



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0103996
(43) 공개일자 2022년07월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/05 (2006.01) A61P 25/08 (2006.01)
C07C 39/23 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/05 (2013.01)
A61P 25/08 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7020682
- (22) 출원일자(국제) 2020년11월18일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년06월17일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2020/052942
- (87) 국제공개번호 WO 2021/099781
국제공개일자 2021년05월27일
- (30) 우선권주장
1916974.7 2019년11월21일 영국(GB)

- (71) 출원인
지더블유 리서치 리미티드
영국, 씨비24 9비제트 케임브리지셔 케임브리지,
히스턴, 시버스 웨이, 비전 파크, 소버린 하우스
- (72) 발명자
가이, 제프리
영국, 씨비24 9비제트 케임브리지셔 케임브리지,
히스턴, 시버스 웨이, 비전 파크, 소버린 하우스,
지더블유 파마 리미티드
크나페르츠, 볼커
영국, 씨비24 9비제트 케임브리지셔 케임브리지,
히스턴, 시버스 웨이, 비전 파크, 소버린 하우스,
지더블유 파마 리미티드
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **칸나비디올-유형 칸나비노이드 화합물**

(57) 요약

본 발명은 의약으로서 사용하기 위한 칸나비디올(CBD) 유형 칸나비노이드 화합물에 관한 것이다. CBD-유형 칸나비노이드, 6-하이드록시 칸나비디올(6-OH CBD)은 CBD의 대사산물이다. 칸나비노이드는 합성 수단에 의해 제조될 수 있고 6-OH CBD의 제조 방법이 본원에서 기술된다. 더불어, 본원에는 질환의 모델에서 6-OH CBD의 효능을 입증하는 데이터가 개시된다.

(52) CPC특허분류

C07C 39/23 (2013.01)

C07C 2601/16 (2017.05)

(72) 발명자

웰리, 벤자민

영국, 씨비24 9비제트 케임브리지셔 케임브리지,
히스턴, 시버스 웨이, 비전 파크, 소버린 하우스,
지더블유 파마 리미티드

울리-로버츠, 마리

영국, 씨비24 9비제트 케임브리지셔 케임브리지,
히스턴, 시버스 웨이, 비전 파크, 소버린 하우스,
지더블유 파마 리미티드

명세서

청구범위

청구항 1

의약으로서 사용하기 위한 6-하이드록시 칸나비디올(6-OH CBD).

청구항 2

제1항에 있어서, 6-OH CBD는 합성 화합물의 형태인 것인 6-OH CBD.

청구항 3

제1항에 있어서, 6-OH CBD는 순수한 또는 분리된 화합물의 형태인 것인 6-OH CBD.

청구항 4

선행하는 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 6-OH CBD의 용량은 100 mg/kg/일보다 큰 것인 6-OH CBD.

청구항 5

선행하는 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 6-OH CBD의 용량은 100 mg/kg/일 미만인 것인 6-OH CBD.

청구항 6

6-하이드록시 칸나비디올(6-OH CBD) 및 하나 이상의 제약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 의약으로서 사용하기 위한 조성물.

청구항 7

간질(epilepsy)의 치료에 사용하기 위한 6-하이드록시 칸나비디올(6-OH CBD).

청구항 8

제7항에 있어서, 치료되는 간질은 포유류의 간질인 것인 6-OH CBD.

청구항 9

제8항에 있어서, 포유류는 인간인 것인 6-OH CBD.

청구항 10

제8항에 있어서, 포유류는 개인 것인 6-OH CBD.

청구항 11

6-하이드록시 칸나비디올(6-OH CBD)의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한 칸나비디올(cannabidiol, CBD) 유형 칸나비노이드(cannabinoid) 화합물에 관한 것이다.
- [0002] CBD-유형 칸나비노이드, 6-하이드록시 칸나비디올(6-OH CBD)은 CBD의 대사산물이다.
- [0003] 칸나비노이드는 합성 수단에 의해 제조될 수 있다.
- [0004] 본원에는 질환의 모델에서 6-OH CBD의 효능을 입증하는 데이터가 개시된다. 더불어, 6-OH CBD의 제조 방법이 기술된다.

