

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0048016 (43) 공개일자 2014년04월23일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C07J 71/00 (2006.01) A61K 31/58 (2006.01) A61P 27/16 (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-0114488 (22) 출원일자 2012년10월15일 심사청구일자 2012년10월15일	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교) (72) 발명자 강동호 서울특별시 마포구 광성로6길 16, 4층 (신수동) 김태우 경기도 수원시 영통구 영통로 498, 146동 1902호 (영통동, 황골마을1단지아파트) (뒷면에 계속) (74) 대리인 유수미	

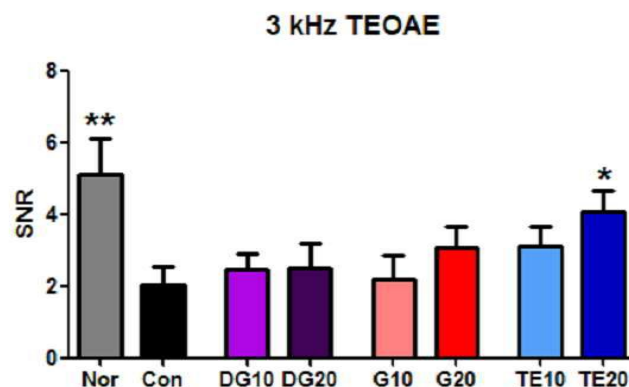
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 폐길레이션된 디오스게닌 유도체 및 그를 포함하는 난청의 치료 또는 예방용 조성물

(57) 요약

본 발명은 폐길레이션된 디오스게닌 유도체, 그의 제조방법 및 그를 포함하는 난청의 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 폐길레이션된 디오스게닌 유도체는 난청을 완화시키는 효과를 나타내며 물에 대한 용해도가 우수하여 난청의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물 또는 건강기능식품에 효과적으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

홍빛나

경기도 성남시 분당구 관교원로82번길 30, 1304동
901호 (운중동, 산운마을13단지아파트)

임춘우

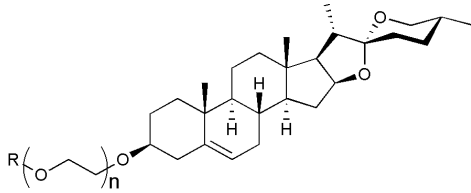
경기도 용인시 기흥구 금화로58번길 10, 403동
1106호 (상갈동, 금화마을주공4단지아파트)

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1의 페길레이션(PEGylation)된 디오스게닌 유도체:

[화학식 1]



상기 식에서,

R은 수소 또는 C₁-C₆의 저급 알킬기이고,

n은 1 내지 8의 정수이다.

청구항 2

제1항에 있어서, R이 수소 또는 메틸기인 것을 특징으로 하는 디오스게닌 유도체.

청구항 3

제2항에 있어서, R이 메틸기인 것을 특징으로 하는 디오스게닌 유도체.

청구항 4

제1항에 있어서, n이 4 내지 8의 정수인 것을 특징으로 하는 디오스게닌 유도체.

청구항 5

제1항에 있어서,

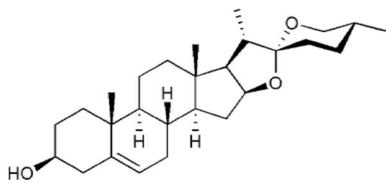
R이 메틸기이고,

n이 4인 것을 특징으로 하는 디오스게닌 유도체.

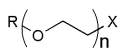
청구항 6

하기 화학식 2의 디오스게닌과 하기 화학식 3의 폴리에틸렌 글리콜 유도체를 결합반응시키는 것을 특징으로 하는 하기 화학식 1의 페길레이션(PEGylation)된 디오스게닌 유도체의 제조방법:

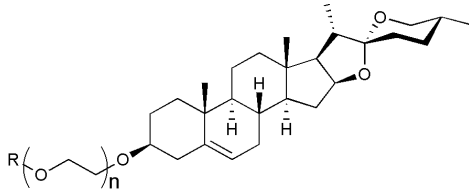
[화학식 2]



[화학식 3]



[화학식 1]



상기 식에서,

R은 수소 또는 C₁-C₆의 저급 알킬기이고,

n은 1 내지 8의 정수이며,

X는 이탈기이다.

청구항 7

제6항에 있어서, X가 *p*-톨루엔설포네이트, 메실레이트(mesylate) 또는 할로젠인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 결합반응이 염기의 존재 하에 수행되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 염기가 수소화 나트륨(sodium hydride)인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 폐길레이션된 디오스게닌 유도체를 포함하는 난청의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 난청이 당뇨병성 청각 손상인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 폐길레이션된 디오스게닌 유도체를 포함하는 난청의 개선 또는 예방용 건강기능식품.

