



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년02월28일

(11) 등록번호 10-1953181

(24) 등록일자 2019년02월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/662 (2006.01) A61K 31/66 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01) A61P 19/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7015608

(22) 출원일자(국제) 2012년10월12일

심사청구일자 2017년05월23일

(85) 번역문제출일자 2014년06월09일

(65) 공개번호 10-2014-0098778

(43) 공개일자 2014년08월08일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2012/076478

(87) 국제공개번호 WO 2013/069404

국제공개일자 2013년05월16일

(30) 우선권주장

JP-P-2011-247047 2011년11월11일 일본(JP)

(56) 선행기술조사문현

JP2004010582 A

JP2010189315 A

(73) 특허권자

산쇼가부시키가이샤

일본국 도쿄도 츄오쿠 니혼바시 1-2-10 토요빌딩
3층

(72) 발명자

무로후시 키미코

일본국 도쿄도 토시마쿠 히가시이케부쿠로
5-52-13-803

마스다 이쿠코

일본국 도쿄도 신주쿠쿠 신오가와마찌 6-18-324

모로호시 토시로

일본국 카나카와켄 이세하라시 히가시오다케
2-24-1-304

(74) 대리인

이한영

전체 청구항 수 : 총 4 항

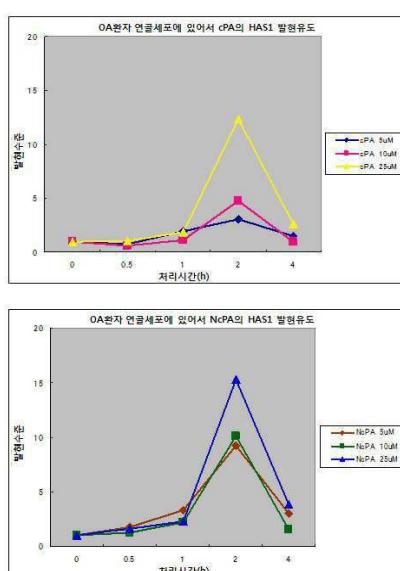
심사관 : 송호선

(54) 발명의 명칭 관절증 치료제

(57) 요 약

본 발명의 목적은 관절연골의 파괴에 대하여 억제작용을 가지고, 치료효과가 높은 관절증 치료제를 제공하는 것이다. 본 발명에 따르면, 환상 포스파티딘산 또는 카바환상 포스파티딘산을 유효성분으로 포함하는 관절증 치료제가 제공된다.

대 표 도 - 도1

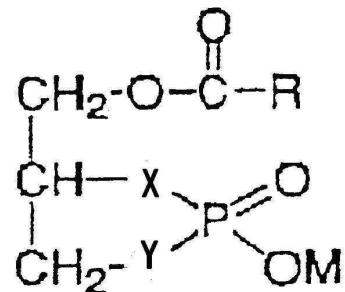


명세서

청구범위

청구항 1

하기 일반식(1)로 나타내는 화합물을 유효성분으로 함유하는 관절증 치료제:



상기 식에서,

R은 탄소수 1 내지 30개의 직쇄 또는 분지상 알킬기, 탄소수 2 내지 30개의 직쇄 또는 분지상 알케닐기, 또는 탄소수 2 내지 30개의 직쇄 또는 분지상 알키닐기이고, 이들 기는 시클로알кан 고리 또는 방향족 고리를 함유하여도 무방하고,

X 및 Y는 각각 독립적으로 산소원자 또는 메틸렌기를 나타내나, X와 Y가 동시에 메틸렌기가 될 수는 없으며,

M는 수소원자 또는 알칼리 금속원자이다.

청구항 2

제 1항에 있어서,

X 및 Y는 산소원자인 것을 특징으로 하는

관절증 치료제.

청구항 3

제1항에 있어서,

X 또는 Y의 어느 하나가 산소원자이고, 다른 하나는 메틸렌기인 것을 특징으로 하는

관절증 치료제.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 일반식(1)에 나타내는 화합물은 1-올레오일 환상 포스파티딘산 또는 1-팔미토올레오일 환상 포스파티딘산의 카바환상 포스파티딘산인 것을 특징으로 하는

관절증 치료제.

청구항 5

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 환상 포스파티딘산(cyclic phosphatidic acid) 또는 카바환상 포스파티딘산(carbacyclic phosphatidic acid)을 유효성분으로 포함하는 관절증 치료제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 관절증에는 변형성 관절증(osteoarthritis), 관절 류마티스(articular rheumatism), 류마티스 열(rheumatic fever) 등이 있고, 그 중에서도 변형성 관절증 및 관절 류마티스는 환자 수가 많고 주요한 관절증으로 여겨지고 있다. 변형성 관절증에는 선천성(congenital) 또는 2차성 변형성 관절증(secondary osteoarthritis)과 노화에 따른 관절연골의 변형에 의한 1차성 변형성 관절증(primary osteoarthritis)이 있는데, 1차성의 변형성 관절증은 노령인구의 증가에 따라 증가되는 경향이 있다. 변형성 관절증과 관절 류마티스는 병인, 병태에 커다란 차이가 있으나, 어느 것도 최종적으로는 관절연골의 파괴에 의한 관절기능이 저해되는 측면에 있어서 공통점이 있다. 변형성 관절증 등의 류마티스성 질환에 대한 종래의 치료제는 아스피린, 인도메타신 등의 진통 항염증제가 있으나, 이들 진통 항염증제는 관절연골의 파괴에 대하여 억제작용은 없고 금제제(gold preparation), 면역억제제(immunosuppressive agent), 스테로이드제(steroid preparation) 등의 치료제에도 관절연골의 파괴 억제작용은 임상적으로 확인되지 않고 있다.

[0003] 관절연골은 연골세포(chondrocyte)와 연골 메트릭스(cartilage matrix)로 구성되는데, 연골 메트릭스는 연골세포가 생산하는 섬유성 단백질인 콜라겐과 프로테오글리칸(단백다당 복합체)가 히알루론산과 결합하여 복잡한 3차원 구조를 형성한 메트릭스이며, 그 중에 다량의 수분을 보유하므로 정상적인 관절기능이 유지된다.

[0004] 상기 치료약과는 상이한 변형성 관절증의 치료제로서 관절연골의 보호 및 수복작용, 관절 내의 윤활작용이 알려진 히알루론산의 관절 내 주사가 임상적용되고 있으나, 침습성(invasive)도 있고 해서 환자의 QOL 관점에서 만족스럽다고 할 수는 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

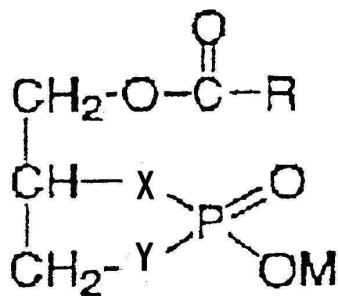
[0005] 본 발명은 관절연골의 파괴에 대하여 억제작용을 가지고, 치료효과가 높은 관절증 치료제를 제공하는 것을 과제로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명자들은 관절 연골세포에 있어서도 히알루론산 생산을 촉진하여 관절연골의 파괴를 억제할 수 있으면, 변형성 관절증 등의 유력한 치료제가 될 수 있다고 판단되어 검토한 결과, 변형성 관절증 환자 유래의 연골세포에 있어서 환상 포스파티딘산 및 그의 유도체가 세포 내의 히알루론산 생산을 현저히 촉진하고, 변형성 관절증 모델 동물에 있어서도 효과가 확인되는 것을 발견하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 즉, 본 발명에 따르면, 하기 일반식(1)로 나타내는 화합물을 유효성분으로 함유하는 관절증 치료제가 제공된다.

화학식 1



[0008]

[0009] 상기 식에서,

R은 탄소수 1 내지 30개의 직쇄 또는 분지상 알킬기, 탄소수 2 내지 30개의 직쇄 또는 분지상 알케닐기, 또는 탄소수 2 내지 30개의 직쇄 또는 분지상 알키닐기이고, 이들 기는 시클로알칸 고리 또는 방향족 고리를 함유하여도 무방하다. X 및 Y는 각각 독립적으로 산소원자 또는 메틸렌기를 나타내나, X와 Y가 동시에 메틸렌기가 될 수는 없다. M는 수소원자 또는 알칼리 금속원자이다.

[0011] 바람직하게는, 상기 일반식(1)에 있어서 X 및 Y는 산소원자이다.

[0012] 바람직하게는, 상기 일반식(1)에 있어서 X 또는 Y의 어느 하나가 산소원자이고, 다른 것은 메틸렌기이다.

[0013] 바람직하게는, 상기 일반식(1)으로 나타내는 화합물은 1-올레오일 환상 포스파티딘산, 1-팔미토올레오일 환상 포스파티딘산 또는 이들의 유도체의 카바환상 포스파티딘산이다.

[0014] 본 발명에 따르면, 상기 일반식(1)으로 나타내는 화합물을 관절증을 수반하는 환자에 투여하는 것을 포함하는, 관절증 치료방법이 제공된다.

[0015] 본 발명에 따르면, 상기 일반식(1)으로 나타내는 화합물의 관절증 치료제의 제조를 위한 용도가 제공된다.

발명의 효과

[0016] 본 발명은 관절연골의 파괴를 억제하여, 치료효과가 높은 관절증 치료제를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 변형성 관절증 환자 유래의 연골세포에 있어서 히알루론산 합성 효소유전자(HAS1)의 발현에 대한 환상 포스파티딘산 유도체의 작용을 조사한 결과를 도시한다.

도 2는 변형성 관절증 환자 유래의 연골세포에 있어서 히알루론산 합성 효소유전자(HAS2)의 발현에 대한 환상 포스파티딘산 유도체의 작용을 조사한 결과를 도시한다.

도 3은 변형성 관절증 환자 유래의 연골세포에 있어서 히알루론산 합성 효소유전자(HAS3)의 발현에 대한 환상 포스파티딘산 유도체의 작용을 조사한 결과를 도시한다.

도 4는 변형성 관절증 환자 유래의 연골세포에 있어서 히알루론산 합성 효소유전자(HYAL1)의 발현에 대한 환상 포스파티딘산 유도체의 작용을 조사한 결과를 도시한다.