배경 기술

- [0005] 칸나비노이드는 칸나비스 식물의 구성성분 또는 칸나비노이드 수용체 CB1 또는 CB2의 내인성 작용물질(엔도칸나비노이드)에 구조적으로 또는 약리적으로 관련된 천연 및 합성 화합물이다. 자연계에서 이들 화합물이 생성되는 유일한 방법은 칸나비스 식물에 의한 것이다. 칸나비스는 칸나비스 사티바(*Cannabis sativa*), 칸나비스 인디카(*Cannabis indica*), 및 칸나비스 루데탈리스(*Cannabis ruderalis*)(때로 칸나비스 사티바의 일부로 여겨짐)를 포함한, 칸나바세아(*Cannabaceae*) 과의 개화식물 속이다.
- [0006] 칸나비스 식물은 화합물의 매우 복잡한 혼합물을 포함한다. 적어도 568개의 독특한 분자가 확인되었다. 이들 화합물 중에 칸나비노이드, 테르페노이드(terpenoids), 당, 지방산, 플라보노이드, 기타 탄화수소, 질소 함유 화합물, 및 아미노산이 있다.
- [0007] 칸나비노이드는 그것의 생리적 효과를, 한정하는 것은 아니지만, 아드레날린 수용체, 칸나비노이드 수용체(CB1 및 CB2), GPR55, GPR3, 또는 GPR5를 포함한 다양한 수용체를 통해 발휘한다. 칸나비스 식물에 존재하는 주요 칸나비노이드는 칸나비노이드 산 Δ^9 -테트라하이드로칸나비놀산(Δ^9 -THCA) 및 칸나비디올산(CBDA)이며 각각의 중성(탈카르복실화된) 칸나비노이드가 소량 있다. 더불어, 칸나비스는 저수준의 다른 미량(minor) 칸나비노이드를 함유할 수 있다. "Chemical composition, pharmacological profiling, and complete physiological effects of these medicinal plants, and more importantly the extracts from cannabis, remain to be fully understood." Lewis, M. M. et al., ACS Omega, 2, 6091-6103(2017).
- [0008] CBD를 함유한 칸나비스 식물로부터의 미정제 추출물은 질환 및 장애를 앓고 있는 환자에 의해 사용되어 왔다. 그러나, 그러한 미정제 생성물은 제약학적 제형에 사용하기에는 부적합하다. 질환 또는 장애를 치료하는 데 사용하기 위해 보다 일관된 CBD 제제를 제조하고자 하는 사람들은 CBD를 합성적으로 제조하거나 또는 식물 유래된 칸나비노이드로부터 CBD 이외의 모든 화합물, 특히 THC와 같은 향정신성 화합물을 제거하려고 시도하기 위해 공동의 노력을 기울였다. 예를 들어 US 2014/0298511 참고.
- [0009] 본 발명은 CBD의 대사산물이 치료 효능을 가지고 있다는 놀라운 발견을 포함한다. 이 화합물, 6-하이드록시 칸나비디올(6-OH CBD)은 합성에 의해 제조되어 정제된 형태로 사용될 수 있다.
- [0010] 칸나비노이드는 많은 것이 칸나비스 식물로부터 자연적으로 유래되거나 화학적 합성을 통해 합성적으로 제조될 수 있는 부류의 화합물이다.
- [0011] 칸나비스에 의해 생성된 100개 이상의 상이한 칸나비노이드가 확인되었다. 이들 칸나비노이드는 다음과 같이 상이한 그룹으로 나누어질 수 있다: 파이토칸나비노이드(phytocannabinoid); 엔도칸나비노이드 및 합성 칸나비노이드(신규한 칸나비노이드이거나 파이토칸나비노이드 또는 엔도칸나비노이드의 합성에 의해 제조된 버전일 수 있음).
- [0012] 파이토칸나비노이드는 자연으로부터 기원하며 칸나비스 식물에서 발견될 수 있는 칸나비노이드이다. 파이토칸나비노이드는 고도로 정제된 추출물을 생성하기 위해 식물로부터 분리될 수 있다. 파이토칸나비노이드는 식물 물질로부터 칸나비노이드를 추출하기 위해 사용된 방법에 따라 중성(탈카르복실화된 형태) 또는 카르복실산 형태로 얻어질 수 있다. 예를 들어, 카르복실산 형태를 가열하면 카르복실산 형태의 대부분이 중성 형태로 탈카르복실화되는 것을 유발할 것으로 알려져 있다. 파이토칸나비노이드는 식물로부터만 생성될 수 있지만, 파이토칸나비노이드의 버전들이 화학적 합성을 통해 합성적으로 제조될 수 있다.
- [0013] 엔도칸나비노이드(Endocannabinoid)는 포유류 중추신경계(뇌를 포함함) 및 말초신경계 전체에서 발견되는 칸나비노이드 수용체, 및 칸나비노이드 수용체 단백질에 결합하는 내인성 지질-기반 역행 신경전달물질(retrograde neurotransmitter)이다. 엔도칸나비노이드 시스템은 생식력, 임신, 산전 및 산후 발달, 식욕, 통증-감각, 기분, 및 기억을 포함한 다양한 생리적 및 인지적 과정을 조절하는데, 및 칸나비스의 약리적 효과를 매개하는데 관여한다.
- [0014] 합성 칸나비노이드는 칸나비노이드-유사 구조를 가지며 식물에 의해서보다는 화학적 수단을 사용하여 제조되는 화합물이다.
- [0015] 특정 칸나비노이드가 아래에서 보다 상세하게 기술된다.
- [0016] 칸나비디올(CBD)은 삼속 식물(칸나비스 사티바)과 같은 칸나비스 종의 주요 칸나비노이드 구성성분이다. 다른 칸나비노이드, 예컨대 THC와 달리, 칸나비디올은 CB1 또는 CB2에 결합하지 않거나, 또는 수용체에의 결합은 약

리적 효과를 유도하는 관점에서 무시될 정도이다. 그러므로, 칸나비디올은 CB1 또는 CB2 수용체에 의해 매개된 중추 또는 말초 신경계 효과를 유발하지 않는다. CBD는 거의 또는 전혀 항정신성(칸나비모방성) 활성을 갖지 않으며 그것의 분자 구조 및 특성은 다른 칸나비노이드의 그것들과 실질적으로 상이하다.

