemiparin의 Factor Xa assay 결과 비교, (c) Bemiparin과 desulfation 시킨 Bemiparin에 EtDOCA를 결합시킨 물질의 Factor Xa assay 결과 비교.....	15
Figure. 5. Bemiparin과 Desulfated Bemiparin-DOCA 의 FT-IR 결과. (a) Bemiparin의 FT-IR data, (b) desulfated Bemiparin-DOCA의 FT-IR data.....	16
Figure. 6. Bemiparin과 합성 물질의 NMR data (a) bemiparin NMR(D ₂ O, 500MHz), (b) 0-desulfation bemiparin의 NMR(D ₂ O, 800MHz), (c) deoxycholic acid NMR(DMSO, 500MHz), (d) Bemiparin과 Deoxycholic acid가 결합한 물질의 NMR(DMSO:D ₂ O=1:1, 500MHz).....	17

ABSTRACT

A Study on Development of Ultra-Low-Molecular-Weight Heparin Derivatives

Hwang Jinsu

Advisor : Prof. Seung Rim Hwang

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

Heparin is a substance synthesized by animal's mast cells and widely used as an anticoagulant. It is mainly used for the treatment of deep-vein thrombosis, pulmonary embolism, arterial thromboembolism, heart failure and unstable angina. Heparin has an anti-inflammatory effect besides anticoagulant effect. After the several reports on heparin of which the effect of modulating the inflammatory pattern has drawn more attention over it. However, since heparin is administered to inflammatory diseases to control inflammation and side effect such as hemorrhage occurs and due to which there is a limitation in clinical use. However, Desulfation of heparin reduces the anticoagulant effect and turns into heparin, which has anti-inflammatory properties. In this study, we aimed to investigate the substances that can relieve and treat inflammation using heparin.

Ultra-low molecular weight heparin is a mixture with an average molecular weight of less than 6000 Da, compared to unfractionated heparin. Smaller heparin has some advantages such as higher bioavailability, longer half-life, wider therapeutic range, and lower bleeding risk. In this present study, Bemiparin, a

Kind of ultra low molecular weight heparin, was more or less absorbable than large molecular weight nonfraction heparin when administered orally. Bemiparin used in this study is the smallest molecular weight heparin among currently available ultra low molecular weight heparin. However, the molecular weight of Bemiparin is not well absorbed in the body. The second bile acid is reabsorbed in the intestine through bile acid transporter and go to the blood stream, so that the drug can be absorbed into the intestines by oral administration of deoxycholic acid and heparin, which is a kind of bile acid.

The reduction of anticoagulant activity of Bemiparin, which was desulfated between experiments, was observed through experiments. Through the analysis of NMR, the data of synthetic materials were changed and the binding with bile acid was also confirmed. These results suggest that the anticoagulant effect can be eliminated and the side effects can be suppressed, and thus By administering orally it can be used as therapeutic agent for inflammation.

1. Introduction

1-1. Heparin

헤파린은 황산기를 가진 고분자 다당류의 일종으로, 화학적 구조는 D-Glucosamine과 L-Iduronic acid가 교차하며 사슬 모양을 이루고 있다(Figure. 1[1,9]). D-Glucosamine과 L-Iduronic acid의 함량 비는 1:1이며, D-Glucosamine 잔기와 L-Iduronic acid 잔기의 1, 4 결합 및 1, 3 결합이 번갈아 나타나는 골격을 갖고 있다 [2]. 헤파린의 평균 분자량은 3000~30000Da 범위의 분자량을 갖는 중합체이며, 상업용 헤파린 제제의 평균 분자량은 1200~15000Da이다[3].

헤파린은 물에 잘 녹으며 물속에서 다가 음이온이 되어 금속이나 아민류와 염을 만들며, 금속이나 아민류와 염을 만들며, 특히 염기성 단백질과 쉽게 결합한다[2]. 생물학적 성질로는 혈액 응고를 방지하는 작용이 강하다. 정상 조직에서 혈액 응고에 관여하는 트롬보플라스틴의 양을 적당히 유지하는 작용을 한다. 헤파린은 또한 세포의 증식을 저지하고, 체장의 리보뉴클레아제와 같은 특정한 종류의 효소를 저해한다. 생체 내에서 속효성으로 나타나는 헤파린의 항응고 작용이 혈액의 유동성 유지에 관여하는 기전에 대해서는 아직 규명되지 않았다[2].

헤파린은 항응고제로 사용되는 약물로 잘 알려져 있고, 특히 심부정맥혈전증, 폐 색전증, 동맥혈전 색전증을 치료하고 예방하는데 사용된다[5]. 일반적인 부작용으로는 출혈, 주사부위 통증 및 헤파린에 의해 유발되는 혈소판감소증이 있다[6].

헤파린은 모세혈관 주변의 비대 세포로 만들어지는데, 조직 내에서 단백질과 결합해서 생성된 유코 단백질에 알칼리, 효소 등의 제단백 처리를 하여 얻어진다[4]. 고등동물의 각종 조직에 넓게 분포하여 근육, 간장, 흉선, 폐, 비장, 혈액 등에 많다[2].

1-2. 초저분자량 헤파린(Ultra-Low-Molecular-Weight Heparin)

비분획 헤파린에 비해 저분자량 헤파린은 6000Da 이하의 작은 크기를 가진다.(Table. 1[7].) 저분자량 헤파린에는 AT-binding sequence가 약 20%가량 섞여서 포함되어 있으며, 최근의 기술 발전으로 이러한 저분자량 헤파린의 일부를 분리할 수 있게 되었다. 이들은 대부분 1800~3000Da의 크기를 가지므로 초저분자량 헤파린이라고 불린다[8].

초저분자량 헤파린은 저분자량 헤파린과 달리 생산과정에서 특정 분획만 분리하는

것이 가능하기 때문에 저분자량 헤파린에 비하여 더 높은 균질성을 가진다. 따라서 서로 다른 특성을 가진 성분의 혼입이 적기 때문에 부작용의 빈도가 상대적으로 낮다는 장점이 있다[9].