청구항 13

제12항에 있어서, 난청이 당뇨병성 청각 손상인 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 난청을 완화시키는 효과를 나타내며 물에 대한 용해도가 우수한 폐길레이션된 디오스게닌 유도체, 그의 제조방법 및 그를 포함하는 난청의 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 사람의 청각 기관인 귀는 크게 외이, 중이 및 내이로 구성되어 있다. 말초 청각 기관의 가장 바깥쪽에 위치하는 외이는 귓바퀴와 외이도로 이루어져 있으며, 귓바퀴는 주로 소리의 방향성을 구별할 수 있게 하고, 외이도는 단순히 소리를 전달하는 통로의 역할만 하는 것이 아니라 공명기관의 역할을 하여 소리가 더 크게 들릴 수 있도록 한다. 중이는 외이와 내이 사이에 있으며, 외이도를 통해 들어온 음파를 고막, 이소골 연쇄를 통하여 내이에 전달하는 역할과 증폭기로써 소리가 더 크게 전달되도록 한다. 내이는 중이의 안쪽에 있으며 청각과 평형감

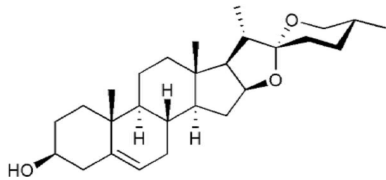
각의 수용기가 있다. 내이는 달팽이관, 전정 및 반규관의 세 부분으로 구분된다.

[0003] 외부에서 들어온 소리 자극이 외이, 중이를 거쳐 달팽이관에서 감지되고, 이때 소리는 전기에너지로 바뀌게 된다. 전기에너지로 바뀐 소리 자극은 청신경을 거쳐 뇌의 청각중추로 전달되어 소리로써 인식하게 된다. 외이와 중이는 소리를 전달하는 기관으로서 염증 같은 질병에 감염되었을 때 대부분 치료나 수술로써 회복될 수 있고, 그로 인한 청력손실 역시 치료 후에 개선될 수 있다. 이러한 난청을 전음성 난청(conductive hearing loss)이라 한다. 소리를 감지하는 기관인 달팽이관과 전기적 에너지로 소리를 전달하는 청신경, 그리고 소리의 변별, 이해 등 종합적인 역할을 하는 청각을 담당하는 뇌에 문제가 생겨 발생하는 난청을 감각신경성 난청(sensorineural hearing loss)이라 한다.

[0004] 일반적으로 감각신경성 난청은 현재까지 치료방법이 없는 것으로 알려져 있고, 그 원인으로는 노화, 소음, 약물, 대사성 질환(당뇨병, 신부전증, 갑상선 기능저하증) 또는 유전적 결함 등이 있다. 당뇨에 의한 난청은 당뇨 합병증인 말초신경병증으로 인한 청신경 손상에 의한 것으로 보고되어 있다[Hong BN et al., Neuroscience Letters, 431, pp268-272, 2008]. 청신경 손상에 의한 난청은 전기생리학적 측정 시 역치가 높아지거나, 신경 전달속도가 느려지거나, 파형의 형태가 비정상적으로 관찰되는 것이 특징이다. 임상적으로 당뇨환자에게 청신경 손상으로 인한 장애가 흔하게 나타나는 것으로 보고되고 있다[Tay HL et al., Clin. Otolaryngol. Allied Sci., 20, pp130-134, 1995].

[0005] 하기 화학식 2의 디오스게닌은 쥐의 콜레스테롤 흡수를 저해하고, 식이유도성 고콜레스테롤혈증(diet-induced hypercholesterolemia) 쥐의 혈중 콜레스테롤 수치를 감소시키는 것으로 알려져 있다. 하지만 이러한 효과에도 불구하고 그 의약학적 응용은 매우 제한적이며, 이는 디오스게닌의 나쁜 약물동태학적 특성에 기인한 것으로 알려져 있다.

[0006] [화학식 2]



[0007]

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 난청에 효과가 있으며 약물동태학적 특성이 우수한 약물을 개발하기 위해 예의 연구 검토한 결과, 하기 화학식 1의 페길레이션된 디오스게닌 유도체가 당뇨병으로 인한 난청 동물 모델에서 난청을 완화시키는 효과가 있으며 물에 대한 용해도가 우수함을 나타냄을 알아내고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 난청을 완화시키는 효과를 나타내며 약물동태학적 특성이 우수한 페길레이션된 디오스게닌 유도체를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 페길레이션된 디오스게닌 유도체의 제조방법을 제공하는 것이다.

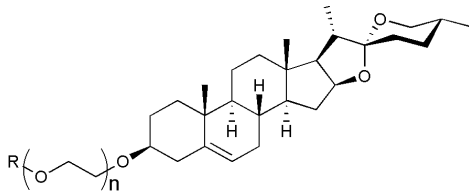
[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 페길레이션된 디오스게닌 유도체를 포함하는 난청의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 페길레이션된 디오스게닌 유도체를 포함하는 난청의 개선 또는 예방용 건강기능 식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 하기 화학식 1의 페길레이션(PEGylation)된 디오스게닌 유도체에 관한 것이다.