- [0017] 칸나비디올 투여는 대체 치료에 반응할 수 있는 다양한 질환 및 장애에 대한 대체 치료를 제공하기 위한 시도에서 연구 대상이 되었다.
- [0018] CBD의 대사를 측정하기 위해 동물에서 많은 연구가 시행되었다. CBD의 약동학은 주로 실질적인 초회 통과 효과(first pass effect)로 인해 복잡하다. 이것은 계속해서 인간 및 다른 종에서 경구 CBD의 생체이용률이 불량해 지도록 한다.
- [0019] CBD의 가장 풍부한 대사산물은 CBD의 하이드록실화된 7-카르복시 유도체로 다음을 들 수 있다: 2"-OH-7-COOH, 3",4",5"-트라이노르 CBD; CBD-글루쿠로니드; 4"-OH-7-COOH CBD; 2"-OH-7-COOH CBD; 10-OH-7-COOH CBD; 3"-OH-7-COOH CBD; 7-OH-3"-COOH, 4",5"-다이노르 CBD; 7-COOH-8,9-다이하이드로-8,9-다이OH CBD; 1"-OH-7-COOH CBD; 6-OH-42-COOH, 5"-노르 CBD; 6-OH-3"-COOH, 4",5"-다이노르 CBD; 7-COOH CBD; 7-OH-4"-COOH, 5"-노르 CBD; 4"-COOH, 5"-노르 CBD; 7-OH CBD; 8,9-다이하이드로-7,8,9-트라이OH CBD; 칸나비디올; 3"-COOH, 4",5"-다이노르 CBD; 2"-COOH, 3",4",5"-트라이노르 CBD; 2",6-다이OH, 3",4",5"-트라이노르 CBD; 6,7-다이OH CBD; 7-OH-1"-COOH, 2",3",4",5"-테트라노르 CBD; 6-OH CBD; 7-OH-5"-COOH CBD; 1"-COOH, 2",3",4",5"-테트라노르 CBD; 6-OH-1"-COOH, 2",3",4",5"-테트라노르 CBD 및 6-OH-5"-COOH CBD(Ujvary and Hanus, 2016).
- [0020] 특허 US 6,630,507호는 칸나비디올의 수많은 유사체를 기술한다. 화합물 6-OH CBD가 문헌에서 상세하게 기술되지만 이 화합물이 치료제로서 임의의 효능을 가질 수 있다는 증거를 제공하는 것으로 나타난 데이터는 없다.
- [0021] 테트라하이드로칸나비놀(THC)은 칸나비스의 중요한 항정신성 구성성분이다. THC는 CB1 및 CB2 수용체에서의 부분 작용물질이다. 합성 THC 또는 드로나비놀(dronabinol)은 AIDS 환자의 식욕 상실 및 암 화학요법에 의해 유발된 메스꺼움 및 구토의 치료를 위해 승인된다.
- [0022] 칸나비스 사티바에서 확인된 100개를 넘는 천연 칸나비노이드 중에서, 7개가 CBD-유형 화합물로서 분류되었고, 이들 칸나비노이드는 CBD와 동일한 절대 구성을 가진다. 이것들은: CBD, 칸나비디올산(CBDA), 칸나비디바린(Cannabidivarin, CBDV), 칸나비디바린산(CBDVA), 칸나비디올-C1(CBD-C1), 칸나비디올-C4(CBD-C4), 칸나비디올-C6(CBD-C6) 및 칸나비디올 모노메틸 에테르(CBDM)이다.
- [0023] 칸나비디올산(CBDA)은 CBD가 칸나비스 식물에서 존재하는 주요 형태이다. 그것은 탈카르복실화 후에 CBD로 전환된다.
- [0024] 칸나비디바린(CBDV)은 CBD의 유사체로, 2개의 메틸렌 가교에 의해 단축된 측쇄를 가진다. CBDV는 비-항정신성 칸나비노이드이며 간질(epilepsy)의 마우스 모델에서 항-경련 활성을 가지는 것으로 나타났다.
- [0025] 칸나비디올콜(cannabidiolcol)로도 알려져 있는 칸나비디올-C1(CBD-C1)은 CBD의 유사체로, 4개의 메틸렌 가교에 의해 단축된 측쇄를 가진다. CBD-C1은 CBD를 생성하는 식물에서 자연적으로 발생하지만 어떠한 치료 효과도 갖지 않는 것으로 나타났다.
- [0026] 노르-칸나비디올로도 알려져 있는 칸나비디올-C4(CBD-C4)는 CBD의 유사체로, 1개의 메틸렌 가교에 의해 단축된 측쇄를 가진다. CBD-C4는 CBD를 생성하는 식물에서 자연적으로 발생하며 본 발명 전에는 어떠한 치료 효과도 갖지 않는 것으로 나타났다.
- [0027] 칸나비디올-C6(CBD-C6)은 CBD의 유사체로, 1개의 메틸렌 가교에 의해 증가된 측쇄를 가진다. CBD-C6은 CBD를 생성하는 식물에서 자연적으로 발생하며 본 발명 전에는 어떠한 치료 효과도 갖지 않는 것으로 나타났다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0028] 본 발명은 처음으로 화합물 6-하이드록시 칸나비디올이 치료 이익을 가질 수 있음을 나타내는 데이터를 입증한다.

과제의 해결 수단

- [0029] 본 발명의 제1 측면에 따르면 의약으로서 사용하기 위한 6-하이드록시 칸나비디올(6-OH CBD)이 제공된다.