본 연구에서 사용한 bemiparin [Figure. 2(a)] 은 저분자량 헤파린으로 알려진 약품군에 속한다. bemiparin은 3600Da의 낮은 평균 분자량을 가지고 있기 때문에 초저분자량 헤파린으로 분류된다. bemiparin은 기존의 저분자량 헤파린보다 antithrombin 활성이 낮고, 주로 Xa 인자에 작용하여 특정 응고 인자에 대한 선택성으로 인해 출혈 위험을 줄인다[10].

1-3 . 항응고성이 없는 헤파린

헤파린이 항응고 효과 외에 다른 효과들을 가지고 있다는 보고 이후[11], 항응고성이 없는 헤파린에 대한 활용이 관심을 받고 있다. 그 중 하나가 헤파린이 염증 반응의 양상을 조절하는 효과를 지닌다는 연구이다[12]. 헤파린 황산염에 기능적으로 의존하는 성장 인자와 같은 단백질의 결합을 통해 비항응고제 작용의 많은 부분을 발휘할 것으로 보인다.[13]

desulfation 시킨 헤파린[Figure. 2(b)]은 항응고제 활성 감소, 허혈 및 재관류 손상에 의한 간 및 신장 손상 예방 효과, 혈관 신생 및 전이성 위암 억제에 효과적이라는 연구 결과가 있다.[14] 선택적으로 desulfation 시킨 헤파린은 antithrombin 결합 영역에 필수적인 황산화 그룹을 제거하고 다른 단백질 표적 사이의 선택성을 유도하여 헤파린의 항응고인자 활성을 제거하거나 감소시킬 수 있다[15].

1-4. 헤파린-담즙산 화합물

헤파린은 큰 분자량과 음으로 하전된 구조 때문에 위장관에서 흡수되지 않는다. 헤파린의 친수성 특성은 상피 세포막의 극성 그룹의 낮은 투과성과 반발력으로 인해 상피 세포를 통과하는 것을 어렵게 만든다[18].

담즙산 중 하나인 deoxycholic acid는 소수성 면과 친수성 면을 가진 양친매성 천연 화합물이다[19]. 담즙산은 장에 도달하게 되면 재흡수되며 혈류를 타고 각 조직으로 이동하여 생리적 기능을 담당하게 된다. 이 두 가지 면을 이용하여 생체 내에서 담즙산과 결합한 헤파린이 점막의 조직 구조를 손상시키지 않으면서 장내에서 흡수가 잘 이루어진다는 연구 결과가 있다[20].

본 연구에서는 Deoxycholic acid와 Bemiparin의 결합을 통해 양친성 결합체를 만들어 경구 투여 시 장내에서 흡수가 가능하게 하고자 한다.

1-5. Anti-Factor Xa assay

헤파린은 음전하를 띠고 있는 glycosaminoglycans 혼합물로 thrombin 활성을 억제한다. 이는 혈액에 존재하는 항 응고 물질인 antithrombin과 상호 작용을 하여 입체적 변화가 생기게 되고, 이로 인해 혈액 응고가 억제된다. 헤파린은 특정한 pentasaccharide 서열을 통해 antithrombin에 결합한다. 헤파린 결합은 antithrombin 분자 구조의 변화를 유도하여 antithrombin의 항응고제 활성을 증가시킨다. antithrombin은 응고에 관여하는 단백질인 serine proteases을 비활성화시킴으로써 응고를 억제한다. thrombin의 불활성화는 헤파린-antithrombin 복합체가 thrombin에 비특이적으로 결합하여 일어난다.[16]

가장 일반적으로 사용되는 방법인 발색단 분석법(chromogenic assay)으로, 발색단에 연결된 Factor Xa 기질을 사용한다. 이 방법은 일정 양의 Factor Xa와 Antithrombin을 시료에 첨가하고, 헤파린이 antithrombin과 억제 복합체를 형성하여 Factor Xa를 불활성화 시킨다. 이후 남아있는 Factor Xa와 발색 기질이 결합하고, 흡광도를 측정하여 남아있는 Factor Xa-발색 기질을 측정한다. 따라서 샘플에 남아있는 Factor Xa 초과량은 헤파린의 양과 반비례한다. 결과적으로 시료에서 헤파린의 양이 많을수록 색 발현 강도는 낮아진다.[17]

2. Materials and Methods

2-1. Materials

Bemiparin sodium(Zibor Inj. 2500 IU AntiXa/0.2 mL), Sodium borohydride(Sigma aldrich. powder, 98.0 %), Sodium hydroxide(OCI Company Ltd. Assay 98.0 %), Hydrochloric acid(DAEJUNG Ltd. 0.1N standard), Sodium chloride(DAEJUNG Ltd. 0.1N standard), Ethanol(EMSURE ® ACS, ISO, Reag. Ph Eur), 0.2 µm syringe filter(Whatman ®. NYLON 66 SYRINGE FILTER), EDC-HCl(Sigma aldrich. crystalline), Deoxycholic acid, Dimethylformamide(Sigma aldrich. anhydrous 99.8 %), Formamide(Sigma aldrich. ≥99.5 %(GC), BioReagent, for molecular biology), dialysis kit(Spectra/Por. Float-A-Lyzer G2 Dialysis Device), Factor Xa kit(CHROMOGENIX. COATEST® HEPARIN)

2-2 저분자량 헤파린의 해중합 반응

저분자량 헤파린 1 g을 탈이온수 20 mL에 녹인다. 이 수용액에 1N HCl을 조금씩 가하여 pH를 2로 맞춘다. NaNO₂ 를 가하고 4 °C에서 30분간 교반시켜준다. 반응이 완료 되면 NaOH를 조금씩 가하여 용액의 pH를 6으로 맞춘 후, 다량의 ethanol에 조금씩 가하여 침전을 생성한다. 침전물과 100mg의 NaBH₄ 를 탈이온수 20 mL에 녹이고 1시간동안 교반시킨다. 이후 ethanol에 물질을 침전시켜 헤파린 해중합 생성물을 따로 모아서 동결건조 시킨다.