[0014] [화학식 1]



[0015]

[0016]

상기 식에서,

[0017]

R은 수소 또는 C₁-C₆의 저급 알킬기, 바람직하게는 수소 또는 메틸기, 가장 바람직하게는 메틸기이고,

[0018]

n은 1 내지 8, 바람직하게는 4 내지 8의 정수, 가장 바람직하게는 4이다.

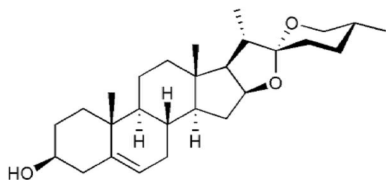
[0019]

본 명세서에서 C₁-C₆의 저급 알킬기는 탄소수 1 내지 6개로 구성된 직쇄형 또는 분지형 탄화수소를 의미하며, 예를 들어 메틸, 에틸, n-프로필, n-부틸, n-펜틸, n-헥실 등이 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020]

다른 한편으로, 본 발명은 하기 화학식 2의 디오스게닌과 하기 화학식 3의 폴리에틸렌 글리콜 유도체를 결합반응시키는 것을 특징으로 하는 상기 화학식 1의 페길레이션(PEGylation)된 디오스게닌 유도체의 제조방법에 관한 것이다.

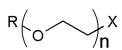
[0021] [화학식 2]



[0022]

[0023]

[화학식 3]



[0024]

[0025]

상기 식에서,

[0026]

X는 이탈기, 바람직하게는 p-톨루엔설포네이트, 메실레이트(mesylate) 또는 할로젠이고,

[0027]

R 및 n은 화학식 1에서 정의한 바와 같다.

[0028]

상기 화학식 2의 디오스게닌은 상업적으로 입수하거나, 당업계에 공지된 방법에 따라 천연물로부터 분리하거나, 천연물로부터 분리한 사포닌을 화학적 개질(modification)하여 제조할 수 있다[참고문헌: Zhu Y-L et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 85, pp1409-1416, 2010].

[0029]

또한, 상기 화학식 3의 폴리에틸렌 글리콜 유도체는 상업적으로 입수하거나, 당업계에 공지된 방법에 따라 용이하게 제조할 수 있다[참고문헌: Harris JM, J. Macromol. Sci. Part C 25. pp 325-373, 1985].

[0030]

본 발명에 따른 제조방법에서 상기 결합반응은 수소화 나트륨(sodium hydride)과 같은 염기의 존재 하에서 윌리엄슨 에테르 합성법(Williamson ether synthesis)을 통해 수행할 수 있다.

[0031]

이때 염기는 화학식 2의 디오스게닌을 기준으로 1 내지 3 당량 사용하는 것이 바람직하다.

[0032]

반응용매로는 디클로로메탄(dichloromethane), 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran), 디메틸포름아미드(dimethylformamide), 클로로포름(chloroform) 등을 사용하는 것이 바람직하며, 반응온도는 50 내지 90 °C가 바람직하다.

[0033]

본 발명에 따른 페길레이션된 디오스게닌 유도체는 당뇨병으로 인한 난청 동물 모델에서 난청을 완화시키는 효

과를 나타낸다(시험에 1 내지 3 참조).

- [0034] 따라서 본 발명은 상기 화학식 1의 페길레이션된 디오스게닌 유도체를 포함하는 난청, 특히 당뇨병성 청각 손상의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0035] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 경구적으로(예를 들면, 복용 또는 흡입) 또는 비경구적으로(예를 들면, 주사, 침착, 이식, 좌약) 투여될 수 있으며, 주사는 예를 들면, 정맥주사, 피하주사, 근육내주사 또는 복강내주사일 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 투여 경로에 따라, 정제, 캡슐제, 과립제, 파인 서브틸라(fine subtilae), 분제, 설하 정제, 좌약, 연고, 주사제, 유탁액제, 현탁액제, 시럽제, 분무제 등으로 제형화될 수 있다. 상기 여러 가지 형태의 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 각 제형에 통상적으로 사용되는 약제학적으로 허용되는 담체(carrier)를 사용하여 공지기술에 의해 제조될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체의 예는 부형제, 결합제, 붕해제(disintegrating agent), 윤활제, 방부제, 향산화제, 등장제(isotonic agent), 완충제, 피막제, 감미제, 용해제, 기재(base), 분산제, 습윤제, 현탁화제, 안정제, 착색제 등을 포함한다.
- [0036] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 약제의 형태에 따라 다르지만, 본 발명의 화합물을 약 0.01 내지 95 중량%로 포함한다.
- [0037] 본 발명의 약제학적 조성물의 구체적인 투여량은 치료되는 사람을 포함한 포유동물의 종류, 체중, 성별, 질환의 정도, 의사의 판단 등에 따라 다를 수 있다. 바람직하게는, 경구투여의 경우에는 하루에 체중 1 kg당 활성성분 0.01 내지 50 mg이 투여되고, 비경구투여의 경우에는 하루에 체중 1 kg당 활성성분 0.01 내지 10 mg이 투여된다. 상기 총 일일 투여량은 질환의 정도, 의사의 판단 등에 따라 한번에 또는 수회로 나누어 투여될 수 있다.
- [0038] 다른 한편으로, 본 발명은 상기 화학식 1의 페길레이션된 디오스게닌 유도체를 포함하는 난청, 특히 당뇨병성 청각 손상의 개선 또는 예방용 건강기능식품에 관한 것이다.
- [0039] 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액제, 에멀전, 시럽제 등의 경구형 제제 형태이거나, 캔디, 과자, 껌, 아이스크림, 면류, 빵, 음료 등 일반적인 식품에 첨가될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 건강기능식품은 형태에 따라 통상적인 방법으로 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 감미제, 방향제, 보존제, 계면활성제, 윤활제, 부형제 등을 적절히 사용하여 제조될 수 있다.
- [0041] 상기 건강기능식품의 제조에 있어서 본 발명의 화합물의 함량은 건강기능식품의 형태에 따라 다르지만, 약 0.01 내지 95 중량%의 농도이다. 본 발명의 건강기능식품은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.