도 5는 변형성 관절증 환자 유래의 연골세포에 있어서 히알루론산 합성 효소유전자(HYAL2)의 발현에 대한 환상 포스파티딘산 유도체의 작용을 조사한 결과를 도시한다.

도 6은 변형성 관절증 환자 유래의 연골세포에 있어서 히알루론산 생산에 대한 환상 포스파티딘산 유도체의 작용을 조사한 결과를 도시한다.

도 7은 변형성 관절증 환자 유래의 연골세포에 있어서 히알루론산 합성 효소유전자(HAS1, HAS2, HAS3)의 발현에 대한 환상 포스파티딘산 유도체(시험 화합물: ScPA)의 작용을 조사한 결과를 도시한다.

도 8은 변형성 관절증 환자 유래의 연골세포에 있어서 히알루론산 합성 효소유전자(HYAL1, HYAL2)의 발현에 대한 환상 포스파티딘산 유도체의 작용을 조사한 결과를 도시한다.

도 9는 동통(疼痛) 평가(pain assessment)(양후지 중량배분비, weight distribution across both hind limbs)의 추이를 나타낸다. 평균치±표준오차 n=6, 제1군(매체투여, vehicle administered group)과 비교하여, *, **; p<0.05, p<0.01로 유의(Student의 t검정, Aspin-Welch의 t검정)

도 10은 종창(腫脹) 평가(swelling assessment)(양후지 중량배분비)의 추이를 나타낸다. 평균치±표준오차 n=6, 제1군(매체 투여군)과 비교하여, *, **; p<0.05, p<0.01로 유의(Student의 t검정, Aspin-Welch의 t검정)

도 11은 대퇴골(femur) 돌기 및 경골(tibia) 돌기의 병리조직학 평점을 나타낸다.

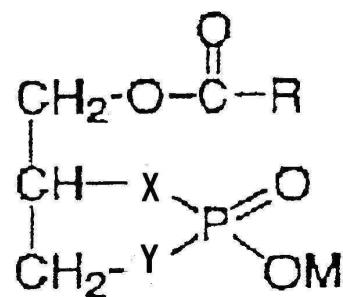
도 12는 대표례의 병리조직 화상(histopathological image)을 나타낸다. A는 매체 투여군(vehicle administered group, 동물번호 101), 우대퇴골 내측 HE 염색 x 200 관절연골부 연골세포의 배열부정(disorganization of chondrocytes, 화살표), 방상 집족형성(cluster formation, 화살표)을 각각 나타낸다. B는 시험물질 투여군(substance administered group, 동물번호 201), 우대퇴골 내측 HE 염색 x 200 관절연골부 연골 파괴(cartilage erosion, 극히 미약)을 나타낸다. C는 매체 투여군(동물번호 101), 우대퇴골 내측 SO 염색 x 200 관절연골부 프로테오글리칸의 염색성 저하를 나타낸다. D는 시험물질 투여군(동물번호 201), 우대퇴골 내측 SO 염색 x 200 관절연골부의 변화는 보이지 않는다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하에서는, 본 발명에 대하여 보다 구체적으로 설명한다.

본 발명의 관절증 치료제는 변형성 관절증(osteoarthritis), 관절 류마티스(articular rheumatism), 류마티스 열(rheumatic fever) 등(특히, 변형성 관절증)의 관절증 치료에 사용할 수 있으며, 환상 포스파티딘산 또는 카바환상 포스파티딘산 또는 이들의 염을 유효성분으로 포함한다. 환상 포스파티딘산 또는 카바환상 포스파티딘산 또는 이들의 염으로서는, 본 발명의 효과를 나타내는 것이라면 특별히 한정되지 않으나, 바람직하게는 하기 일반식(1)로 나타내는 화합물을 사용한다.

화학식 2



상기 신예선

R은 탄소수 1 내지 30개의 직쇄 또는 분지상 알킬기, 탄소수 2 내지 30개의 직쇄 또는 분지상 알케닐기, 또는 탄소수 2 내지 30개의 직쇄 또는 분지상 알킬기이고, 이들 기는 시클로알칸 고리 또는 방향족 고리를 함유하여도 무방하다. X 및 Y는 각각 독립적으로 산소원자 또는 메틸렌기를 나타내나, X와 Y가 동시에 메틸렌기가 될 수는 없다. M는 수소원자 또는 알칼리 금속원자이다.

상기 일반식(1)에 있어서, 치환기 R 로 표시되는 탄소수 1 내지 30개의 적쇄 또는 분자상 알킬기의 구체적인 예로서는, 메틸기, 에틸기, 프로필기, 부틸기, 베닐기, 헥실기, 헥틸기, 옥틸기, 노닐기, 테실기, 윤데실기, 도데

실기, 트리데실기, 테트라데실기, 펜타데실기, 헥사데실기, 헵타데실기, 옥타데실기, 노나데실기, 에이코실기 등을 들 수 있다.

[0024] 치환기 R로 표시되는 탄소수 2 내지 30개의 직쇄 또는 분지상 알케닐기의 구체적인 예로서는, 아릴기, 부테닐기, 옥테닐기, 테데카디에닐기, 헥사데카트리에닐기 등이 있으며, 보다 구체적으로는 8-데세닐기, 8-운데세닐기, 8-도데세닐기, 8-트리데세닐기, 8-테트라데세닐기, 8-펜타데세닐기, 8-헥사데세닐기, 8-헵타데세닐기, 8-옥타데세닐기, 8-이코세닐기, 8-도코세닐기, 헵타데카-8,11-디에닐기, 헵타데카-8,11,14-트리에닐기, 노나데카-4,7,10,13-테트라에닐기, 노나데카-4,7,10,13,16-펜타에닐기, 헤니코사-3,6,9,12,15,18-헥세닐기 등을 들 수 있다.

[0025] 치환기 R로 표시되는 탄소수 2 내지 30개의 직쇄 또는 분지상 알키닐기의 구체적인 예로서는, 8-데시닐기, 8-운데시닐기, 8-도데시닐기, 8-트리데시닐기, 8-테트라데시닐기, 8-펜타데시닐기, 8-헥사데시닐기, 8-헵타데시닐기, 8-옥타데시닐기, 8-이코시닐기, 8-도코시닐기, 헵타데카-8,11-디이닐기 등을 들 수 있다.

[0026] 상기 알킬기, 알케닐기 또는 아키닐기에 함유되는 시클로알칸 고리의 구체적인 예로서는, 시클로프로판환, 시클로부단환, 시클로펜단환, 시클로헥산환, 시클로옥탄환 등을 들 수 있다. 시클로알칸 고리는 1개 이상의 헤테로원자를 함유하여도 좋고, 이러한 예로서는 옥시란환, 옥세탄환, 테트라하이드로푸란환, N-메틸프롤리딘환 등을 들 수 있다.

[0027] 상기 알킬기, 알케닐기 또는 아키닐기에 함유되는 시클로알칸 고리에 함유되는 방향족 고리의 구체적인 예로서는, 벤젠환, 나프탈렌환, 피리딘환, 푸란환, 티오펜환 등을 들 수 있다.

[0028] 따라서, 치환기 R이 시클로알칸환에 의해 치환되는 알킬기인 경우의 구체적인 예로서는, 시클로프로필메틸기, 시클로헥실에틸기, 8,9-페타노펜타데실기 등을 들 수 있다.

[0029] 치환기 R이 방향족 고리에 의해 치환되는 알킬기인 경우의 구체적인 예로서는, 벤질기, 폐네틸기, p-펜틸페닐옥틸기 등을 들 수 있다.

[0030] 바람직하게는, R은 탄소수 9 내지 17개의 직쇄상 또는 분지상 알킬기, 탄소수 9 내지 17개의 직쇄상 또는 분지상 알케닐기, 또는 탄소수 9 내지 17개의 직쇄상 또는 분지상 알키닐기이다. 보다 바람직하게는, R은 탄소수 9 내지 17개의 직쇄상 또는 분지상 알킬기 또는 탄소수 9, 11, 13, 15 또는 17개의 직쇄상 또는 분지상 알케닐기이다. 특히 바람직하게는, R은 탄소수 9, 11, 13, 15 또는 17개의 직쇄상 또는 분지상 알케닐기이다.

[0031] 일반식(1)로 나타내는 화합물 중의 X 및 Y는 각각 독립적으로 산소원자(-O-) 또는 메틸렌기(-CH₂-)를 나타내나, X와 Y가 동시에 메틸렌기가 될 수는 없다. 즉, X 및 Y는 조합하면 이하의 3가지와 같다:

(1) X가 산소원자이고, Y가 산소원자이다.

(2) X가 산소원자이고, Y가 메틸렌기이다.

(3) X가 메틸렌기이고, Y가 산소원자이다.

[0035] 일반식(1)로 나타내는 환상 포스파티딘산 유도체 중의 M는 수소원자 또는 알칼리 금속원자로서는 리튬, 나트륨, 칼륨 등을 예로 들 수 있고, 나트륨이 특히 바람직하다.

[0036] 본 발명에 이용되는 일반식(1)로 나타내는 화합물의 구체적인 예로서는, 1번 위치 알킬기로서 R이 탄소수 17개의 알케닐기인 오레오일기(C18:1로 약함), R이 탄소수 15개의 알케닐기인 팔미토오레오일기(C16:1로 약함)를 가지는 환상 포스파디딘산 및 카바환상 포스파디딘산 유도체가 특히 바람직하다.