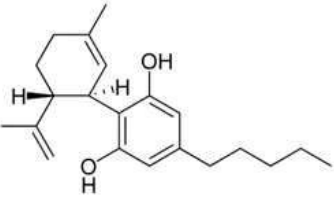
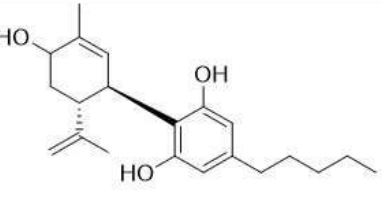
- [0030] 바람직하게 6-OH CBD는 합성 화합물로서 존재한다. 대안으로, 6-OH CBD는 순수한 분리된 화합물로서 존재한다.
- [0031] 바람직하게 6-OH CBD의 용량은 100 mg/kg/일보다 크다. 보다 바람직하게 6-OH CBD의 용량은 250 mg/kg/일보다 크다. 보다 바람직하게 6-OH CBD의 용량은 500 mg/kg/일보다 크다. 보다 바람직하게 6-OH CBD의 용량은 750 mg/kg/일보다 크다. 보다 바람직하게 6-OH CBD의 용량은 1000 mg/kg/일보다 크다. 보다 바람직하게 6-OH CBD의 용량은 1500 mg/kg/일보다 크다.
- [0032] 대안으로, 6-OH CBD의 용량은 100 mg/kg/일 미만이다. 보다 바람직하게 6-OH CBD의 용량은 50 mg/kg/일 미만이다. 보다 바람직하게 6-OH CBD의 용량은 20 mg/kg/일 미만이다. 보다 바람직하게 6-OH CBD의 용량은 10 mg/kg/일 미만이다. 보다 바람직하게 6-OH CBD의 용량은 5 mg/kg/일 미만이다. 보다 바람직하게 6-OH CBD의 용량은 1 mg/kg/일 미만이다. 보다 바람직하게 6-OH CBD의 용량은 0.5 mg/kg/일 미만이다.
- [0033] 본 발명의 제2 측면에 따르면 6-하이드록시 칸나비디올(6-OH CBD), 및 하나 이상의 제약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 의약으로서 사용하기 위한 조성물이 제공된다.
- [0034] 본 발명의 제3 측면에 따르면 간질의 치료에 사용하기 위한 6-하이드록시 칸나비디올(6-OH CBD)이 제공된다. 바람직하게 포유류의 간질이 치료된다. 보다 바람직하게 포유류는 인간이다. 대안으로, 포유류는 개이다.
- [0035] 본 발명의 제4 측면에 따르면 6-하이드록시 칸나비디올의 제조 방법이 제공된다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 발명의 구현에는 첨부되는 도면을 참조로 이하에서 한층 더 기술된다:
 도 1은 마우스에서의 MEST 테스트에서 6-OH CBD의 효과를 도시한다.
 도 2는 단일 정맥내 또는 복강내 투여 후 마우스의 혈장 및 뇌에서의 6-OH CBD의 약동학을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] **칸나비노이드 및 그것의 약어**
- [0038] 본 출원에서 기술되는 칸나비노이드가 그것의 표준 약어와 함께 아래에 열거된다.

CBD	칸나비디올	
6-OH CBD	알파 6-하이드록시 칸나비디올	

- [0039] 상세한 설명
- [0040] 실시예 1: 알파 6-하이드록시 칸나비디올-C6(6-OH CBD)의 합성 제조 방법
- [0042] 화합물 6-OH CBD는 칸나비디올의 알려져 있는 대사산물이다.
- [0043] 아래에서 기술되는 합성 경로는 칸나비노이드 알파 6-OH CBD를 제조하기 위해 사용될 수 있는 방법을 상세하게 설명한다.
- [0044] 계획에서 R=C₅H₁₁이다.
- [0045] 무수 피리딘(20 mL) 중의 칸나비디올(5.00 g, 15.8mmol)에 아세트산 무수물(5.13 g, 4.75 mL, 50.2 mmol)을 첨

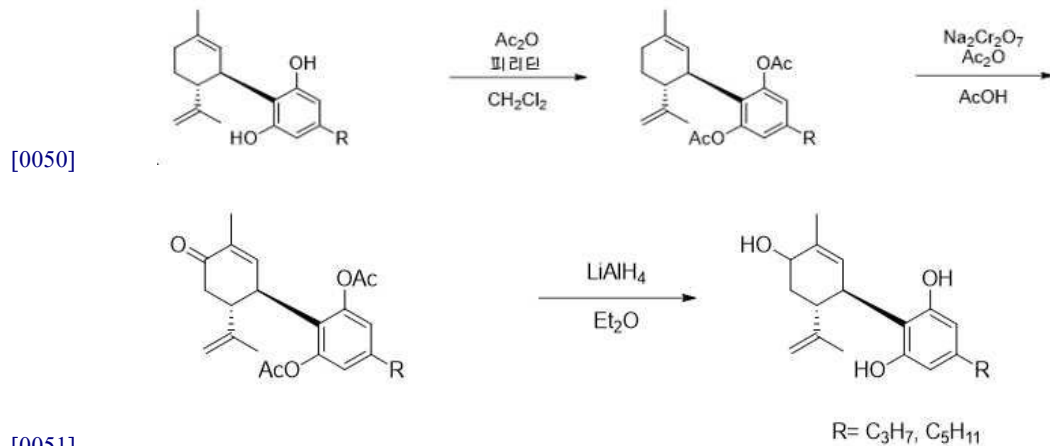
가하고 용액을 4시간 동안 교반하였다. 다이클로로메탄(300 mL)을 첨가하고 용액을 물(200 mL), 1 M 염산(200 mL), 포화 수성 중탄산 나트륨(200 mL)으로 세척하고, 건조시키고(MgSO₄) 농축하여 칸나비디올 다이아세테이트(5.72 g, 정량적)를 밀짚 황색 오일로서 얻었고, 그것을 추가의 정제 없이 사용하였다.