발명의 효과

- [0042] 본 발명에 따른 페길레이션된 디오스게닌 유도체는 당뇨병으로 인한 난청 동물 모델에서 난청을 완화시키는 효과를 나타내며, 페길화에 의해 물에 대한 용해도가 향상되어 생체이용률(bioavailability)이 우수할 것으로 기대된다. 따라서, 본 발명에 따른 페길레이션된 디오스게닌 유도체는 난청, 특히 당뇨병성 청각 손상의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물 또는 건강기능식품에 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0043] 도 1은 당뇨병으로 인한 난청 동물 모델에서 청력역치에 대한 디오스제닌 (DG), 디오스게닌-포도당 유도체 (G) 및 디오스게닌-테트라에틸렌 글리콜 유도체 (TE)의 영향을 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 당뇨병으로 인한 난청 동물 모델에서 청성중기반응의 Pa 잠복기에 대한 디오스제닌 (DG), 디오스게닌-포도당 유도체 (G) 및 디오스게닌-테트라에틸렌 글리콜 유도체 (TE)의 영향을 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 당뇨병으로 인한 난청 동물 모델에서 이음향방사에 대한 디오스제닌 (DG), 디오스게닌-포도당 유도체 (G) 및 디오스게닌-테트라에틸렌 글리콜 유도체 (TE)의 영향을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

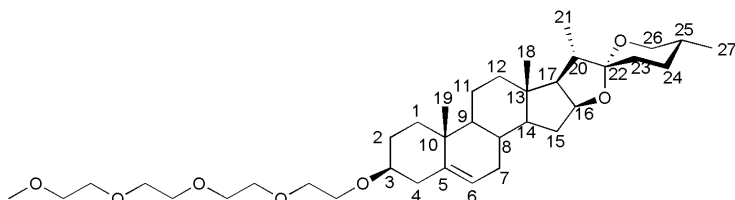
- [0044] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오직 본 발명을 설명하기 위

한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업자에게 있어서 자명하다.

실시예 1: 디오스게닌-테트라에틸렌 글리콜 유도체(TE)의 제조

디오스게닌 (1.4 g, 3.4 mmol)를 THF (15 mL)에 녹인 용액에 NaH (167 mg, 4.2 mmol, 60%, dispersion)를 넣고 30 분 동안 교반한 후, 무수 THF (0.7ml)에 녹인 11-메톡시-3,6,9-트리옥사운데실 *p*-톨루엔설포네이트 (11-Methoxy-3,6,9-trioxaundecyl *p*-toluenesulfonate) (1.0 g, 2.8 mmol)을 주사기를 이용하여 가하였다. 반응혼합물을 환류용촉기하에서 24 시간 동안 가열교반하였다. TLC 체크 후 NaH (167 mg, 4.2 mmol, 60%, dispersion)을 추가로 가한 후, 3시간 동안 더 가열교반하였다.

반응혼합물에 에틸아세테이트를 가하고 물로 유기층을 세 번 씻어낸 후 소금물로 한 번 씻어내었다. 유기층을 무수 황산마그네슘으로 나머지 수분을 제거한 후, 플래시 크로마토그래피 (silica gel, hexane:ethyl acetate = 1:3, v/v)를 통해 정제하여 순수한 표제 화합물 (0.96 g, 1.6 mmol, 57%)를 얻었다.