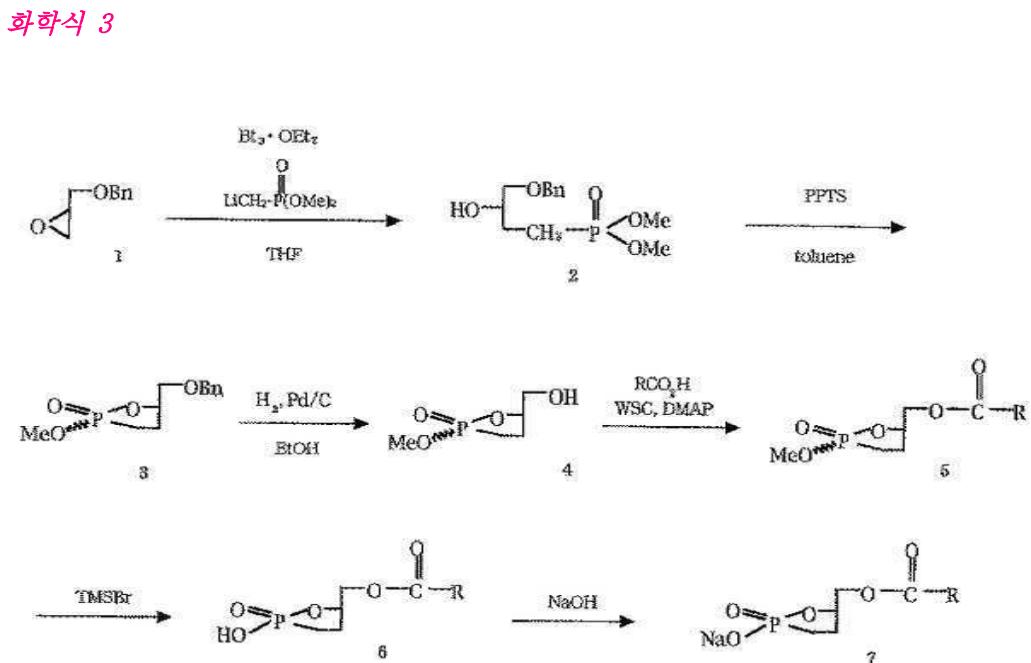
[0037] 일반식(1)의 화합물은 그 치환기의 종류에 따라, 위치이성질체(positional isomer), 기하이성질체(geometric isomer), 호변이성질체(tautomer), 또는 광학이성질체(optical isomer)와 같은 이성질체가 존재하는 경우가 있으나, 모든 가능한 이성질체, 아울러 2종류 이상의 상기 이성질체를 임의의 비율로 포함하는 혼합물도 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0038] 또한, 일반식(1)의 화합물은 물 또는 각종 용매와의 부가물(수화물 또는 용매화물)의 형태로 존재하는 경우도 있으나, 이를 부가물도 본 발명의 범위 내에 포함된다. 아울러, 일반식(1)의 화합물 및 그의 염의 임의의 결정형도 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0039] 일반식(1)로 나타내는 화합물 중 X 및 Y가 산소원자인 화합물은, 예를 들면 특개평 5-230088호 공보, 특개평 7-149772호 공보, 특개평 7-258278호 공보, 특개평 9-25235호 공보에 기재된 방법 등에 준하여 화학적으로 합성할 수 있다.

[0040] 또한, 일반식(1)로 나타내는 화합물 중 X 및 Y가 산소원자인 화합물은, 특개2001-178489호 공보에 기재된 방법 등에 준하여, 리조형 인지질에 포스포리파제 D를 작용시켜 합성할 수 있다. 이때 이용되는 리조형 인지질은 포스포리파제 D를 작용시키는 리조형 인지질이라면 특별히 한정되는 것은 아니다. 리조형 인지질은 다수가 알려져 있는데, 지방산종이 서로 다른 것, 에테르 또는 비닐에테르 결합을 가지는 분자종 등이 알려져 있고, 이들은 상업적으로 입수 가능하다. 포스포리파제 D로서는, 양배추나 낙화생 등의 고등식물 유래의 것이나 Streptomyces chromofuscus, Actinomadula sp. 등 미생물 유래의 것이 시판 시약으로서 입수 가능하나, Actinomadula sp. No. 362 유래의 효소에 의해 극히 선택적으로 환상 포스파디딘산이 합성된다(참조: 특개평 11-367032호 명세서). 리조형 인지질과 포스포리파제 D의 반응은 효소가 활성을 나타낼 수 있는 조건이라면 특별히 한정되지 않으나, 예를 들면, 염화칼슘을 함유하는 초산 완충액(pH 5~6 정도) 중에서 실온으로부터 가온하(바람직하게는 37°C 정도)에서 1 내지 5시간 정도 반응시킨다. 생성된 환상 포스파디딘산 유도체는 표준방법에 준하여, 추출, 퀼럼 크로마토그라피, 박층 크로마토그라피(TLC) 등에 의해 정제할 수 있다.

[0041] 또한, 일반식(1)로 나타내는 화합물 중 X가 산소원자이고, Y가 메틸렌기인 화합물은 문헌에 기재된 방법 (Kobayashi, S. 등, Tetrahedron Letters 34, 4047-4050(1993))에 준하여 합성할 수 있으며, 국제공개 WO2002/094286호 공보에 기재된 방법에 의해 합성할 수 있다. 구체적인 합성경로의 한가지 예는 다음과 같다.



[0042]

[0043] 상기에서, 우선 시판되는 (R)-벤질글리시딜에테르(1)을 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ 로 활성화시키고, 메틸포스폰산디메틸에스테르에 n-BuLi를 작용시켜 수득되는 리티오체(lithiated form)를 반응시켜 알코올(2)를 수득한다.

[0044] 수득된 알코올을 톨루엔 중에서 과잉의 p-톨루엔суلف산의 피리디늄염을 이용하여 80°C에서 반응시켜 환화체(cyclized form, 3)를 수득한다. 상기 환화체를 수소분위기 하에서 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2\text{-C}$ 를 이용하여 가수분해하고, 탈벤질화시킨다(4). 축합제로서 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드염산염을 이용하여 지방산과 반응시켜 커플링체(5)를 수득한다. 다음으로, 구핵체(nucleophile)로서 브로모트리메틸실란을 이용하여, 메틸기만을 위치선택적으로 제거하고, 환상 포스폰산(cyclic phosphonic acid, 6)을 수득한다. 이것을 에테르를 이용하여 분액 깔대기(separatory funnel)로 이동시키고, 소량의 0.02N 수산화나트륨 수용액을 적하시켜 분액조작을 행하여, 나트륨염(7)으로서 목적 화합물을 추출, 정제한다.

[0045] 또한, 일반식(1)로 나타내는 화합물 중 X가 메틸렌기이고 Y가 산소원자인 화합물은, 특개 2004-010582호 공보

또는 국제공개 WO2003/104246호 공보에 기재된 방법에 의해 합성할 수 있다.

- [0046] 본 발명의 관절증 치료제는 1 또는 2 이상의 제제학적으로 허용되는 제제용 첨가물과 유효성분인 일반식(1)로 나타내는 화합물을 함유하는 의약 조성물의 형태로 제공되는 것이 바람직하다.
- [0047] 본 발명의 관절증 치료제는 여러 형태로 투여할 수 있으나, 바람직한 투여형태로서는 경구투여든 비경구투여(예를 들면, 정맥내, 근육내, 피하 또는 피내 등에의 주사, 직장내 투여, 경첩막 투여 등)든 무방하다. 경구투여에 적절한 의약조성물로서는, 정제, 과립제, 캡슐제, 산제, 용액제, 혼탁제, 시럽제 등을 예로 들 수 있고, 비경구투여에 적절한 의약조성물로서는 주사제, 점액제, 좌제, 경피흡수제등을 예로 들 수 있으나, 본 발명의 약제 형태는 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 공지기술을 이용하여 서방형 제제(sustained-release formulation)로 만들 수도 있다.
- [0048] 본 발명의 관절증 치료제의 제조에 사용되는 제제용 첨가물의 종류는 특별히 제한되지 않고, 당업자가 적절히 선택할 수 있다. 예를 들면, 부형제, 봉괴제 또는 봉괴보조제, 결합제, 활택제, 코팅제, 기제, 용해제 또는 용해 보조제, 분산제, 혼탁제, 유화제, 완충제, 산화 방지제, 방부제, 등장화제, pH 조절제, 용해제, 안정화제 등을 채택할 수 있으며, 이러한 목적으로 사용되는 개별의 재료는 당업자에게 주지되어 있다.
- [0049] 경구 투여용 제제의 조제에 사용될 수 있는 제제용 첨가물로, 예를 들면, 포도당, 유당, D-만니톨, 녹말, 또는 결정 셀룰로스 등의 부형제; 카복시메틸셀룰로스, 녹말, 또는 카복시메틸셀룰로스칼슘 등의 봉괴제 또는 봉괴보조제; 히드록시 프로필셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 폴리비닐피리돈, 또는 젤라틴 등의 결합제; 스테아린산 마그네슘 또는 활석 등의 활택제; 히드록시프로필메틸셀룰로스, 백설탕, 폴리에틸렌글리콜 또는 산화 티탄 등의 코팅제; 바셀린, 유동 파라핀, 폴리에틸렌글리콜, 젤라틴, 고령토, 글리세린, 정제수, 또는 하드 팩(hard fat) 등의 기제를 사용할 수 있다.
- [0050] 주사 또는 점액용 제제(infusion preparation)의 조제에 사용될 수 있는 제제용 첨가물로서는, 주사용 종류수, 생리 식염수, 프로필렌글리콜, 계면활성제 등의 수성 또는 용시 용해형(use-time dissolution type) 주사제를 구성하는 용해제 또는 용해 보조제; 포도당, 염화 나트륨, D-만니톨, 글리세린 등의 등장화제; 무기산, 유기산, 무기 염기 또는 유기 염기의 pH 조절제 등의 제제용 첨가물을 사용할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 관절증 치료제는 인간 등 포유류에 투여될 수 있다. 본 발명의 관절증 치료제의 투여량은 환자의 나이, 성별, 체중, 증상 및 투여 경로 등의 조건에 따라 적의 증감될 수 있으나, 일반적으로 성인 하루 유효성분의 양으로 $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ 내지 $1,000\text{mg/kg}$ 정도의 범위이고, $10\text{ }\mu\text{g/kg}$ 내지 100mg/kg 정도의 범위가 바람직하다. 상기 투여량의 약제는 하루에 한 번 투여하거나, 수회(예를 들면, 2~4 회 정도)로 나누어 투여해도 좋다.
- [0052] 이하의 실시예에 의해 본 발명을 보다 구체적으로 설명하겠으나, 본 발명은 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0053] 실시예

실시예 1

(1) 방법

- [0055] (1-1) 관절 연골세포(articular chondrocyte) 및 활막세포(synoviocyte)의 배양
- [0056] 변형성 무릎 관절증(knee osteoarthritis) 환자로부터 인공 무릎관절 치환술(artificial knee joint replacement) 시 제거 채취한 관절 초자연골(hyaline articular cartilage)을 사용하였다. 관절 연골파편은 세척 후, 프로나제, 콜라제나제 효소처리에 의해 연골기질을 분해, 세포를 채취하고 배양, 냉동보존하였다. 또한, 활막세포(synoviocyte)도 채취하였다. 본 실시예에서는 이러한 변형성 관절증 환자의 관절 연골세포와 활막세포를 이용하고, 형질변이를 피하기 위해 단층 고밀도에서 배양(monolayer, high-density culture)하여 실

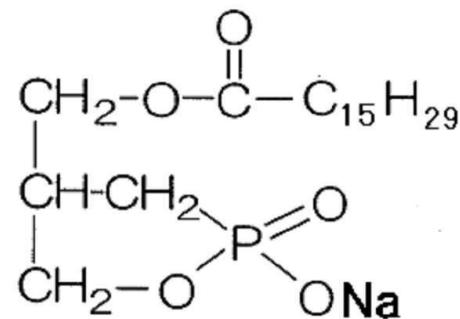
험에 사용하였다. 배지는 DMEM + 10% FBS + 1% 항생제/항진균제를 이용하고, confluent 후 무혈청 배지로 교체하여 실험을 시작하였다.