2-3. 0-desufation of bemiparin

환원제인 Sodium Borohydride(NaBH₄) 수용액(1 w/vol%)에 Bemiparin 200 mg을 넣고 상온에서 12시간동안 교반시키며 환원 시켜준다. 이후 황산기 부분을 나트륨 염으로 변환하여 제거하기 위해 고체 Sodium hydroxide(NaOH)를 총 용액량 20 mL에서 0.4 M이 되도록 섞어 녹인 뒤, 환원시켜준 용액에 가하여 pH가 13 이상의 알칼리성이 되는지 확인하며 2시간동안 교반 시켜준다. 교반시킨 용액을 동결건조하고, 동결건조 생성물을 10°C 미만의 차가운 정제수에 녹여 5 w/vol% 용액을 제조한다. 제조한 용액에 묽은 염산을 가하여 pH가 6.0이 되도록 한 뒤 대략 10배 정도 부피의 정제수에 2~3일간 dialysis 해주며 과량의 NaBH₄ 와 NaOH 및 나트륨 염을 제거한다. dialysis 시키는 동

안 정제수는 3시간에 한번씩 새로운 정제수로 교체하여 준다. dialysis 시킨 용액에 sodium chloride를 2 w/vol%가 되게 가해준 뒤 용액 부피의 3배 정도의 차가운 Ethanol을 가해 침전시키고, 냉동 보관을 통해 침전을 안정화 시킨다. 이후 Ethanol로 침전을 washing 해주면서 15000 rpm으로 15분간 원심분리를 3회 정도 실시하여 침전물을 모아주고, 모인 침전물을 다시 정제수에 녹여 10 w/vol% 수용액을 제조한다. 수용액의 pH가 5~6인지 재확인한 뒤 0.2 μm syringe filter로 여과한 후 동결건조 시킨다.

2-4. Desulfated bemiparin과 DOCA의 amine 공유결합

물질 합성 이전에 Bemiparin에 deoxycholic acid와 결합 가능한 부분이 있는지를 확인하기 위해 Benedict's reaction을 통해 확인하였다[Figure. 4]. Benedict's reagent는 Anhydrous sodium carbonate 10g, Sodium citrate monobasic 17.3g, Copper(II) sulfate pentahydrate 1.8 g을 탈이온수 100mL에 녹인다. 이때 sodium carbonate와 sodium ciatrate를 탈이온수 85 mL에 녹이고, copper sulfate pentahydrate를 탈이온수 15 mL에 녹여 먼저 만든 용액에 교반하며 조금씩 넣어준다. 제조가 완료되면 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 사용전까지 보관한다. Benedict's reagent가 준비되면 반응을 확인할 물질들, 본 연구에서는 Glucose, Bemiparin, 0-desulfated bemiparin, Bemiparin-EtDOCA를 각각 10 mg/100 μL 수용액으로 만들고, Benedict's reagent 100 μL 를 첨가한 뒤 75~95 $^{\circ}\text{C}$ 로 가열한다. 5분간 가열한 후 침전 여부를 확인하고, 색깔 변화가 관찰되지 않으면 매 5분마다 색깔의 변화를 관찰한다. 반응 후 ice bath에 차갑게 식혀서 반응을 종료시킨다.

Dimethylformamide 용매 5 mL 속에 defulfation 시킨 Bemiparin 100 mg을 약 70 $^{\circ}\text{C}$ 정도로 가온하며 녹여준다. 이때 물질이 용매에 잘 녹지 않는다면 Formamide를 녹일 때까지 첨가해 준다. 이후 ice bath 하에서 EDC-HCl 26 mg을 첨가하고, 교반하며 활성화 시켜준다. 이 용액에 Ethyl deoxycholic acid(EtDOCA) 50 mg을 Dimethylformamide 용액 5 mL에 녹여 stirring하며 천천히 dropping 해준다. 첨가가 완료되면 용액을 실온에서 overnight 시켜주며 반응시킨다. overnight이 완료되면 차가운 ethanol에 침전을 잡아주는데 이때 침전이 잘 잡히지 않는다면 acetone을 총 부피의 30%정도 섞어준다. 침전이 생기면 침전물을 Ethanol로 washing 해주며 15000rpm으로 15분간 원심분리를 3회 정도 실시하여 침전물을 따로 모아주고, 정제된 침전물을 탈이온수에 분산시켜

동결건조 시킨다.

2-5. Anti-Factor Xa assay

Bemiparin과 Bemiparin 유도체 각각 1 mg을 식염수 10 mL에 녹이고 buffer stock 희석액으로 각 용액을 100배 희석시킨다. 이후 각 Bemiparin과 Bemiparin 유도체 희석액의 농도를 달리하여 standard용액을 제조한다. standard 용액은 헤파린 희석액 100, 300, 500, 700 μ L, buffer stock 희석액은 700, 500, 300, 100 μ L, Human Plasma 100 μ L, Antithrombin 100 μ L를 각각 섞어 제조한다.

각 조성의 standard 용액 200 μ L씩을 37 ± 0.2 $^{\circ}$ C로 예열한 heating block에 3~4분간 incubate 시킨다. 각 용액에 FXa 용액을 100 μ L을 가하고 30초 뒤 S-2222 용액을 200 μ L 가한다. 3분간 대기 후 acetic acid 20 % 또는 citric acid 2 %를 300 μ L씩 가하여 반응을 종료시킨다. 이때 각 물질의 반응 시간을 모두 동일하게 해주기 위하여 각 튜브에 물질의 투입 간격을 정확히 5초로 맞춘다. 이후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 기존 물질과 합성한 물질간의 차이를 확인한다. 용액의 색은 4시간까지 안정하게 유지되며 그 안에 흡광도 측정을 해야 한다.