[0046] 빙초산(14 mL) 및 아세트산 무수물(7.12 g, 6.59 mL, 69.8 mmol) 중의 칸나비디올 다이아세테이트(6.18 g, 15.5 mmol)에 중크롬산 나트륨(4.87 g, 18.6 mmol)을 첨가하고 혼합물을 실온에서 4일 동안 교반하였다. 결과적으로 생성된 용액을 물(200 mL)로 희석하고 다이에틸 에테르로 추출하였다(200 mL, 이어서 150 mL). 조합한 유기 층을 포화 수성 중탄산 나트륨으로 세척하고(2 x 100 mL), 건조시키고(MgSO₄) 농축하여 황색 오일을 얻었고 그것을 254 nm에서의 검출을 포함한 순상 조건(실리카 칼럼, 페트롤 중의 에틸 아세테이트의 5 → 32% 구배)하에 Biotage Isolera 자동 크로마토그래피 시스템을 사용하여 정제하여 6-옥소-칸나비디올 다이아세테이트(2.03 g, 33%)를 무색 오일로서 얻었다.

[0047] R_f = 0.45(에틸 아세테이트 - 페트롤, 1 : 4 부피/부피)

[0048] 0°C의 다이에틸 에테르(36 mL) 중의 리튬 알루미늄 하이드라이드(355 mg, 9.37 mmol)에 다이에틸 에테르(8 mL) 중의 6-옥소-칸나비디올 다이아세테이트(0.92 g, 2.23 mmol)를 첨가하고 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 결과적으로 생성된 혼합물을 아이스 베스에서 냉각시키고 주의깊게 물(10 mL) 적하로 퀴칭하였다. 1 M 염산(60 mL)을 첨가하고 혼합물을 다이에틸 에테르(100 mL)로 추출하였다. 유기 층을 포화 식염수(80 mL)로 세척하고, 건조시키고(MgSO₄) 농축하여 담황색 오일을 얻었고 그것을 254 nm에서의 검출을 포함한 순상 조건(실리카 칼럼, 페트롤 중의 에틸 아세테이트의 7 → 47% 구배)하에 Biotage Isolera 자동 크로마토그래피 시스템을 사용하여 정제하여 6-옥소-칸나비디올(0.51 g, 69%)을 백색 유리질 고체로서 얻었다.

[0049] R_f = 0.34(에틸 아세테이트 - 페트롤, 3 : 7 부피/부피)



[0051]

[0052] 결과적으로 생성된 물질은 알파 6-하이드록시-칸나비디올(6-OH CBD)인 것으로 확인되었다. 화합물은 C₂₁H₃₀O₃의 화학식 및 330.5 g/mol의 분자량을 가지는 황색 유리질 반고체 물질이다.

[0053] 화합물의 순도를 HPLC에 의해 테스트하였고 95.6% 순수한 물질이 생성된 것으로 나타났다.

[0054] 6-OH CBD를 -20°C에서 보관하고 테스트에 필요할 때까지 빛으로부터 보호하였다.

[0055] **실시예 2: 마우스에서 극상 전기충격 발작(MES) 테스트를 사용한 항경련 활성에 대한 6-하이드록시 칸나비디올(6-OH CBD)의 평가**

[0056] 6-OH CBD의 효능을 발작의 마우스 모델에서 극상(supramaximal) 전기충격 발작(MES) 테스트로 테스트하였다.

[0057] 극상 전기충격 발작(MES) 테스트는 분자 및 표준 항간질 약물의 항-경련 특성을 평가하기 위하여 전임상적으로 널리 사용된다(Loscher *et al.*, 1991).

[0058] MES 테스트는 마우스가 대조군 동물의 100%에서 긴장성 뒷다리 신근 발작을 받을 수 있게 유발하기에 충분한 강도의 미리 결정된 양의 고수준의 전기 자극을 받는 매우 엄격한 모델이다. 그래서 MES 테스트는 항경련 활성의 엄격한 평가이다(Swinyard, 1985).