[0057] (1-2) 환상 포스파티딘산 또는 카바환상 포스파티딘산(cPA) 첨가

[0058] 환상 포스파티딘산 또는 카바환상 포스파티딘산 C16:1-cPA (cPA)와, native cPA(NcPA)를 이용하여, 각각 농도(0 ~ 50nM), 시간(0 ~ 48 시간), 히알루론산(HA) 생산, 히알루론산(HA) 합성효소(HAS1, HAS2 및 HAS3)의 발현, 및 히알루론산(HA) 분해효소(HYAL1 및 HYAL2)에 대해 검토하였다.

[0059] C16:1-cPA(도면 중에는 "cPA"로 표기한다)의 화학구조는 아래와 같다.

화학식 4



[0060]

[0061] 또한, native cPA(도면 중에는 "NcPA"로 표기한다)는 아래와 같이 제조하였다(참조: 특원 제2011-126901호의 실시예 1 및 3).

[0062] 대두 인지질(레시틴 함량: 70%) 10g을 0.3M 염화칼슘을 함유하는 100ml의 1M 초산 완충용액(pH 6.5)에 용해시킨 후, 6000단위의 스트렙토마이세스 속 유래 포스포리파제 A2를 첨가하고, 40°C에서 18시간 교반하여 반응시켰다. 반응액을 pH 2.5로 조정하여 효소를 실활시킨 후, 100ml 클로로포름, 50ml 메탄올을 첨가하고 충분히 교반혼합하여 지질성분을 추출하였다. 클로로포름 층을 모아 회전증발기에서 감압건조시켰다. 고형분에 100ml의 아세톤을 가하고 인지질을 침전시켜 유리 지방산을 제거하였다. 침전물 5g을 40ml 클로로포름에 용해시켜 1M 초산 완충용액(pH 5.5) 10ml을 가하고, 다시 1500단위의 액티노마이세스 속 유래의 포스포리파제 D를 첨가한 다음, 40°C에서 18시간 교반하면서 반응시켰다. 반응액에 20ml의 3M 염화나트륨, 20ml의 0.1M EDTA 용액을 첨가하고, 40°C에서 1시간 교반하였다. 다시 20ml의 메탄올을 첨가하여 충분히 교반한 후, 3000회전, 5분간 원심분리하여 클로로포름 층을 모았다. 이 용액을 회전증발기에서 감압건조시키고 환상 포스파티딘산 나트륨 3.8g을 수득하였다. 레시틴 함량: 70%(10g 중 7g)로부터 환상 포스파티딘산 나트륨 3.8g을 수득하였으므로, 수율은 54.3%였다. 환상 포스파티딘산 나트륨의 순도분석은 실리카겔 플레이트를 이용하여, 클로로포름:메탄올:초산:5% 이아황산 나트륨(100:40:12:5, v/v)으로 전개한 후, 5% 초산동:8% 인산:2% 황산 혼합액에 단시간 침지하고 풍건시킨 다음, 180°C에서 약 10분간 가열한 후 생성된 스팟을 스캐너(ATTO Corporation)법으로 조사하였다. 즉, 표준품(97% 순도품)을 대조로 하여 박층 크로마토그래피를 텐시토메터에 의해 측정하고 면적비로 정량하였다. 상기 단계로 수득된 생성물 중 환상 포스파티딘산 나트륨의 순도는 54%였다.

[0063] 상기 환상 포스파티딘산 나트륨 500mg을 5ml의 10% 메탄올을 함유하는 클로로포름에 용해시키고 실리카겔 컬럼에 걸어 동일 용매로 전개한 다음, 다시 20% 메탄올을 함유하는 클로로포름으로 전개하고, 10ml 분획으로 분취하였다. 상기 TLC법에 의해 환상 포스파티딘산 나트륨을 함유하는 분획을 확인하여 수집하고, 회전증발기에서 감압건조시켜 환상 포스파티딘산 나트륨의 분말 320g을 수득하였다. 본 시료의 환상 포스파티딘산 나트륨의 순도는 95%였다.

[0064] (1-3) HA 합성효소 및 HA 분해효소 발현의 측정

[0065] 시험 24시간 전에 연골세포 배양을 무혈청 배지로 교체하고, 각 농도(0, 5, 10, 25, 50nM)의 cPA 또는 N-cPA를

첨가하였다. 마찬가지로, 시험 24시간 전에 연골세포 배양을 무혈청 배지로 교체하고, 각 농도(0, 10, 25uM)의 cPA를 첨가하였다. 0, 0.5, 1, 2, 4시간 후에 총세포 RNA를 회수하고, cDNA 합성, HAS1, HAS2, HAS3, HYL1, 및 HYL2의 발현수준을 실시간 PCR로 정량하였다. 발현량은 β 액틴(대조 유전자)에 대한 상대 발현량으로서 구하고, 무첨가 대조 또는 첨가전 값을 1로 표시하였다.

[0066] 구체적으로, 다음과 같이 시료 중의 표적과 대조군의 사이클 수의 역치(Ct: cycle number threshold)의 차와, 대조군 시료에 있어서 Ct를 비교하는 $\triangle\triangle Ct$ 법에 의해 발현량 비를 산정하였다.

[0067] 1) 각 시료에 있어서 Ct를 사용하여, $\triangle Ct$ 를 산출

[0068] $\triangle Ct = Ct(\text{표적 유전자}) - Ct(\text{대조군 유전자})$

[0069] 2) $\triangle\triangle Ct$ 를 산출

[0070] $\triangle\triangle Ct = Ct(\text{대상 시료}) - Ct(\text{대조군 시료})$

[0071] 3) 대상 시료에 있어서 표적 유전자 발현을 정규화

[0072] $2^{(-\triangle\triangle Ct)}$

[0073] 4) 대조군 시료에 있어서 정규화 이후의 수준을 1로 하고, 표적 유전자 변화를 산출

[0074] (1-4) 히알루론산(HA) 생산의 측정

[0075] 시험 48시간 전에 연골세포 배양을 무혈청 배지로 교체하고, 각 농도(0, 10, 50uM)의 cPA 또는 N-cPA를 첨가하였다. 배양 상등액을 0, 6, 12, 24, 48시간 후에 채취하였다. 소의 코 연골유래의 HA 결합 단백질을 이용한 샌드위치 ELISA법 (QnE Hyaluronic Acid(HA) ELISA Assay kit; Biotech Trading Partners, Inc)에서 HA 생산을 정량하였다.

[0076] (2) 결과

[0077] (2-1) HA 합성효소 및 HA 분해효소 발현의 측정결과

[0078] 연골세포에 있어서 HA 합성효소 및 HA 분해효소 발현의 측정결과를 도 1 내지 도 5에 도시하였다. 도 1 내지 도 5에서 보듯이, C16:1-cPA(cPA)는 농도의존적으로 HAS 발현을 지속적으로 유도하였다. HAS1,3은 첨가 2시간 후에 일파성으로 발현이 유도되었으나, 4시간 후에는 발현이 저하되었다. NcPA도 마찬가지였다. HA 분해효소 (HYL1,2,3)의 발현에는 영향이 없었다. 상기 결과로부터, cPA 및 NcPA는 HA 합성효소를 유도하는 것으로 나타났다. 또한, 활막세포에 있어서 HA 합성효소 발현의 측정결과를 도 7에, HA 분해효소 발현의 측정결과를 도 8에 각각 나타내었다.

[0079] (2-2) 히알루론산(HA) 생산의 측정결과

[0080] HA 생산의 측정결과를 도 6에 도시하였다. 도 6에서 보듯이, C16:1-cPA(cPA)는 연골세포 HA 합성을 계시적으로 촉진시켜 세포 외로 방출하였다. 48시간 후에는 50nM 첨가군은 대조군과 비교하여 약 3배의 HA 증가를 보였다. NcPA도 마찬가지 작용을 나타내었다. 상기 결과로부터, C16:1-cPA(cPA) 및 OA는 관절 연골세포에 대하여 HA 생산을 촉진하는 것으로 나타났다.

[0081] (3) 결론

[0082] 일반식 (1)로 나타내는 환상 포스파티딘산 또는 카바환상 포스파티딘산은 피부 선유아세포(dermal fibroblast s)의 경우와 마찬가지로, 사람 OA관절 연골세포에 있어서도 HA 합성효소 발현을 유도하여 HA 생산을 촉진하는 것으로 나타났다.

실시예 2

[0083] 토끼 무릎(rabbit knee) 변형성 관절증에 대한 ScPA의 약효평가

[0084] (1) 방법

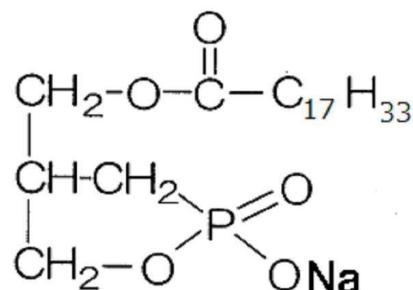
[0085] (1-1) 사용동물 및 사육조건

[0086] 11~12주령의 수컷 토끼(Kbs:NZW) 12쌍을 사용하였다. 토끼는 14.4~24.9°C에서 7~19시의 조명시간(12시간)으로 연속환기하며 1쌍/케이지의 조건으로 사육하였다. 사료는 CR-3(일본 CLEA사 제품)(150g/일)을 사용하고, 음료 수는 수돗물을 사용하였다.