3. Results and discussion

3-1. 저분자량 헤파린의 해중합 반응

저분자량 헤파린의 일종인 Enoxaparin과 Fraxiparine을 이용하여 기존의 헤파린보다 더 작은 분자량을 가진 헤파린 조각을 얻기 위하여 유도체 합성 실험을 진행하였다. 합성한 유도체를 MALS(Multi-Angle Light Scattering System)를 통해 분자량 측정하였고, 그 결과 [Table. 2]와 같이 분자량이 변했음을 확인하였다. 결과를 보면 헤파린 조각의 분자량이 기존 물질의 분자량 보다 커지는 경우가 발생하였다. 이는 실험 간에 분해된 헤파린이 중합되는 과정에서 기존보다 더 긴 사슬을 형성하여 중합된 것으로 보인다. 헤파린을 좀 더 균일한 분자량으로 해중합 시킬 수 있도록 해중합법의 개선이 필요할 것으로 보인다.

3-2 Benedict' s reaction 실험

Bemiparin의 말단에 환원 가능한 부분이 존재한다면 Deoxycholic acid와 amine 공유 결합이 가능하다. 이를 확인하기 위하여 Benedict' s reaction 실험을 실시한 결과 [Figure. 3]과 같은 결과가 나왔다. Benedict' s reaction은 환원력이 있는 당의 양에 따라서 색깔이 변화하는 정도에 차이가 있다. 반응이 빠르게 나타나는 Glucose와는 달리, Bemiparin과 Desulfated Bemiparin은 장시간에 걸쳐 미세하게 색깔의 차이가 보였다. 이를 통해 Bemiparin과 Bemiparin 유도체의 말단에 반응 가능한 환원당 골격이 있다는 것을 확인할 수 있다. 그러나 색의 차이가 크지 않기 때문에 반응 가능한 환원당 골격이 많은 것은 아니므로 담즙산과 결합 시 주의가 필요할 것으로 보인다.

3-3 Anti-Factor Xa assay

Bemiparin과 Desulfated Bemiparin, Bemiparin-EtDOCA, Desulfated Bemiparin-EtDOCA 합성 물질들을 비교하여 Factor Xa assay 실험 결과 [Figure. 4]의 그래프와 같은 결과가 나왔다. [Figure. 4. (a)]에서 Bemiparin과 0-desulfation 시킨 Bemiparin의 Factor Xa assay 결과를 비교해보면 농도가 증가함에 따라 흡광도가 감소하는 Bemiparin과 달리 0-desulfation 시켜준 Bemiparin은 농도가 변해도 흡광도는 크게 달라지지 않는 모습을 볼 수 있다. 이는 bemiparin은 Factor Xa와 반응하여 s-2222와 결합할 Factor Xa가 감소하여 흡광도 또한 감소했으므로 항응고성이 있음을 알 수 있고,

desulfation 시켜준 경우 Factor Xa와 반응하지 않아 남아있는 Factor Xa가 많기 때문에 흡광도 차이가 거의 없으므로 항응고성이 감소했음을 확인할 수 있다. [Figure. 4. (b)]에서는 Bemiparin에 deoxycholic acid를 붙였을 때 Bemiparin의 항응고성에는 큰 변화가 없음을 알 수 있다. [Figure. 4. (c)]에서 O-desulfation 시킨 Bemiparin에 deoxycholic acid를 붙였을 때는 (a)와 마찬가지로 농도에 따른 흡광도의 변화가 크지 않음을 관찰할 수 있으므로 항응고성이 감소했음을 알 수 있다.

3-4. FT-IR

황산기의 피크 존재를 확인함으로써 bemiparin이 desulfation이 되었는지 알아보기 위해 FT-IR 분석을 실시하였고 [Figure. 5]과 같은 결과를 얻었다. 황산기의 피크는 1200, 1400 cm^{-1} 에서 찾을 수 있다. [Figure. 5 (a)] bemiparin의 결과를 보면 1200, 1400 cm^{-1} 에서 확인할 수 있었던 피크가 (b) desulfated Bemiparin-DOCA 결과에선 피크가 사라진 것으로 보아 황산기가 사라졌음을 확인할 수 있다.

3-5 Nuclear Magnetic Resonance(NMR)

Bemiparin의 desulfation, Bemiparin과 Deoxycholic acid의 결합을 확인하기 위하여 NMR분석을 실시하였고 [Figure. 6]의 결과 데이터를 얻었다. [Figure. 6] (a)와 (b)를 비교하였을 때, 전체적으로 비슷해 보이지만 특정 부분에서 다른 피크가 관찰되므로 실험 과정을 통해 물질에 변화가 생겼음을 예상할 수 있다. [Figure. 6] (a)와 (c), (d)를 비교했을 때, (c) deoxycholic acid의 NMR에서 12 ppm 인근의 carboxyl group의 피크를 볼 수 있다. (d) 합성한 물질의 NMR에서는 12 ppm 인근의 피크가 사라진 것을 확인함으로써 bemiparin과 deoxycholic acid의 말단에 있던 carboxyl group이 사라졌으므로 두 물질이 결합했음을 확인할 수 있다. 그리고 나머지 부분에 대해서는 (a) Bemiparin의 NMR과 (c) Deoxycholic의 NMR을 겹쳐 보았을 때 (d) 합성물질의 NMR 결과와 거의 일치한다는 점으로 합성이 의도한대로 진행했음을 확인하였다.