- [0059] **방법**
- [0060] 나이브 마우스를 그들의 홈 케이지의 과정실에 적응시키고, 사료 및 물을 마음대로 이용할 수 있게 하였다.
- [0061] 동물에게 치료 그룹에 따라 복강내로 투약하였다.
- [0062] 비히클(치료 전 60분 전 복강내 10 ml/kg)은 1:1:18의 비히클 5% 에탄올, 5% 콜리포어 EL, 90% 식염수였다.
- [0063] 테스트 화합물인 알파 6-OH CBD를 실시예 1에서 기술한 방법을 따라 제조하였다.
- [0064] 테스트 화합물인 6-OH CBD를 치료 전 60분 전 복강내 10 ml/kg으로 제공된 3, 30, 100 및 200 mg/kg의 용량으로 투여하였다.
- [0065] 더불어, 치료 전 120분 전 복강내 10 ml/kg으로 100 mg/kg CBD의 용량을 제공하여 장기간에 걸쳐 약물의 효과를 평가하였다.
- [0066] 양성 대조군 발프로에이트를 250 mg/kg으로 사용하였다(치료 전 30분 전 복강내 10 ml/kg).
- [0067] 대조군 동물의 100%에서 긴장성 뒷다리 발작을 받을 수 있게 유발하기에 충분한 강도의 미리 결정된 고수준(30 mA: 50 Hz)의 각막으로 전달된 전기충격(0.2초 기간) 후에 마우스를 긴장성 뒷다리 신근 발작의 발생에 대해 개별적으로 평가하였다.
- [0068] 발작의 유도를 각 동물에 대해 존재(+) 또는 부재(0)로서 채점된 전부 또는 전무 효과로서 측정한다.
- [0069] 데이터를 각 동물에 대해 치료에 대해 모르는 관찰자에 의해 수집하고 각 치료 그룹에 대해 + 또는 0의 숫자로서 표시하였다.
- [0070] 그런 후 관련 비히클 치료 그룹의 백분율 억제(비히클 치료된 대조군에 비교된 보호)를 생성하였다.
- [0071] 개별적인 치료 그룹과 비히클-치료 그룹 사이의 유의미한 차이를 양측 피셔 정확 확률 테스트를 사용하여 평가하였다($p < 0.05$ 를 유의미한 것으로 간주함).
- [0072] **결과**
- [0073] 아래의 표 1은 이 실험에서 생성된 데이터를 나타낸다.
- [0074] 테스트 전 30분 전에 복강내로 투여된 양성 대조군 발프로에이트(250 mg/kg) 치료 그룹에서, 모든 동물은 발작을 갖지 않는 것으로 채점되었다. 이 결과는 비히클 대조군과 비교하여 통계적으로 유의미하다($p < 0.001$).
- [0075] 테스트 전 120분 전에 복강내로 투여된 6-OH CBD 치료 그룹에서, 3 mg/kg 6-OH CBD의 용량은 비효과적이었다. 그러나, 30, 100 및 200 mg/kg 6-OH CBD의 용량은 그룹 내 모든 마우스가 발작을 견딜 수 있게 하였고 비히클과 비교하여 통계적으로 유의미한 효과를 생성하였다($p < 0.001$).
- [0076] 더불어, 120분에 제공된 6-OH CBD(100 mg/kg)의 용량 또한 비히클 대조군과 비교하여 통계적으로 유의미한 발작 감소를 유발하였다.

표 1

MES 테스트에서 6-OH CBD의 효과의 평가

치료	용량(mg/kg)	N	치료 전 시간 (분)	비히클로부터의 % 변화	유의성
비히클	-	10	60	-	-
발프로에이트	250	10	30	100%	P<0.001
6-OH CBD	3	10	60	0%	-
6-OH CBD	30	10	60	100%	P<0.001
6-OH CBD	100	10	60	100%	P<0.001
6-OH CBD	200	10	60	100%	P<0.001
6-OH CBD	100	10	120	100%	P<0.001

[0077]

[0078]

결론

[0079]

이들 데이터는 처음으로 화합물 6-OH CBD에 대한 치료 효과를 입증한다.

[0080]

마우스가 전기충격을 받기 전 2시간(120분) 전에 제공된 6-OH CBD를 보여주는 데이터는 화합물이 장기간 효과를 가질 수 있음을 입증한다.

[0081]

이들 데이터는 이 칸나비노이드가 치료적 가치가 있을 수 있다는 지금까지 알려지지 않은 증거를 제공하기 때문에 유의미하다.

[0082]

실시예 3: 마우스에서 최대 전기충격 발작 한계값(MEST) 테스트를 사용한 항경련 활성에 대한 6-하이드록시 칸나비디올(6-OH CBD)의 평가

[0083]

6-OH CBD의 효능을 전신 발작의 마우스 모델에서 최대 전기충격 발작 한계값(MEST) 테스트로 테스트하였다.

[0084]

최대 전기충격 발작 한계값(MEST) 테스트는 테스트 화합물의 전- 또는 항-경련 특성을 평가하기 위하여 전임상적으로 널리 사용된다(Loscher et al., 1991).

[0085]

MEST 테스트에서 뒷다리 긴장성 신근 경련(tonic extensor convulsion)을 유도하는 데 필요한 발작 한계값 전류를 변경시키는 약물의 능력을 "업앤다운" 충격 적정법에 따라 측정한다(Kimball et al., 1957). 발작 한계값의 증가는 항경련 효과를 나타낸다. 전신성 강직-간대성 발작(generalised tonic-clonic seizures)에 대해 임상적으로 효능이 증명된 나트륨 채널 차단제(예컨대 라모트리진)를 포함한 항간질 약물은 전부 마우스에서의 이 테스트에서 항경련 특성을 나타낸다.

[0086]

역으로, 발작 한계값의 감소는 피크로톡신과 같은 알려져 있는 경련제로 관찰된 것과 같이 경련 촉진 효과를 나타낸다.

[0087]

전류(mA)로서 표시되는, 긴장성 뒷다리 신근 경련의 존재를 유도하기 위해 필요한, 자극 강도를 변경시키는 테스트 화합물의 능력을 MEST로 평가한다. 치료 그룹의 50%의 동물에서 긴장성 뒷다리 신전을 발생시키는 전류(CC₅₀)로부터 관찰된 긴장성 뒷다리 신근 경련의 존재(+) 또는 부재(0)의 결과는 치료 그룹에 대한 발작 한계값을 결정하며 그런 후 효과를 비히클 대조군 그룹의 CC₅₀과 비교하였다.