[0087] (1-2) 투여물질

[0088] (9Z)-9-옥타데센산-(2-히드록시-2-옥사이드-1,2-옥사포스포란-4-일)메틸 에스테르 나트륨염(octadecenoic acid-(2-hydroxy-2-oxide-1,2-oxaphospholan-4- yl)methyl ester sodium salt)(C18:1-cPA; ScPA)을 사용하였다.

화학식 5



[0089]

[0090] 매체(vehicle)로서는 생리식염수를 사용하였다.

[0091] (1-3) 변형성 관절증 모델의 작제

[0092] 깊은 마취(deep anesthesia) 하의 토끼 우후지(right hind limb) 관절주변을 전기 제모기로 제모하고, 이소дин(isodine)으로 소독하였다. 메스로 우후지 내측의 외피를 절개한 다음, 슬개 인대(patellofemoral ligament)의 내측과 관절포(articular capsule)와의 접경을 절개한 후, 내측 측부인대(medial patellofemoral ligament)를 절단하였다. 그런 다음, 관절포(articular capsule)를 크게 전개하고, 내측 반월판(medial meniscus)을 노출시켜 완전히 제거하였다. 반월판을 적출한 후, 관절포의 주위조직 및 표피를 봉합하였다. 봉합시에는 항생물질(Viccillin, Meiji Seika Pharma Co., Ltd.)을 함유하는 생리식염수(500mg(역가)/20ml)로 수술부위를 세정하였다.

[0093]

외과적 처치의 당일(day 0)에는 절식하고, 급수는 자유섭취하였다. 각성(awakening)은 동물이 두부를 자발적으로 움직이는 상태로서 확인하였다. 각성을 확인할 때까지의 사이 상기 동물의 체온 저하를 막기 위하여 타올로서 몸체를 덮어 보온하고, 피가 합쳐지는 것을 막기 위하여 적절히 체위교환(body position change)하였다. 처치후 5일째(Day 5)까지는 감염예방을 위하여 항생제(Viccillin; 3단위/kg)를 1일 1회 근육내 투여하였다.

[0094]

모델 작제 이후 체중이 균일한 1군 6쌍의 매체(vehicle) 투여군(동물번호 101~106)과 시험물질(test substance)(ScPA) 투여군(동물번호 201~206)의 2군으로 나누었다.

- [0095] (1-4) 시험물질 및 매체의 관절강(joint cavity) 내 투여
- [0096] 시험물질 및 매체의 투여는 이하와 같이 행하였다.
- [0097] 투여경로: 관절강(joint cavity) 내 투여
- [0098] 투여부위: 우후지(right hind limb, 처치지(treated limb))
- [0099] 투여횟수: Day 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28, 32, 35 및 39
- [0100] 투여용량: 시험물질 10ug/토끼 (용량 0.2ml)
- [0101] 매체 0.2ml/토끼
- [0102] 투여방법: 1.0ml의 시린지((Terumo Corporation) 와 27G의 주사침(Terumo Corporation)으로 투여
- [0103] (1-5) 동통평가(pain assessment, 양후지 중량배분비)
- [0104] 측정횟수: 처치전, 처치 1, 2, 3, 4, 5 및 6 주간 후에 총 7회의 빈도로 측정
- [0105] 측정방법: 좌우후지에 부과되는 체중 각각을 체중계를 이용하여 측정하고, 처치지(우후지)의 배분비를 하기 식에 의하여 구하였다:
- [0106] 처치지(우후지)의 중량배분비(%) = $[(\text{우후지(kg)}) / (\text{우후지(kg)} + \text{좌후지(kg)})] \times 100$
- [0107] (1-6) 종창평가(swelling assessment, 양후지 관절종창비)
- [0108] 측정횟수: 처치 6 주간 후에 측정
- [0109] 측정방법: 좌우후지의 관절부위에서 가장 넓은 부위를 디지털 캘리퍼스(digital calipers)를 이용하여 측정하고, 변형성 관절증에 의해 유발되는 관절부의 종창을 이하의 식에 의해 구하였다:
- [0110] 처치지(우후지)의 종창비(%) = $[(\text{우후지(mm)} - \text{좌후지(mm)}) / (\text{우후지(mm)} + \text{좌후지(mm)})] \times 100$
- [0111] (1-7) 생체재료채취(Day 42) 및 채취후의 처리
- [0112] 깊게 마취시킨 동물에 대하여 사지를 절개함으로써 방혈 치사시켰다. 방혈치사후, 처치지(우후지)의 무릎 관절 부위의 대퇴골 돌기(femur condyle) 및 경골 돌기(tibial condyle)를 적출하고, 10% 중성 완충 포르말린 용액에 고정하였다.
- [0113] (1-8) 병리조직표본의 관찰 및 병리조직학적 평가
- [0114] 10% 중성 완충 포르말린 용액에 침지고정한 대퇴골, 경골을 EDTA로 미네랄을 제거하였다. 미네랄 제거가 끝나면, 다음의 유색 부위를 표준방법에 따라 파라핀 포매후, 4um로 얇게 절단하고 hematoxylin-eosin (HE) 염색 및 safranin O (proteoglycan) 염색을 행하고, 광학현미경(BX51TF; OLYMPUS)으로 병리조직학적 검사를 행하였다. 병리조직표본에 있어서 연골변성의 정도는 다음 표 1에 기재된 평가기준(Kikuchi, T, Yoneda, H. et al., Osteoarthritis cartilage, 4; p.99 and continuing pages, 1996)에 따라 평가하였다. 구체적으로, 표층의 소실, 연골 파괴(cartilage erosion), 조조화(fibrillation)/균열(fissure), 프로테오글리칸 염색성(safranin O 염색법) 저하, 연골세포 배열부정, 연골세포 소실, 연골하골 노출, 연골세포 방상집족(cluster formation)의 8항목을 5단계 평가(0~4)하고, 각 항목의 평점의 총합을 총합평점으로 하였다. 또한, 표 1의 평가기준에 있어서 구체적인 기준이 없는 소견은 이하의 표 2에 기재된 평가기준(Naoki Ishiguro et al., Journal of Surgery, 29: p.112 and continuing pages, 2010)에 따라 평가하였다.

표 1

Observation / Score	1	2	3	4
Loss of superficial layer	<sight	Moderate	Focally severe	Extensive severe
Erosion of cartilage	<Detectable	Moderate	Focally severe	Extensive severe
Fibrillation and/or fissures	<Noticeable (<1 very small)	Moderate (1 small)	Marked (2 small or 1 medium)	Extensive (3 small, 2 medium or 1)
Loss of proteoglycan	<Paler stain than control	Moderate loss of safranophilia	Marked loss of safranophilia	Total loss of safranophilia
Disorganization of chondrocyte	Noticeable	Moderate, with decrease in cells	Marked loss of cells	No recognizable decrease in cells
Loss of chondrocyte	<Noticeable Decrease in cells	Moderate decrease in cells	Marked decrease in cells	Very extensive decrease in cells
Exposure of subchondral bone	<Focal Exposure of bone	Moderate Exposure of bone	Fairly extensive exposure of bone	Very extensive exposure of bone
Cluster formation ³⁾	<3-4 small, or 1-2	5-6 small, 3-4	7 or more small, 5-	7 or more medium

a) Small: 2-4 cells, Medium: 5-8 cells, Large: 9 or more cells

[0115]

표 2

소견	평점	상세한 기준
연골 파괴 (cartilage erosion)	0	변화없음
	1	표층으로부터 중간층에 국한된 병변이 평가부위의 1/3 이하로 보임
	2	표층으로부터 중간층에 국한된 병변이 평가부위의 1/3~2/3, 혹은 심층에 파급된 병변이 평가부위 폭의 1/3 이하로 보임
	3	표층으로부터 중간층에 국한된 병변이 평가부위의 2/3 이상, 혹은 심층에 파급된 병변이 평가부위 폭의 1/3~2/3로 보임
	4	표층으로부터 중간층에 국한된 병변이 1, 혹은 심층에 파급된 병변이 평가부위 폭의 2/3 이상으로 보임
조조화 (fibrillation) /균열 (fissure)	0	변화없음
	1	표층으로부터 중간층에 국한된 병변이 평가부위의 1/3 이하로 보임
	2	표층으로부터 중간층에 국한된 병변이 평가부위의 1/3~2/3, 혹은 심층에 파급된 병변이 평가부위 폭의 1/3 이하로 보임
	3	표층으로부터 중간층에 국한된 병변이 평가부위의 2/3 이상, 혹은 심층에 파급된 병변이 평가부위 폭의 1/3~2/3로 보임
	4	표층으로부터 중간층에 국한된 병변이 1, 혹은 심층에 파급된 병변이 평가부위 폭의 2/3 이상으로 보임
표층(superficial layer)의 소실	0	변화없음
	1	변화의 발현영역이 평가부위의 1/4 이하를 점유함
	2	변화의 발현영역이 평가부위의 1/4~2/4를 점유함
	3	변화의 발현영역이 평가부위의 2/4~3/4를 점유함
	4	변화의 발현영역이 평가부위의 3/4 이상을 점유함
프로테오글리칸 염색성 저하 (lowered proteoglycan stainability)	0	변화없음
	1	변화의 발현영역이 평가부위의 1/4 이하를 점유함
	2	변화의 발현영역이 평가부위의 1/4~2/4를 점유함
	3	변화의 발현영역이 평가부위의 2/4~3/4를 점유함
	4	변화의 발현영역이 평가부위의 3/4 이상을 점유함
연골세포 배열부정 (disorganization of chondrocytes)	0	변화없음
	1	변화의 발현영역이 평가부위의 1/4 이하를 점유함
	2	변화의 발현영역이 평가부위의 1/4~2/4를 점유함
	3	변화의 발현영역이 평가부위의 2/4~3/4를 점유함
	4	변화의 발현영역이 평가부위의 3/4 이상을 점유함
연골세포 소실 (loss of chondrocyte)	0	변화없음
	1	변화의 발현영역이 평가부위의 1/8 이하를 점유함
	2	변화의 발현영역이 평가부위의 1/8~1/3를 점유함
	3	변화의 발현영역이 평가부위의 1/3~2/3를 점유함
	4	변화의 발현영역이 평가부위의 2/3 이상을 점유함