^1H NMR (CDCl_3 300 MHz): δ 5.30 (1 H, **6**), 4.38 (1 H, **16**), 3.63~3.50 (m, 16 H, $-\text{OCH}_2\text{H}_2\text{O}-$), 3.40~3.51 (2 H, **26**), 3.35 (s, 3 H, $\text{CH}_3\text{O}-$), 3.15 (m, 1 H), 2.1~2.3 (2 H, **4**), 2.0~1.0 (overlapping multiplets), 0.98 (3 H, **19**), 0.95 (1 H, **9**), 0.93 (3 H, **21**), 0.76 (app s, 6 H, **18** & **27**);

^{13}C NMR (CDCl_3 75MHz): δ 140.9, 121.2, 109.2, 80.7, 79.3 (**3**), 71.8, 70.8, 70.5, 70.4, 67.2 ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 66.8, 62.0, 59.0 ($-\text{OCH}_3$), 56.4, 50.0, 41.5, 40.2, 39.7, 38.9, 37.1, 36.9, 32.0, 31.8, 31.3, 31.3, 30.2, 28.7, 28.2, 20.8, 19.3, 17.1, 16.2, 14.5;

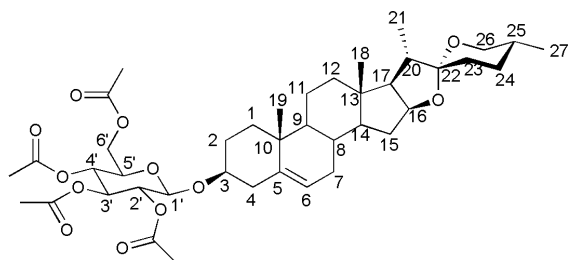
HRMS (FAB+) calcd mass 604.4339 for $[\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_7]$, found 605.4417 for $[\text{M}+\text{H}]^+$.

비교예 1: 디오스게닌-포도당 유도체(G, trillin)의 제조

비교예 1-1: 디오스게닌 3- β -D-글루코스 테트라아세테이트의 제조

디오스게닌 (0.42 g, 1.0 mmol)과 Ag_2CO_3 (2.2 g, 8.0 mmol)를 CH_2Cl_2 (10 ml)에 녹인 용액에 CH_2Cl_2 (10 ml)에 녹인 아세토브로모- α -D-글루코스 (acetobromo- α -D-Glucose) 용액을 천천히 가한 다음, 반응 혼합물을 상온에서 밤새 교반하였다.

녹지 않은 Ag_2CO_3 을 셀라이트 (celite) 거름을 이용하여 제거한 후, 여과액을 농축하여 플래시 크로마토그래피 (silica gel, hexane:ethyl acetate = 3:1 to 2:1, v/v)를 이용하여 정제하였다. 해당 용리액을 합쳐 용매를 제거한 후, 끓는 헥산용매 (150 ml)에서 재결정하였다. 천천히 상온으로 식힌 후 -20°C 냉장고에 밤새 보관했다. β 입체배열을 가지는 표제 화합물 (0.62 g, 0.83 mmol, 83%)가 하얀 침상고체로 재결정되었다.



[0057] ^1H NMR (CDCl_3 300 MHz): δ 5.32 (br, 1 H, **6**), 5.18 (dd, 1 H, $J_1 \approx J_2 = 9.5$ Hz), 5.06 (dd, 1 H, $J_1 \approx J_2 = 9.7$ Hz), 4.94 (dd, 1 H, $J_1 = 9.3$, $J_2 = 7.9$ Hz), 4.56 (d, 1 H, $J = 7.9$ Hz), 4.42-4.34 (app dd, 1H, $J_1 = 14.6$ $J_2 = 7.3$ Hz, **16**), 4.23 (dd, 1 H, $J_1 = 12.0$, $J_2 = 4.7$ Hz), 4.08 (dd, 1 H, $J_1 = 12.0$ $J_2 = 2.2$ Hz), 3.68-3.62 (m, 1H), 3.50-3.31 (3 H, **3** & **26**), 2.21 (2 H, **4**), 2.1~1.0 (overlapping multiplets), 2.05 (s, 3 H, $\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$), 2.03 (s, 3 H, $\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$), 2.00 (s, 3 H, $\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$), 1.98 (s, 3 H, $\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$), 0.98 (3 H, **19**), 0.95 (1 H, **9**), 0.93 (3 H, **21**), 0.76 (app s, 6 H, **18** & **27**);

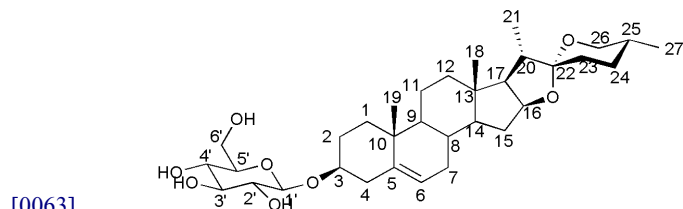
[0058] ^{13}C NMR (CDCl_3 75MHz): δ 170.6 ($\text{C}(=\text{O})$), 170.3($\text{C}(=\text{O})$), 169.3 ($\text{C}(=\text{O})$), 169.2 ($\text{C}(=\text{O})$), 140.2, 121.8, 109.2, 99.5 ($\text{C1}'$), 80.7, 79.9, 72.8, 71.6, 71.3, 68.4, 66.7, 62.0, 56.4, 49.9, 41.5, 40.2, 39.6, 38.8, 37.0, 36.7, 32.0, 31.7, 31.3, 30.2, 29.3, 28.7, 20.75, 20.70, 20.6, 20.5, 19.3, 17.1, 16.2, 14.4;