4. Conclusion

헤파린이 염증 반응의 양상을 조절하는 효과를 지닌다는 연구로 인해 항응고성이 없는 헤파린에 대한 활용이 관심을 받고 있다. 본 연구에서는 최초 저분자량 헤파린보다 더 낮은 분자량을 가진 헤파린을 제조하여 경구 투여 시 장내 흡수 가능성을 향상 시키고자 하였으나, 해중합 완료 물질의 분자량이 일정하지 않아 초저분자량 헤파린의 일종인 Bemiparin을 사용하여 실험을 실시하였다. 장기 복용 시 출혈과 같은 부작용이 발생할 수 있으므로 헤파린의 항응고성을 감소시키기 위해서 0-desulfation을 실시하였고, Anti-Factor Xa assay를 통해 항응고성이 감소했음을 확인하였다. Bemiparin의 장내 흡수를 돕기 위하여 담즙산의 한 종류인 Deoxycholic acid를 Bemiparin의 말단에 결합하고자 하였고, 결합을 위해선 말단에 환원 가능한 부위가 있어야 하므로 Benedict's reaction을 통해 Bemiparin에 결합 가능한 부분이 존재함을 확인하였다. 0-Desulfation 시킨 Bemiparin에 Deoxycholic acid를 결합하여 장내에서 흡수가 가능한 물질을 합성하였다. 최종 합성 물질 또한 Anti-Factor Xa assay를 통해 항응고성이 감소했음을 확인하였고, 물질이 합성되었음을 NMR 분석과 FT-IR 분석을 통하여 확인하였다.

합성한 물질이 장내 흡수가 가능한지, 염증을 감소시키는지에 대하여 추가적인 실험을 통하여 확인이 필요할 것으로 보인다.

5. References

- [1] “heparin” , 모발학 사전, 2003. 5. 22. 광문각
- [2] “heparin” , 화학대사전, 2001. 5. 20. 세화
- [3] “Chapter 21. Principles of Antithrombotic Therapy” , Francis CW, Kaplan KL (2006). In Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, et al. Williams Hematology(7th ed).
- [4] “heparin” , 간호학대사전, 1996. 3. 1. 한국사전연구소
- [5] “Heparin Sodium” , The American Society of Health-System Pharmacists.
- [6] “3rd Ind. preemie infant dies of overdose” , Kusmer, Ken (20 September 2006). Fox News. Associated Press. Archived from the original on 18 October 2007.
- [7] “Heparin and low-molecular-weight-heparin.” , Gray E, Mulloy B, Barrowcliffe TW. Thromb Haemost 2008; 99: 807-818.
- [8] “Production and chemical processing of low molecular weight heparins” , Linhardt RJ, Gunay NS(1999). Seminars in Thrombosis and Hemostasis. 25 Suppl 3: 5-16
- [9] “The story of the discovery of heparin and warfarin.” , Wardrop D, Keeling D. Br J Haematol. 2008 Jun;141(6):757-63
- [10] “Bemiparin: a review of its use in the prevention of venous thromboembolism and treatment of deep vein thrombosis.” , Drugs. 2003;63(21):2357-77.
- [11] “Heparins - anionic polyelectrolyte drugs” , Jaques LB(1979), Pharmacol Rev 31:99-167
- [12] “Novel drug development opportunities for heparin.” , Lever R, Page CP(2002) Nat Rev Drug Discov 1:140-148
- [13] “Heparan sulphate: a heparin in miniature.” , Gallagher JT (2011) In: Lever R, Mulloy B, Page CP (eds) Heparin - a century of progress. Springer, Heidelberg
- [14] “Effect of non-anticoagulant N-desulfated heparin on basic fibroblast growth factor expression angiogenesis and metastasis of gastric carcinoma

- in vitro and in vivo.” , Chen J, L. Fan J, Chen MX. Dong Y, Gu JZ. Gastroenterol Res Prac 2012; 2012:1-6.
- [15] “Old and new applications of non-anticoagulant heparin.” , Giuseppe Cassinelli and Annamaria Naggi. International Journal of Cardiology 212S1 (2016) S14-S21.
- [16] “Laboratory Monitoring of Heparin Therapy: Partial Thromboplastin Time or Anti-Xa Assay?” , Laboratory Medicine, Volume 40, Issue 1, 1 January 2009, P47-51
- [17] “Anti-Xa assay” , Medscape, Diseases/Conditions, Dec 5, 2014
- [18] “Low molecular weight heparin-like preparations with oral activity” , S.E Lasker. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 2 (1985), pp. 37-39
- [19] “Detergents: An Overview.” , Neugebauer, J.M. in M.P. Deutscher, Guide to Protein Purification(Methods in Enzymology Vol. 182), Academic Press, San Diego
- [20] “Conjugation of low-molecular-weight heparin and deoxycholic acid for the development of a new oral anticoagulant agent.” , Y.K. Lee. Circulation, 104(2001), p3116-3120