연골하골 (subchondral bone)의 노출	0	변화없음
	1	변화의 발현영역이 평가부위의 1/8 이하를 점유함
	2	변화의 발현영역이 평가부위의 1/8~1/3를 점유함
	3	변화의 발현영역이 평가부위의 1/3~2/3를 점유함
	4	변화의 발현영역이 평가부위의 2/3 이상을 점유함
상집족형성 (Cluster formation)	0	변화없음
	1	변화의 발현영역이 평가부위의 1/8 이하를 점유함
	2	변화의 발현영역이 평가부위의 1/8~1/3를 점유함
	3	변화의 발현영역이 평가부위의 1/3~2/3를 점유함
	4	변화의 발현영역이 평가부위의 2/3 이상을 점유함

[0117] (1-9) 데이터 처리 및 통계해석

[0118] 양후지 중량배분비 및 양후지 관절종창비에 있어서 군평균치(mean) 및 그의 표준오차(SE)를 산출한 후, 시험물질 투여군과 매체 투여군에서 F-검정을 행하고, 분산이 없는 경우에는 Student의 T검정으로, 분산이 있는 경우에는 Aspin-Welch의 T-검정으로, 병리조직학적 검사에 있어서 평가항목의 총합평점에 있어서는 군평균치(mean)과 그의 표준오차(SE)를 산출한 후, Mann-Whitney의 U-검정으로 2군간의 평균치의 차를 검정하였다. 또한, 양측의 유의수준은 5% 및 1%로 정하였다.

[0119] (2) 결과

[0120] (2-1) 동통평가(양후지 중량배분비)

[0121] 표 3 및 도 9는 모델작제(Day 0)로부터 생체재료 채취일(Day 42)까지의 양후지 중량배분비의 추이를 나타낸다. 매체 투여군은 Day 14까지 처치한 외과적 침습으로부터의 회복이 나타났으나, 그 이후에는 시간이 지남에 따라 변형성 관절증이 유발되어 그에 수반하는 동통으로부터 처치지(우후지)에 부과되는 체중의 비율은 감소되었고, 생체재료 채취일(Day42)에는 28.0%의 낮은 값을 나타내었다. 한편, 시험물질 투여군은 Day 14까지는 매체 투여군과 마찬가지로 처치의 외과적 침습으로부터 회복되었고, 그 이후에는 매체 투여군과 비교하여 처치지(우후지)에 부과되는 중량의 비율은 생체재료 채취일(Day 42)까지 높은 값을 나타내어, Day 42의 측정에서는 유의적인 차가 나타났다($p=0.0053$).

표 3

군명 (group)	동물번호	항 목							
			Day0	Day7	Day14	Day21	Day28	Day35	Day42

매체 투여군	101	우후지(g)	630	350	550	290	450	440	340	
		좌후지(g)	500	390	700	750	650	650	910	
		중량배분비(%)	56	47	44	28	41	40	27	
	102	우후지(g)	550	240	160	320	100	130	80	
		좌후지(g)	500	500	160	320	300	800	550	
		중량배분비(%)	52	32	50	50	25	14	13	
	103	우후지(g)	470	420	370	490	520	300	470	
		좌후지(g)	510	700	670	740	720	580	720	
		중량배분비(%)	48	38	36	40	42	34	39	
	104	우후지(g)	390	300	200	380	480	510	290	
		좌후지(g)	450	640	500	600	550	750	930	
		중량배분비(%)	46	32	29	39	47	40	24	
	105	우후지(g)	540	270	600	410	290	370	370	
		좌후지(g)	460	610	500	610	480	350	870	
		중량배분비(%)	54	31	55	40	38	51	30	
	106	우후지(g)	380	50	450	450	590	380	490	
		좌후지(g)	460	340	500	680	740	760	900	
		중량배분비(%)	45	13	47	40	44	33	35	
평균		50.3	32.1	43.3	39.4	39.4	35.6	28.0		
표준오차		1.77	4.60	3.94	2.87	3.14	5.07	3.83		
시험물질 투여군	201	우후지(g)	660	660	520	380	600	350	440	
		좌후지(g)	610	1010	770	710	700	650	620	
		중량배분비(%)	52	40	40	35	46	35	42	
	202	우후지(g)	320	160	200	370	150	350	510	
		좌후지(g)	400	410	400	440	290	800	700	
		중량배분비(%)	44	28	33	46	34	30	42	
	203	우후지(g)	410	140	320	720	390	380	630	
		좌후지(g)	550	900	640	350	260	470	380	
		중량배분비(%)	43	13	33	67	60	45	62	
	204	우후지(g)	490	520	630	250	660	630	660	
		좌후지(g)	460	750	810	580	750	1030	820	
		중량배분비(%)	52	41	44	30	47	38	45	
	205	우후지(g)	270	430	380	450	600	560	520	
		좌후지(g)	260	880	700	760	710	570	840	
		중량배분비(%)	51	33	35	37	46	50	38	
	206	우후지(g)	350	460	610	440	780	510	610	
		좌후지(g)	310	750	600	580	800	870	580	
		중량배분비(%)	53	38	50	43	49	37	51	
평균		49.1	32.1	39.4	43.0	47.0	39.1	46.7		
표준오차		1.79	4.21	2.78	5.36	3.38	2.82	3.61		
P Volum		0.6486	0.9960	0.4310	0.5641	0.1295	0.5602	0.0053**		

[0123]

(%)

[0124] (2-2) 종창평가(양후지 관절종창비)

[0125] 표 4 및 도 10에 생체재료 채취일(Day 42)의 양후지 관절종창비를 나타내었다. 동물개체의 관절폭을 측정하여 군간의 차를 검토하였는바, 시험물질 투여군이 매체 투여군과 비교하여 유의적으로 종창을 억제하였다 ($p=0.0164$).

표 4

군명 (group)	동물번호	항 목	4월19일
			Day42

[0126]

매체 투여군	101	우후지(mm)	24.45	
		좌후지(mm)	23.98	
		종창비(%)	1.96	
	102	우후지(mm)	25.86	
		좌후지(mm)	20.31	
		종창비(%)	27.33	
	103	우후지(mm)	23.08	
		좌후지(mm)	21.20	
		종창비(%)	8.87	
	104	우후지(mm)	24.37	
		좌후지(mm)	22.31	
		종창비(%)	9.23	
	105	우후지(mm)	24.96	
		좌후지(mm)	23.00	
		종창비(%)	8.52	
	106	우후지(mm)	25.44	
		좌후지(mm)	22.06	
		종창비(%)	15.32	
평균			11.9	
표준오차			3.54	
시험물질 투여군	201	우후지(mm)	24.17	
		좌후지(mm)	24.60	
		종창비(%)	-1.75	
	202	우후지(mm)	23.75	
		좌후지(mm)	23.38	
		종창비(%)	1.58	
	203	우후지(mm)	22.30	
		좌후지(mm)	21.50	
		종창비(%)	3.72	
	204	우후지(mm)	21.63	
		좌후지(mm)	22.88	
		종창비(%)	-5.46	
	205	우후지(mm)	24.74	
		좌후지(mm)	23.21	
		종창비(%)	6.59	
	206	우후지(mm)	21.36	
		좌후지(mm)	21.79	
		종창비(%)	-1.97	
평균			0.5	
표준오차			1.78	
P Volum			0.0164*	

[0127]

(%)

[0128]

(2-3) 병리조직학적 평가

[0129]

병리조직학적 검사결과를 표 5 및 표 6, 도 11에 요약하고, 대표례의 병리조직화상을 도 12에 나타내었다.

[0130]

매체 투여군 및 시험물질 투여군의 양군에 있어서, 대퇴골 외측과(lateral condyles of femur) 및 경골 외측과(lateral condyles of tibia)에는 변형성 관절증 모델 작제로부터 유래한 장해는 거의 나타나지 않았다.

[0131]

대퇴골 내측과에는 매체 투여군으로, 관절연골 표층의 소실, 프로테오글리칸 염색성 저하, 연골세포 배열부정, 연골세포 소실, 방상집족 형성이 6례 중 전례에서 나타났고, 연골파괴는 6례 중 5례에서 나타났다. 특히, 방상집족 형성은 전례에서 높은 수준(평균치 = 2.50 ± 0.43)이었다. 각 소견의 병리조직학적 평점은 9, 21, 17, 11, 8, 20(평균치 = 14.33 ± 2.33)이고, 전례의 관절연골에 경도 내지 중도의 변화가 나타났다. 한편, 시험물질 투여군의 대퇴골 내측과에 있어서 방상집족 형성이 6례 중 전례에서 나타났고, 연골 표층의 소실, 연골파괴, 연골세포 배열부정은 6례 중 5례에서 나타났다. 병리조직학적 평점은 5, 6, 10, 3, 20, 6(평균치 = 8.33 ± 2.51)이고, 매체 투여군의 같은 부위의 변화와 비교하여 6례 중 4례에서 저하경향이 나타났고, 병리조직학적 평점에 있어서도 낮은 값을 나타내었다($p = 0.0649$).

[0132]

경골 내측과에서는 매체 투여군에서 관절연골 표층의 소실, 연골조조화/균열, 연골세포 배열부정이 6례 중 전례에서 나타났고, 프로테오글리칸 염색성 저하가 6례 중 5례에서 나타났다. 병리조직학적 평점은 8, 27, 14, 5, 3, 18(평균치 = 12.50 ± 3.69)이고, 6례 중 5례의 관절연골에 경도 내지 중도의 변화가 나타났다. 시험물질 투여군에 있어서는, 연골조조화/균열이 6례 중 전례에서 나타났고, 연골 표층의 소실, 프로테오글리칸 염색성 저하는 6례 중 5례에서 나타났다. 병리조직학적 평점은 4, 16, 6, 1, 27, 9(평균치 = 10.50 ± 3.91)이었다.