[0059] HRMS (FAB+) calcd mass 744.4085 for $[\text{C}_{41}\text{H}_{60}\text{O}_{12}]$, found 745.4163 for $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0060] 비교예 1-2: 디오스게닐 3- β -D-글루코스(G, trillin) 의 제조

[0061] 비교예 1-1에서 수득한 화합물 (0.61 g, 0.82 mmol)를 무수 THF에 녹인 후 메톡사이드 나트륨 (15 mL, 0.5 M in methanol)을 천천히 가하였다. TLC로 반응이 완전히 진행했음을 체크한 후, 무수 메탄올 (50 mL)를 가하였다.

[0062] 생성된 용액에 중성화를 위해 DOWEX[®] 50WX8-400 이온 교환 수지(~3 g)를 가하고 흔들여준 후 거름을 이용하여 이온교환수지를 제거하였다. 그런 다음, 플래시 크로마토그래피 (silica gel, dichloromethane:methanol = 10:1, v/v)을 통해 정제하여 흰색 고체상의 표제 화합물 (0.40 g, 0.69 mmol, 83 %)을 수득하였다.



[0064] ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$ 300 MHz): δ 5.31 (br, 1 H, **6**), 4.91-4.86 (m, 3H), 4.44 (app t, 1H, $J_1 = 5.7$ Hz), 4.27-4.19 (m, 2H), 3.61 (dd, 1 H, $J_1 = 10.8$, $J_2 = 5.6$ Hz), 3.44-3.38 (m, 2H), 3.22-2.97 (m, 4H), 2.88 (m, 1H), 2.1~1.0 (overlapping multiplets), 0.95 (3 H, **19**), 0.89 (4 H), 0.72 (app s, 6 H, **18** & **27**);

[0065] ^{13}C NMR (CD_3OD 75MHz): δ 141.9, 122.5, 110.5, 102.3, 82.2, 79.6, 78.0, 77.8, 75.0, 71.5, 67.8, 63.6, 62.7, 57.7, 51.6, 42.8, 41.4, 40.8, 39.6, 38.5, 38.0, 33.1, 32.7, 32.3, 31.4, 30.6, 29.8, 21.9, 19.8, 17.5, 16.7;

[0066] HRMS (FAB+) calcd mass 576.3662 for $[\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_8]$, found 577.3740 for $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0067] 시험예 1: 당뇨병으로 인한 난청 동물 모델에서 청력역치 평가

[0068] 스트렙토조토신 (streptozotocin) 120 mg/kg로 당뇨를 유발한 ICR 마우스에서 클릭 자극음으로 평가한 청성뇌간 반응의 청력역치를 측정하여, 당뇨병으로 인한 난청에 있어서 디오스게닌 (DG), 디오스게닌-포도당 유도체 (G) 및 디오스게닌-테트라에틸렌 글리콜 유도체 (TE)의 영향을 평가하였다.

[0069] 청성뇌간반응 (auditory brainstem response, ABR) 측정은 소리자극이 청신경에서 전기적인 신호로 전달될 때, 외부 전극을 통해 청신경의 전기적인 에너지를 측정하여 소리에 대한 반응을 평가하는 방법이다. 소리가 외이와 중이 그리고 달팽이관을 거쳐 청신경에 도달했을 때의 반응은 외이, 중이, 달팽이관의 상태를 모두 반영하는 것이다. 청력역치라 함은 겨우 들을 수 있는 소리의 최소 감각지점을 말하는 것으로 정상 마우스의 경우 평균

적으로 20 dB의 작은 소리에서도 반응이 관찰된다. 일반적으로 청력역치가 25 dB 이상이면 일상적인 대화에 경미한 장애가 있고, 40 dB 이상이면 보청기 같은 보조도구가 필요한 상태로 간주하며, 60 dB 이상이면 일상적인 대화음을 들을 수 없는 상태로 보청기 같은 보조도구 없이는 일상 대화가 불가능한 것으로 간주한다. 90 dB 이상이면 소리에 대한 변별력이 전혀 없는 농(deaf)으로 분류한다.

[0070] 난청을 유발한 동물모델로써 당뇨를 유발한 수컷 7주령 ICR 마우스에 대조군으로 비히클 (증류수; Con), 실험군으로 DG10 (DG 10 mg/kg), DG20 (DG 20 mg/kg), G10 (G 10 mg/kg), G20 (G 20 mg/kg), TE10 (TE 10 mg/kg), TE20 (TE 20 mg/kg)를 각각 투여하였다. 그리고 비교를 위하여 당뇨를 유발하지 않은 정상 ICR 마우스 (Nor)를 사용하였다. 당뇨 마우스는 공복시 혈당이 200 mg/dl 이상을 1주일간 유지하는 마우스만을 선택하여 1주 후부터 비히클과 DG, G, TE를 하루 한번 경구 투여하였다. 비히클과 DG, G, TE 투여 8주 후에 검사하였다.