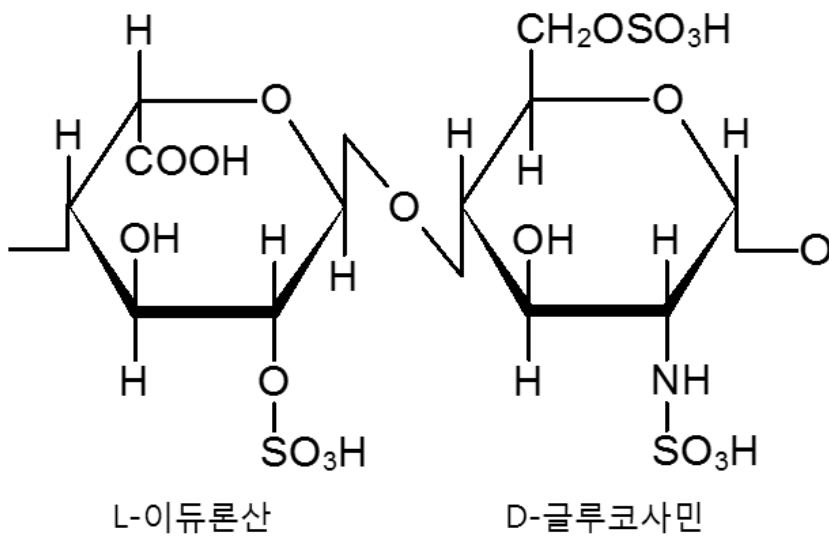
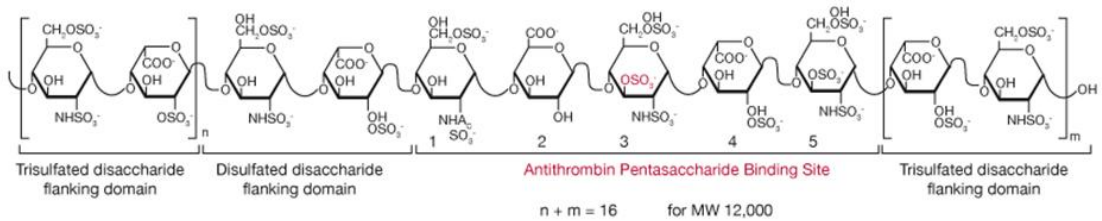
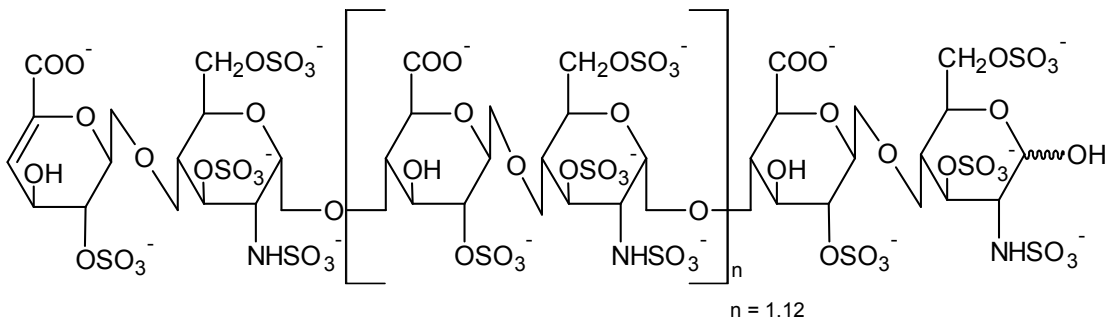
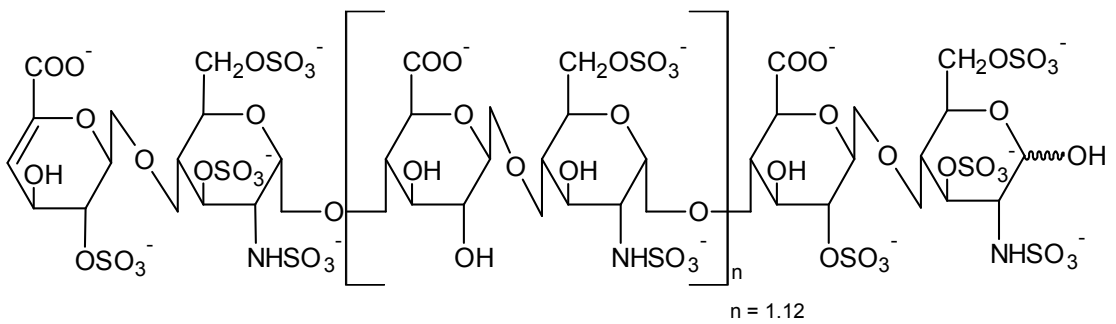


Figure. 1. Heparin의 구조



(a)

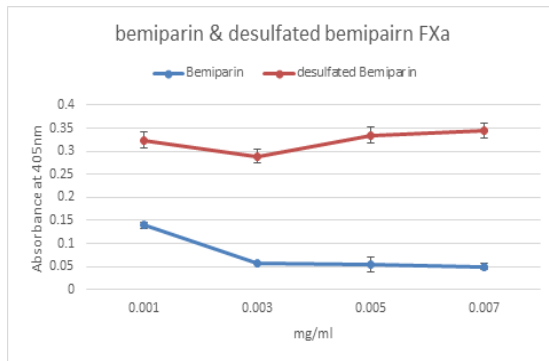


(b)

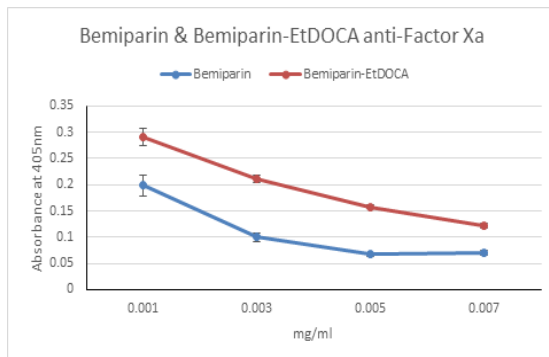
Figure. 2. (a) 초저분자량 헤파린의 일종인 Bemiparin의 구조 (b) 0-desulfation 시킨 Bemiparin의 구조변화



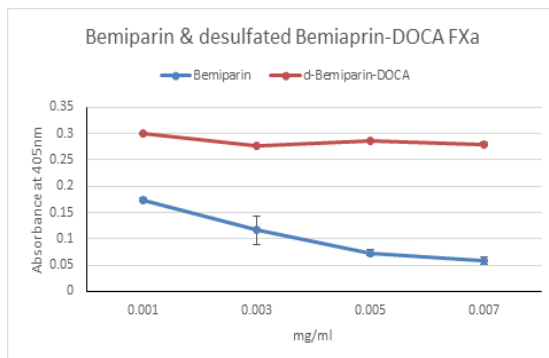
Figure. 3. bemiparin에 deoxycholic acid와 결합이 가능한 부분이 있는지 확인을 위한 Benedict's reaction. 왼쪽부터 Benedict 용액, Bemiparin, 0-desulfated bemiparin, Bemiparin-DOCA, Glucose.