[0088]

방법

[0089]

연구의 상세한 설명:

[0090]

나이브 마우스를 그들의 홈 케이지의 과정실에 최대 7일 동안 적응시키고, 사료 및 물을 마음대로 이용할 수 있게 하였다.

[0091]

모든 동물의 체중을 연구를 시작할 때 측정하고 그룹 전체에서 체중의 평균 분포를 토대로 한 치료 그룹으로 무

작위로 배정하였다. 모든 동물에게 비히클, 3, 10, 또는 30 mg/kg의 테스트 화합물, 또는 2.5 mg/kg의 디아제팜을 복강내 주사를 통해 10 mL/kg으로 투약하였다.

- [0092] 단일 전기 충격으로부터, 비히클의 경우 투여 후 30분 후에, 각각 3, 10, 및 30 mg/kg의 6-OH CBD의 경우 투여 후 30, 15 및 60분 후에, 및 디아제팜의 경우 투여 후 30분 후에, 동물을 긴장성 뒷다리 신근 경련의 발생에 대해 개별적으로 평가하였다.
- [0093] 치료 그룹 내의 첫 번째 동물에게 예상된 또는 추정된 CC₅₀ 전류에서 충격을 주었다. 후속 동물에 대해, 앞선 동물로부터의 경련 결과에 따라 전류를 낮추거나 상승시켰다.
- [0094] 각 치료 그룹으로부터 생성된 데이터를 사용하여 치료 그룹에 대한 CC₅₀ ± SEM 값을 계산하였다.
- [0095] 테스트 화합물:
- [0096] 비히클: (5% 에탄올, 5% 솔루톨, 90% 식염수)을 다음과 같이 제조하였다: 2 mL의 에탄올, 2 mL의 솔루톨을 36 mL의 식염수에서(1:1:18) 60°C로 가온하였다.
- [0097] 양성 대조군: 디아제팜을 2.5 mg/kg으로 사용하였다.
- [0098] 테스트 화합물인 알파 6-OH CBD를 실시예 1에서 기술한 방법을 따라 제조하였다. 3, 10, 및 30 mg/kg(복강내)의 6-OH CBD를 1:1:18 에탄올:솔루톨:0.9% 식염수 제형으로 투여하였다.
- [0099] 샘플 수집:
- [0100] 각각의 동물을 1986년 동물(과학적 절차)법의 별표 1에 따른 동물의 인도적 도살에 따라 두개골을 강타하여 뇌를 파괴하고, 이어서 참수로 인한 순환의 영구적 중단을 확인함으로써 경련의 발생 직후 인도적으로 사망시켰다. 참수 후에 말초혈 및 뇌 수집을 수행하였다.
- [0101] 혈액을 리튬-헤파린 튜브에 수집하여 4°C에서 10분 동안 1500 x g에서 원심분리하였다. 결과적으로 생성된 혈장을 제거하고(>100 μL) 안정화를 위해 100 μL의 아스코르브산(100 mg/mL)을 함유하고 있는 0.5 mL 에펜도르프 튜브에 2개의 부분표본으로 나누었다. 뇌를 제거하고, 식염수로 세척하고 이등분하였다. 각각의 절반을 별도의 2 mL 스크류 캡 냉동 바이알에 넣고, 무게를 측정하고 고체 이산화탄소 상에서 냉동시켰다.
- [0102] 통계적 분석
- [0103] 각 치료 그룹에 대한 데이터를 사용된 각각의 전류 수준에서 + 및 0의 숫자로서 기록한 후 이 정보를 사용하여 CC₅₀ 값(동물의 50%가 발작 행동을 보이는데 필요한 전류) ± 표준 오차를 계산한다.
- [0104] 6-OH CBD 효과를 또한 비히클 대조군 그룹으로부터의 CC₅₀의 백분율 변화로서 계산하였다.
- [0105] 약물 치료 동물과 대조군 사이의 유의미한 차이를 리치필드와 윌콕슨에 따라 평가하였다(Litchfield and Wilcoxon(1949)).
- [0106] 결과
- [0107] 아래의 표 2는 이 실험에서 생성된 데이터를 나타내며, 도 1은 이들 결과를 도시한다.
- [0108] 비히클 그룹에서, CC₅₀ 값은 24.0 mA인 것으로 계산되었다.
- [0109] 테스트 전 30분 전에 복강내로 투여된 양성 대조군 디아제팜(2.5 mg/kg) 치료 그룹에서, CC₅₀ 값은 48.8 mA였다. 이 결과는 비히클 대조군에 비교하여 통계적으로 유의미하였다(p<0.001).
- [0110] 테스트 전 30, 15, 및 60분 전에 복강내로 투여된 6-OH CBD 치료 그룹에서, 3, 10, 및 30 mg/kg 용량의 6-OH CBD는 화합물의 3가지 용량 전부에서 비히클과 비교하여 통계적으로 유의미한 CC₅₀ 값을 생성하였다.
- [0111] 그러한 데이터는 이 화합물이 치료적으로 유익할 것임을 나타낸다.