[0071] 청성뇌간반응 검사는 케타민 (ketamine, 4.57 mg/kg)과 실라진 (xylazine, 0.43 mg/kg)을 마우스에게 근육 주사하여 마취시킨 후, 체온 37 ± 0.5 °C를 유지시키면서 평가하였다. 청성뇌간반응 검사 시 소리 자극음은 광대역 주파수를 포함하는 클릭 (click)으로 90 dB부터 점차적으로 5 dB씩 소리를 낮춰가며 평가했으며, 반응이 나오는 가장 작은 소리를 역치로 하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0072] 도 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 당뇨 마우스 (DM)의 청력역치는 44 dB로 유의적으로 높아진 반면, G20과 TE10, TE20 투여군(G20, TE10, TE20)의 경우 역치가 각각 26 dB, 29.5 dB와 27 dB로 당뇨 마우스보다 유의적으로 낮게 나타났다. 이는 G 또는 TE 투여에 의하여 당뇨병으로 인한 청력역치 증가가 효과적으로 억제됨을 확인한 것으로, G 또는 TE 투여가 난청을 완화시키는 효과가 있음을 보여준다.

[0073] 시험예 2: 당뇨병으로 인한 난청 동물 모델에서 중기반응 진폭 평가

[0074] 스트렙토조토신 (streptozotocin) 120 mg/kg로 당뇨를 유발한 ICR 마우스에서 클릭 자극음으로 평가한 청성중기반응의 Pa 잠복기 (latency)를 측정하여, 당뇨병으로 인한 난청에 있어서 DG, G 및 TE의 영향을 평가하였다.

[0075] 청성중기반응 (auditory middle latency response, AMLR) 측정은 소리자극이 청신경을 지나 중뇌에 도달했을 때, 외부 전극을 통해 중뇌의 전기적인 에너지를 측정하여 소리에 대한 반응을 평가하는 방법이다. MLR 평가시 20-30 ms 사이에 관찰되는 큰 파형을 Pa 반응이라 부르는데, Pa의 잠복기는 소리 자극 후 소리가 중뇌에 도달하는데 걸리는 시간을 나타내게 된다. 이때, 당뇨병에 의한 난청 마우스의 경우 Pa의 잠복기는 길어지는 것으로 나타나게 된다.

[0076] 난청을 유발한 동물모델로써 당뇨를 유발한 수컷 7주령 ICR 마우스에 대조군으로 비히클 (증류수; Con), 실험군으로 DG10 (DG 10 mg/kg), DG20 (DG 20 mg/kg), G10 (G 10 mg/kg), G20 (G 20 mg/kg), TE10 (TE 10 mg/kg), TE20 (TE 20 mg/kg)를 각각 투여하였다. 그리고 비교를 위하여 당뇨를 유발하지 않은 정상 ICR 마우스 (Nor)를 사용하였다. 당뇨 마우스는 공복시 혈당이 200 mg/dl 이상을 1주일간 유지하는 마우스만을 선택하여 1주 후부터 비히클과 DG, G, TE를 하루 한번 경구 투여하였다. 비히클과 DG, G, TE 투여 8주 후에 검사하였다.

[0077] 청성중기반응 검사는 케타민 (ketamine, 4.57 mg/kg)과 실라진 (xylazine, 0.43 mg/kg)을 마우스에게 근육 주사하여 마취시킨 후, 체온 37 ± 0.5 °C를 유지시키면서 평가하였다. 청성중기반응 검사 시 소리 자극음은 광대역 주파수를 포함하는 클릭 (click)으로 90 dB로 평가했으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0078] 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 당뇨 마우스 (DM)의 잠복기는 각각 43.7 ms로 유의적으로 길어진 반면, G20과 TE10, TE20 투여군(G20, TE10, TE20)의 경우 잠복기가 각각 27.9 ms, 31.3 ms와 28.1 ms로 당뇨 마우스보다 유의적으로 짧게 나타났다. 이는 G20과 TE10, TE20투여에 의하여 당뇨병으로 인한 청신경의 중기반응 전달속도 (latency)의 지연이 효과적으로 억제됨을 확인한 것으로, G20과 TE10, TE20 투여가 청신경병증을 완화시키는 효과가 있음을 보여준다.

[0079] 시험예 3: 당뇨병으로 인한 난청 동물 모델에서 이음향방사 평가

[0080] 스트렙토조토신 (streptozotocin) 120 mg/kg로 당뇨를 유발한 ICR 마우스에서 당뇨병으로 인한 달팽이관 내의 유모세포 (hair cell of cochlea) 손상에 있어서 DG, G 및 TE의 영향을 평가하였다.