(a)

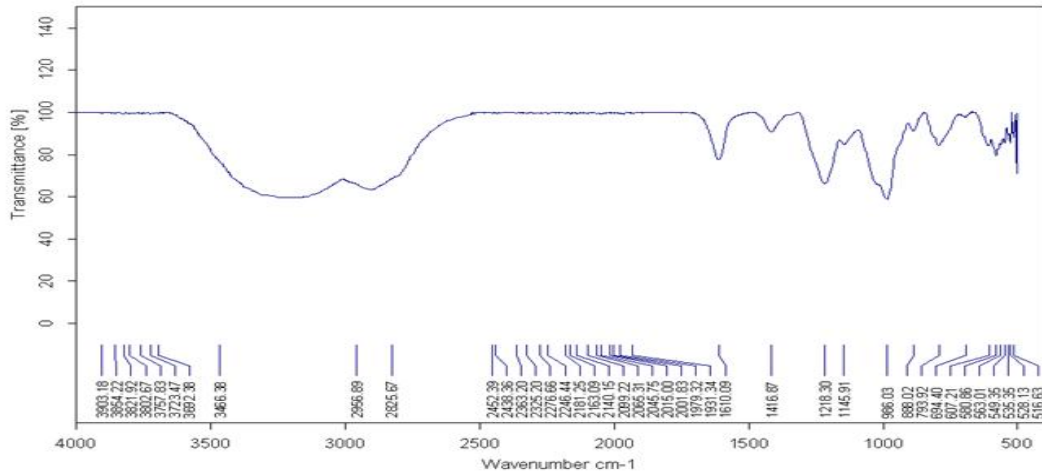


(b)

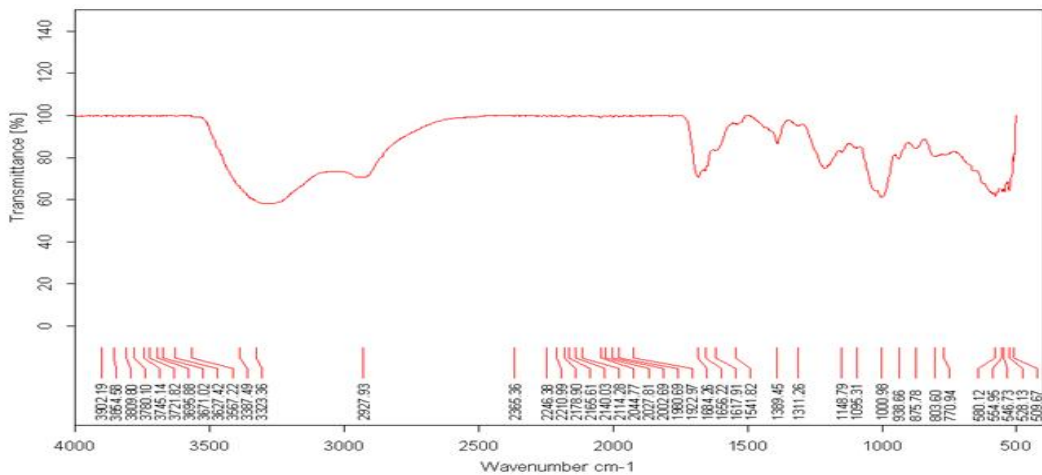


(c)

Figure. 4. Bemiparin과 합성 물질의 FXa결과 (a) Bemiparin과 O-desulfation 시킨 Bemiparin의 Factor Xa assay 결과 비교, (b) Bemiparin과 EtDOCA와 결합시킨 Bemiparin의 Factor Xa assay 결과 비교, (c) Bemiparin과 desulfation 시킨 Bemiparin에 EtDOCA를 결합시킨 물질의 Factor Xa assay 결과 비교

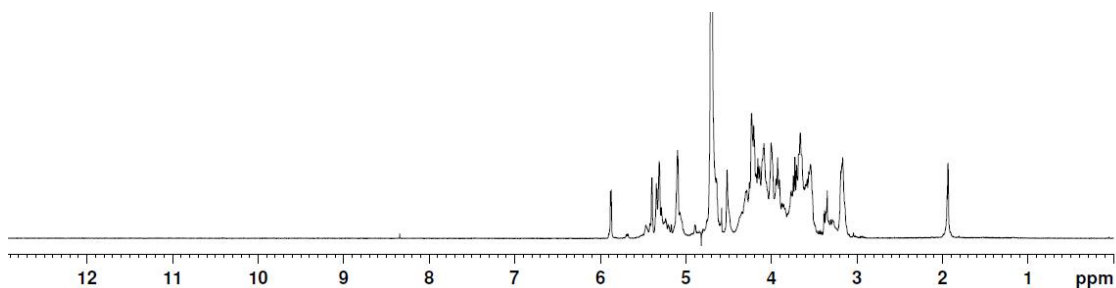


(a)

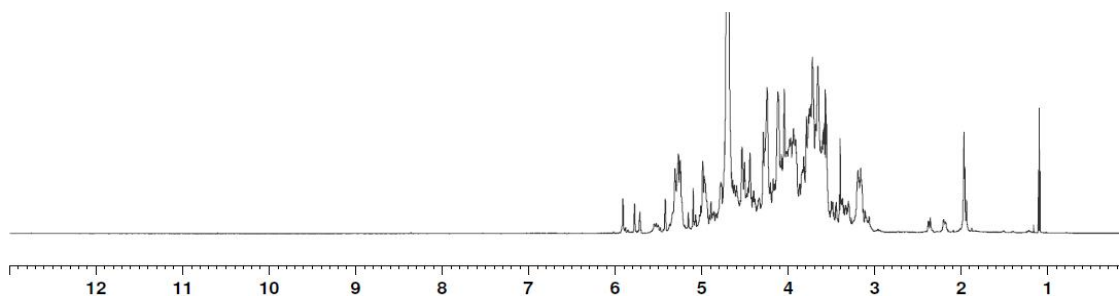


(b)