표 5

병리조직학적 소견 (대퇴골 내측돌기)

시험군	매체 투여군							시험물질 투여군									
	동물번호	101	102	103	104	105	106	평균	표준오차	201	202	203	204	205	206	평균	표준오차
표층의 소실	1	4	2	1	1	2	1.83	0.48	1	1	1	0	3	1	1.17	0.40	
연골파괴	1	3	3	1	0	3	1.83	0.54	1	1	1	0	3	1	1.17	0.40	
조조화/균열	0	0	2	0	0	3	0.83	0.54	0	1	0	0	3	0	0.67	0.49	
프로테오글리칸 염색성 저하	1	4	2	2	1	2	2.00	0.45	0	1	2	0	3	1	1.17	0.48	
연골세포 배열부정	2	4	3	2	1	3	2.50	0.43	1	0	1	1	1	1	0.83	0.17	
연골세포 소실	1	2	1	1	1	1	1.17	0.17	0	0	1	1	3	0	0.83	0.48	
연골하골 노출	0	0	0	0	0	2	0.33	0.33	0	0	0	0	2	0	0.33	0.33	
방상집족 형성	3	4	4	4	4	4	3.83	0.17	2	2	4	1	2	2	2.17	0.40	
병리조직학적 평점	9	21	17	11	8	20	14.33	2.33	5	6	10	3	20	6	8.33	2.51	0.0649

소견의 등급: 0, 없음; 1, 극경도; 2, 경도; 3, 중등도; 4, 중도

병리조직학적 소견 (대퇴골 외측돌기)

시험군	매체 투여군						시험물질 투여군						
	동물번호	101	102	103	104	105	106	201	202	203	204	205	206
표층의 소실	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
연골파괴	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
조조화/균열	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
프로테오글리칸 염색성 저하	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
연골세포 배열부정	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
연골세포 소실	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
연골하골 노출	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
방상집족 형성	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
병리조직학적 평점	0	8	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0

소견의 등급: 0, 없음; 1, 극경도; 2, 경도; 3, 중등도; 4, 중도

[0133]

표 6

병리조직학적 소견 (경골 내측돌기)

시험군	매체 투여군							시험물질 투여군									
	동물번호	101	102	103	104	105	106	평균	표준오차	201	202	203	204	205	206	평균	표준오차
표층의 소실	1	3	2	1	1	3	1.83	0.40	1	3	1	0	4	3	2.00	0.63	
연골파괴	1	3	2	0	0	3	1.50	0.56	0	2	1	0	3	1	1.17	0.48	
조조화/균열	2	3	1	1	1	3	1.83	0.40	2	1	1	1	3	1	1.50	0.34	
프로테오글리칸 염색성 저하	1	4	2	1	0	2	1.67	0.56	1	4	1	0	4	1	1.83	0.70	
연골세포 배열부정	2	4	2	1	1	2	2.00	0.45	0	2	1	0	4	1	1.33	0.61	
연골세포 소실	1	3	1	0	0	1	1.00	0.45	0	0	0	0	3	1	0.67	0.49	
연골하골 노출	0	3	0	0	0	0	0.50	0.50	0	0	0	0	3	0	0.50	0.50	
방상집족 형성	0	4	4	1	0	4	2.17	0.83	0	4	1	0	3	1	1.50	0.67	
병리조직학적 평점	8	27	14	5	3	18	12.50	3.69	4	16	6	1	27	9	10.50	3.91	0.6991

소견의 등급: 0, 없음; 1, 극경도; 2, 경도; 3, 중등도; 4, 중도

병리조직학적 소견 (경골 외측돌기)

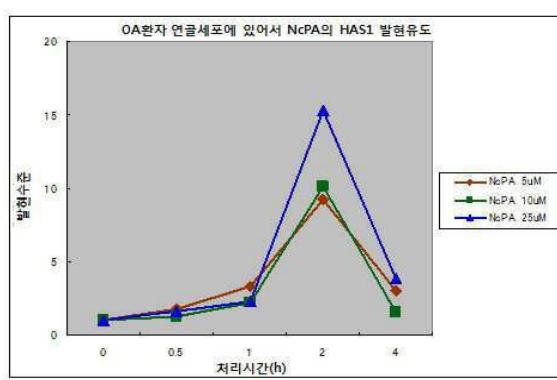
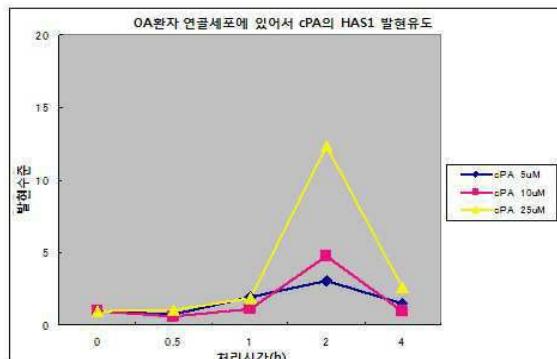
시험군	매체 투여군							시험물질 투여군						
	동물번호	101	102	103	104	105	106	201	202	203	204	205	206	
표층의 소실	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
연골파괴	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
조조화/균열	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
프로테오글리칸 염색성 저하	0	4	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
연골세포 배열부정	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
연골세포 소실	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
연골하골 노출	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
방상집족 형성	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
병리조직학적 평점	0	15	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0

소견의 등급: 0, 없음; 1, 극경도; 2, 경도; 3, 중등도; 4, 중도

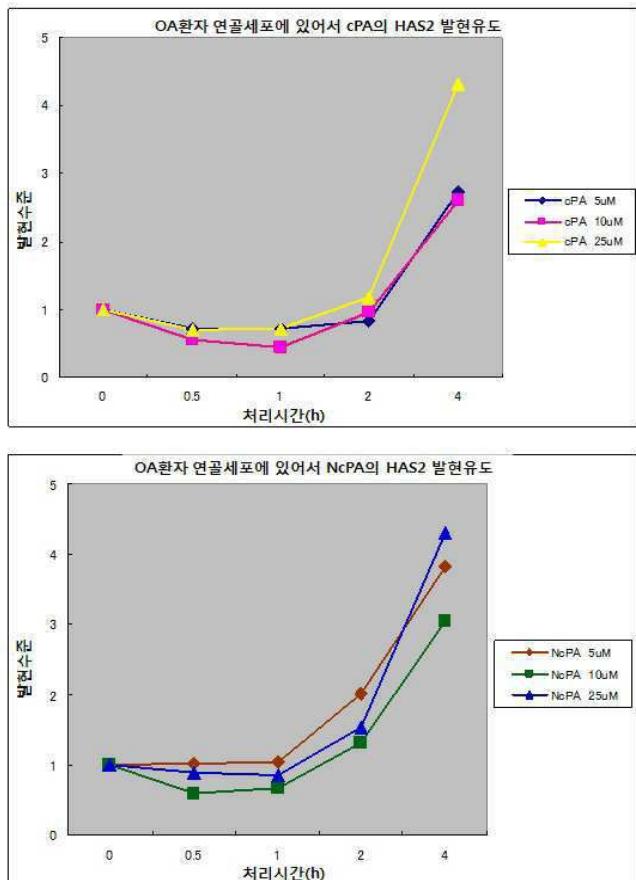
[0134]

도면

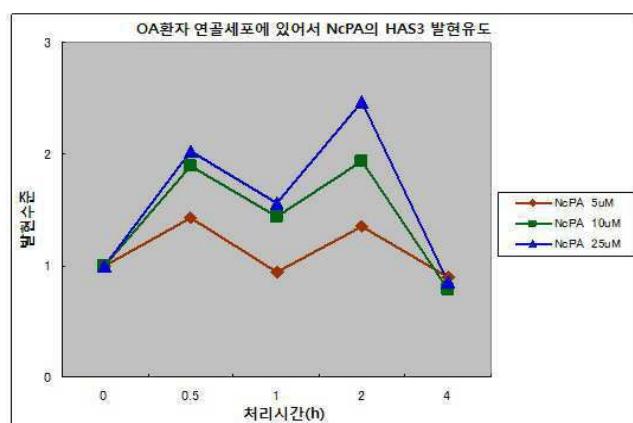
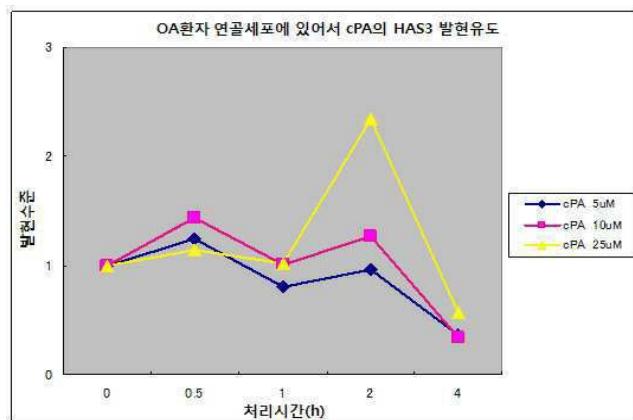
도면1



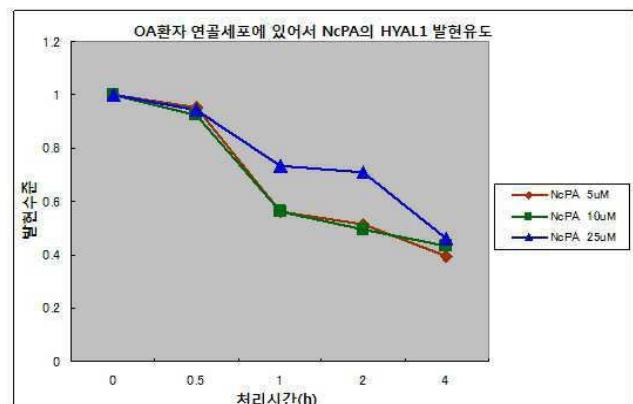
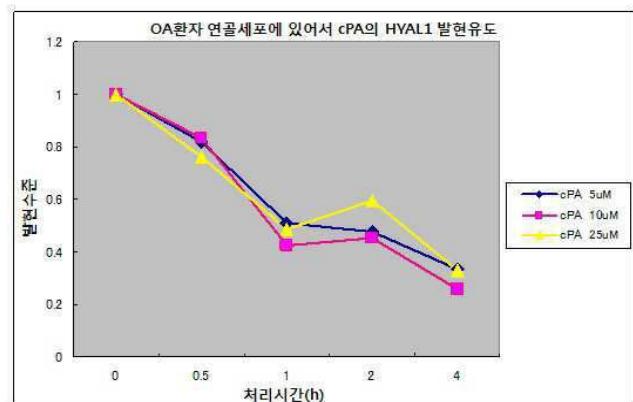
도면2