[0081] 이음향방사 (transient evoked otoacoustic emission, TEOAE) 측정은 달팽이관 내의 유모세포에서 발생하는 소리를 외부에서 측정하는 방법으로, 건강한 유모세포의 경우 소리자극에 대한 반응으로써 소리를 발생시킨다.

반면 손상된 유모세포에서는 이러한 반응이 작아지거나 사라지게 된다. 장기간의 고혈당은 달팽이관 내의 유모 세포에 손상을 미치기 때문에 당뇨병으로 인한 난청에 대한 DG, G 및 TE의 효과를 확인하기 위해 이음향방사 측정을 수행하였다.

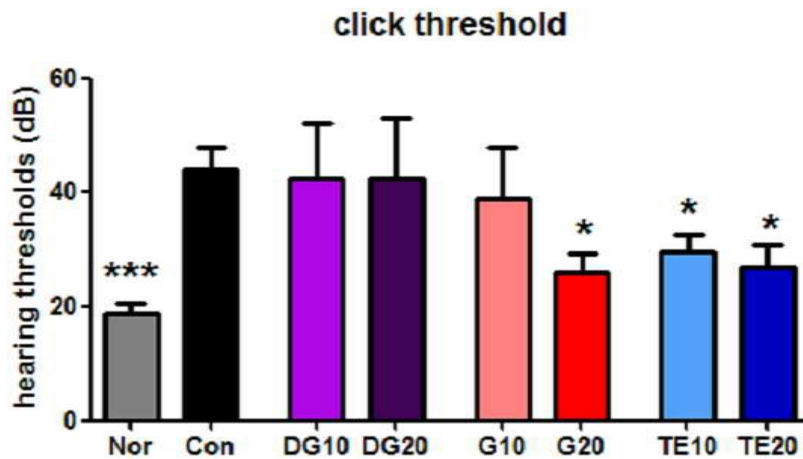
[0082] 난청을 유발한 동물모델로써 당뇨를 유발한 수컷 7주령 ICR 마우스에 대조군으로 비히클 (증류수; Con), 실험군으로 DG10 (DG 10 mg/kg), DG20 (DG 20 mg/kg), G10 (G 10 mg/kg), G20 (G 20 mg/kg), TE10 (TE 10 mg/kg), TE20 (TE 20 mg/kg)를 각각 투여하였다. 그리고 비교를 위하여 당뇨를 유발하지 않은 정상 ICR 마우스 (Nor)를 사용하였다. 당뇨 마우스는 공복시 혈당이 200 mg/dl 이상을 1주일간 유지하는 마우스만을 선택하여 1주 후부터 비히클과 DG, G, TE를 하루 한번 경구 투여하였다. 비히클과 DG, G, TE 투여 8주 후에 검사하였다.

[0083] 이음향방사 검사는 케타민 (ketamine, 4.57 mg/kg)과 실라진(xylazine, 0.43 mg/kg)을 마우스에게 근육 주사하여 마취시킨 후, 체온 37 ± 0.5 °C를 유지시키면서 평가하였다. 이음향방사 검사 시 소리 자극음은 광대역 주파수를 포함하는 클릭 (click)으로 60 dB로 평가했으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

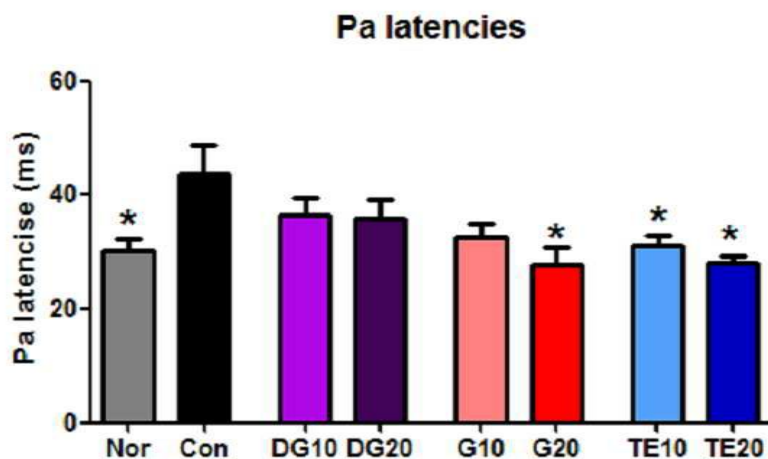
[0084] 도 3에서 확인되는 바와 같이, 당뇨 마우스 (DM)의 반응 강도는 2 dB로 유의적으로 낮아진 반면, TE20 투여군 (TE20)의 경우 반응 강도가 4.1 dB로 당뇨 마우스보다 유의적으로 높게 나타났다. 이는 TE 투여에 의하여 당뇨병으로 인한 달팽이관 손상이 효과적으로 억제됨을 확인한 것으로, TE 투여가 난청을 완화시키는 효과가 있음을 보여준다.

도면

도면1



도면2



도면3