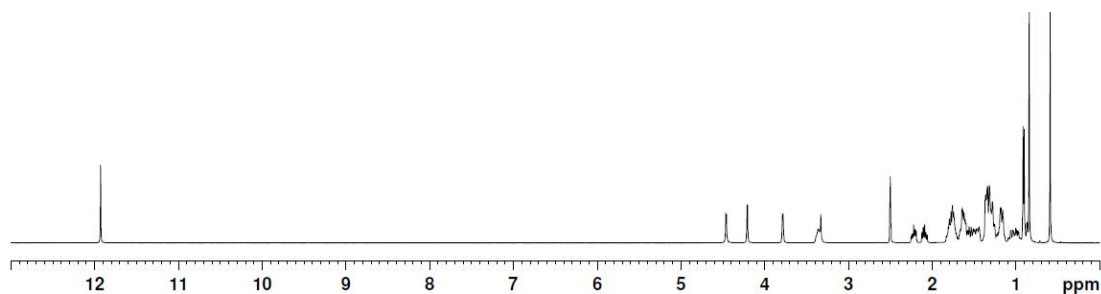
Figure. 6. Bemiparin과 Desulfated Bemiparin-DOCA 의 FT-IR 결과. (a) Bemiparin의 FT-IR data, (b) desulfated Bemiparin-DOCA 결합 물질의 FT-IR data.



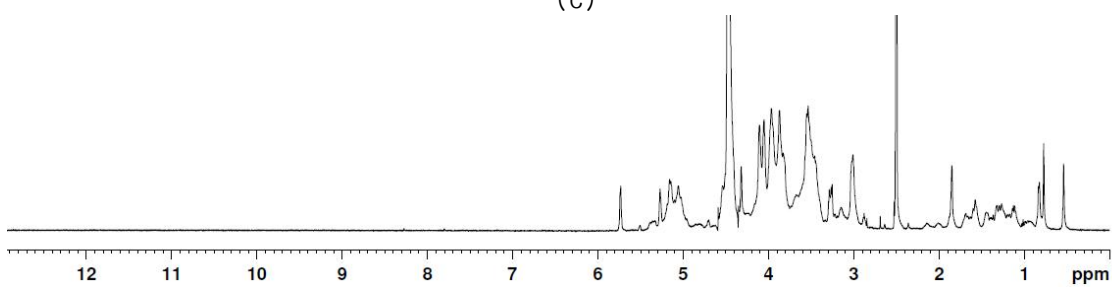
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure. 5. Bemiparin과 합성 물질의 NMR data (a) bemiparin NMR(D_2O , 500MHz), (b) 0-desulfation bemiparin의 NMR(D_2O , 800MHz), (c) deoxycholic acid NMR(DMSO, 500MHz), (d) Bemiparin과 Deoxycholic acid가 결합한 물질의 NMR(DMSO: D_2O =1:1, 500MHz)

Low-Molecular-Weight Heparin	Average molecular weight(Da)
Bemiparin	3600
Nadroparin	4300
Reviparin	4400
Enoxaparin	4500
Parnaparin	5000
Certoparin	5400
Dalteparin	5000
Tinzaparin	6500

Table. 1. 현재 시판중인 저분자량 헤파린과 각각의 분자량

material	average molecular weight(Da)	
Enoxaparin	3156	4242
Enoxaparin fragment	4226	3240
Fraxiparine	8966	5788
Fraxiparine fragment	4716	4471

Table. 2. 저분자량 헤파린의 해중합 data

국문초록

초저분자량 헤파린 유도체의 개발에 관한 연구

황진수

지도교수 : 황승림

조선대학교 대학원 약학과

헤파린은 동물의 비만 세포가 합성하는 물질로 항응고제로 널리 알려져 사용되는 약물이다. 주로 심부정맥혈전증, 폐색전증, 동맥혈전색전증, 심장마비, 불안정협심증 등을 치료하고 예방하기 위해 사용되고 있다. 이러한 헤파린은 항응고효과뿐만 아니라 다른 효과도 가지고 있다는 보고 이후, 헤파린이 염증양상을 조절하는 효과를 지닌다는 연구로 인해 헤파린에 대한 활용이 관심을 받고 있다. 그러나 염증조절 효과를 위해서 염증성 질환에 헤파린을 투여하면 출혈과 같은 부작용이 발생하기 때문에 임상에서 이용하는 데에는 제약이 있다. 하지만 헤파린에 어떠한 반응을 유도해주면 항응고성이 감소하고 항염증성은 지니고 있는 헤파린으로 변하게 된다. 이를 이용하여 본 연구에서는 항응고성이 감소한 헤파린을 이용하여 염증을 완화 및 치료할 수 있는 물질에 대하여 연구하고자 한다.

초저분자량 헤파린은 주로 6000Da 미만의 평균 분자량을 갖는 혼합물로 비분획 헤파린과 비교하였을 때 생체이용률, 반감기, 치료범위, 그리고 출혈 위험성에 있어서의 안전성 등의 측면에서 이점을 갖는다. 게다가 비분획 헤파린은 큰 분자량으로 인해 경구 투여 시 흡수에 제약이 있다. 그러므로 본 연구에서는 초저분자량 헤파린의 한 종류인 Bemiparin을 이용하여 경구 투여 시 비분획 헤파린에 비해 흡수가 더 쉽게 가능할 수 있도록 하였다. 본 연구에 사용한 Bemiparin은 현재 시판중인 초저분자량 헤파린 중에서도 가장 작은 분자량을 가진 헤파린이다. 하지만 Bemiparin 정도의 분자량이라고 해서 체내에서 흡수가 잘 되는 것은 아니다. 여기에 2차 담즙산은 장 내에서 재

흡수 되어 혈류를 통해 전신으로 퍼져 나간다는 특성을 이용하여 담즙산의 일종인 deoxycholic acid와 헤파린의 결합을 통해 경구 투여 시 장내 흡수가 가능한 약물을 개발하고자 한다.

연구 수행 간에 desulfation 시켜준 Bemiparin의 항응고성 감소를 실험을 통해 관찰하였고, NMR 분석을 통하여 합성 물질의 데이터가 달라지는 것으로 담즙산과의 결합도 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과를 통해 항응고 효과가 제거되어 부작용이 억제된, 경구 투여 시에도 흡수가 가능한 염증 치료제로 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다.