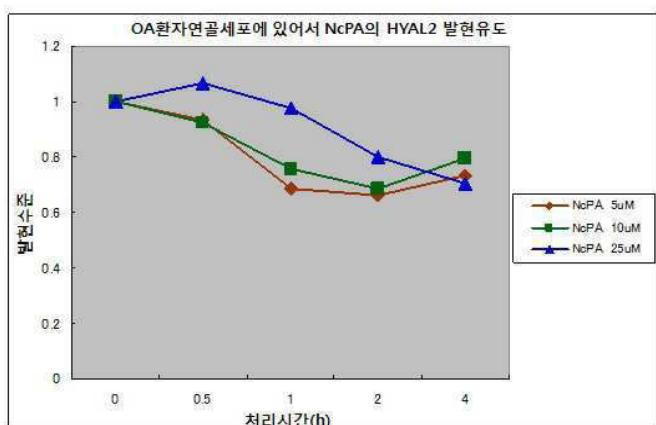
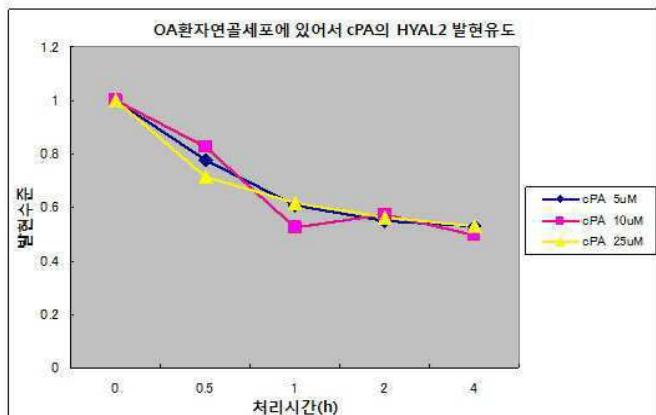
도면3



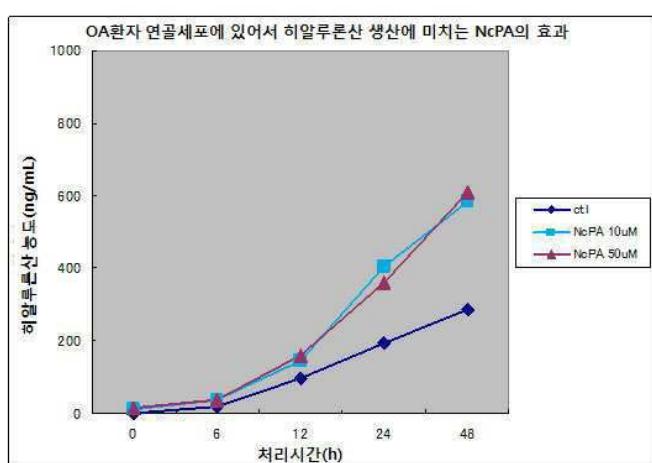
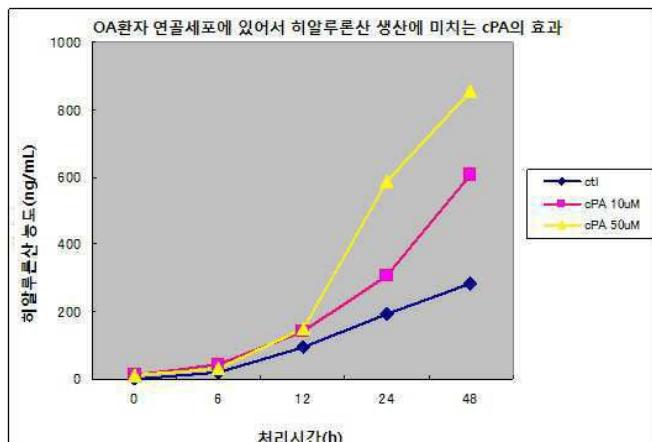
도면4



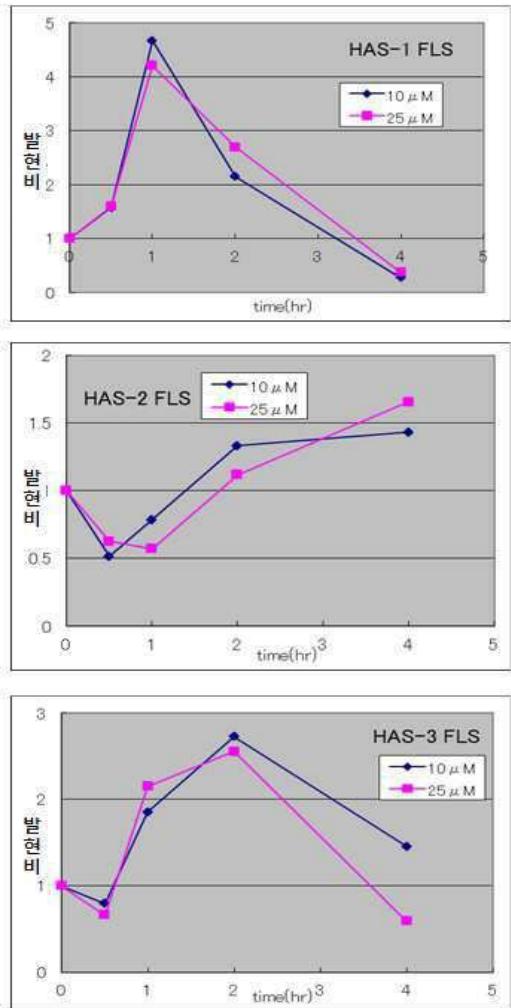
도면5



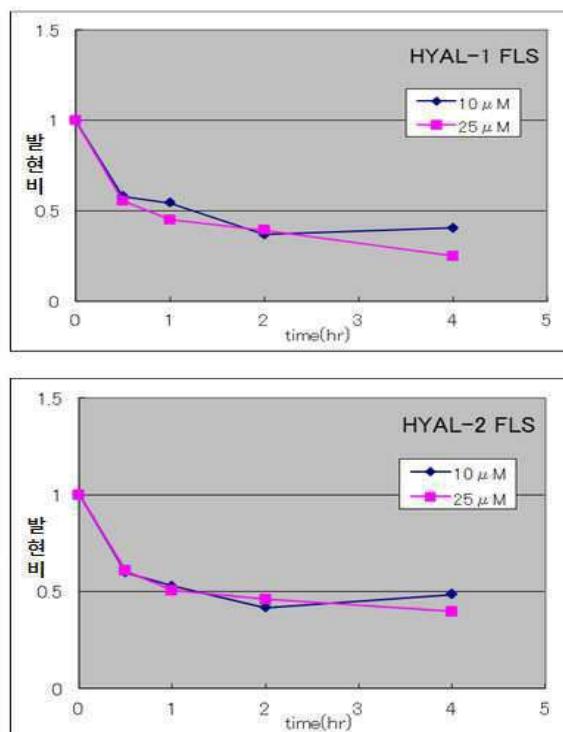
도면6



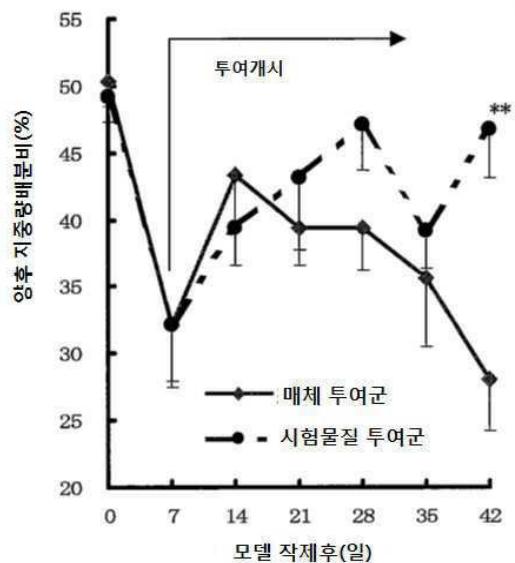
도면7



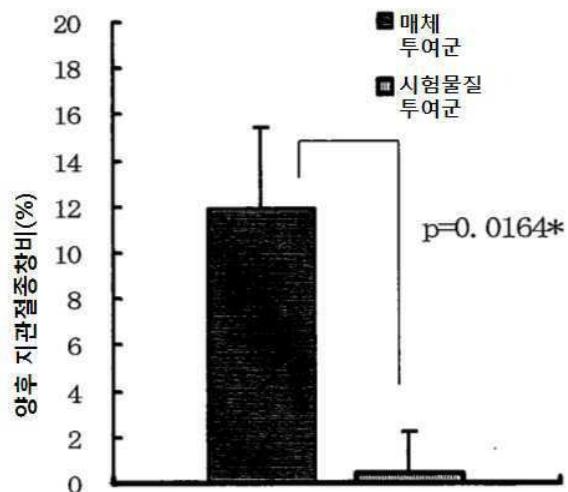
도면8



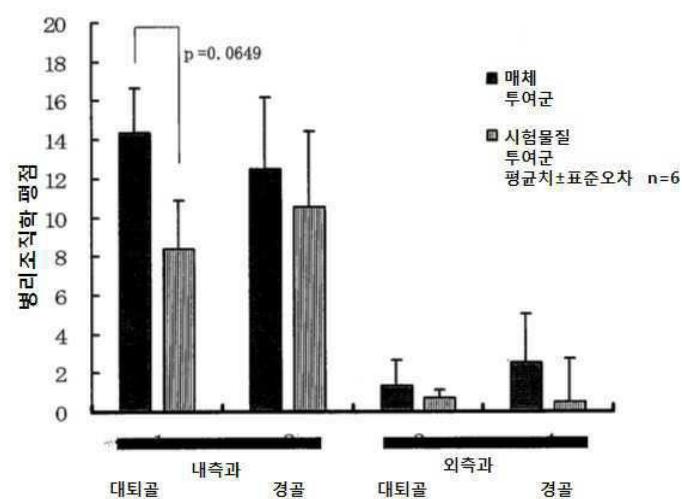
도면9



도면10



도면11



도면12