표 2

MEST 테스트에서 6-OH CBD의 효과의 평가

치료	용량 (mg/kg)	N	치료 전 시간(분)	CC ₅₀ ± SEM	비히클로부터의 % 변화	유의성
비히클	-	12	30	24.0 ± 0.4	-	-
디아제팜	2.5	12	30	48.8 ± 1.1	103%	P<0.001
6-OH CBD	3	12	30	30.0 ± 1.1	25%	P<0.001
6-OH CBD	10	12	15	56.5 ± 2.1	135%	P<0.001
6-OH CBD	30	12	60	102.5 ± 2.2	327%	P<0.001

[0112]

[0113] 결론

[0114] 6-OH CBD는 MEST에서 용량-관련 증가를 유발하였으며, 이것은 이 화합물이 항경련 특성을 나타낸다는 증거를 제공한다. 유의미한 효과를, 비히클과 비교했을 때 3, 10, 및 30 mg/kg에서 관찰하였다.

[0115] 이들 데이터는 이 칸나비노이드가 치료적 가치가 있을 수 있다는 지금까지 알려지지 않은 증거를 제공하기 때문에 유의미하다.

[0116] 실시예 4: 6-하이드록시 칸나비디올(6-OH CBD)의 약동학

[0117] 이 연구의 목적은 마우스에 대한 6-OH CBD의 단일 정맥내 또는 복강내 투여 후에 6-OH CBD의 뇌 및 혈장 약동학적 파라미터를 측정하고; 6-OH CBD에 대한 뇌:혈장 농도 비율을 측정하는 것이었다.

[0118] 방법

[0119] 99마리의 수컷 마우스 각각은 아래의 표 3에서 상세하게 나타낸 것과 같이 단일 정맥내 또는 복강내 용량의 6-OH CBD를 받았다.

표 3

투약의 상세한 설명

투약 경로	용량 수준(mg/kg)	동물의 수
정맥내	1	27
복강내	3	27
복강내	10	27
복강내	30	27

[0120]

[0121] 각각의 제형에 대해, 6-OH CBD를 에탄올:콜리포어 EL(크레모포어 EL):0.9%(중량/부피) 식염수(1:1:18, 부피/부피) 중의 필요한 농도로 제형화하였다.

[0122] 각각의 동물은 2 mL/kg의 공칭 용량 부피로 꼬리 정맥을 통해 단일 정맥내 투여 또는 5 mL/kg의 공칭 용량 부피로 단일 복강내 투여를 받았다.

- [0123] 투여 후에, 말초혈 샘플을 각 동물로부터 심장 천공을 통해 수집하고, 각각의 다음 시점에서 뇌를 절개하였다:
- [0124] · 정맥내 그룹: 7, 15 및 30분, 1, 2, 4, 8, 12 및 24시간;
- [0125] · 복강내 그룹: 15 및 30분, 1, 2, 4, 8, 12 및 24시간.
- [0126] 혈액을 리튬 헤파린 항응고제를 함유한 튜브에 수집하고 원심분리하여 혈장을 제조하였다. 뇌 샘플을 드라이아이스 상에서 냉동시킨 후, 무게를 측정하고 생체분석 전에 급속 냉동 보관하였다. 나머지 사체는 버렸다. 혈장을 동일한 부피의 아스코르브산 용액으로 안정화시킨 후, 생체분석 전에 급속 냉동 보관하였다.
- [0127] 안정화된 혈장 샘플을 분석하여 적격 LC-MS/MS 방법을 사용하여 6-OH CBD의 농도를 측정하였다. 이들 분석의 결과를 평가하여 비-구획 약동학적 파라미터를 측정하였다.
- [0128] **결과**
- [0129] 표 4 및 5는 이 연구에서 얻어진 결과를 입증하며, 도 2는 결과를 도시한다. 다음의 파라미터를 측정하였다:
- [0130] C_{max} 관찰된 최대 농도.
- [0131] T_{max} 최대 관찰 농도 시간.
- [0132] AUC_{0-t} 선형 사다리꼴 규칙에 의해 추정된, 시간 0부터 마지막 정량 가능한 농도까지의 농도-시간 곡선 아래의 면적.
- [0133] AUC_{0-24} 선형 사다리꼴 규칙에 의해 추정된, 시간 0부터 24시간까지의 농도-시간 곡선 아래의 면적.
- [0134] $t_{1/2} \ln(2)/\lambda z$ 로서 측정된 제거 반감기.
- [0135] Cl 용량/ AUC_{0-inf} 로서 계산된(정맥내 용량에 대해서만) 제거율.
- [0136] $V_{ss} Cl/\lambda z$ 로서 계산된(정맥내 용량에 대해서만), 말단 제거 단계를 토대로 한 분포 부피.
- [0137] F_{abs} 복강내 용량의 절대 생체 이용률.

표 4

단일 정맥내 또는 복강내 투여 후 혈장 및 뇌에서의 6-OH CBD의 복합 약동학적 파라미터

매트릭스	치료	용량 수준 (mg/kg)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (시간)	AUC_{0-t} (h*ng/mL)	AUC_{0-24} (h*ng/mL)	$t_{1/2}$ (시간)	F_{abs} (%)	Cl (mL/분/kg)	V_{ss} (L/kg)
혈장	정맥내	1	775	0.117	342	343	0.451	NA	48.7	1.90
	복강내	3	658	0.250	533	535	0.993	52.1	NA	NA
	복강내	10	2550	0.250	2590	2600	1.08	75.8	NA	NA
	복강내	30	11000	0.250	17700	17700	0.959	173	NA	NA
뇌	정맥내	1	1580	0.117	679	690	0.312	NA	NA	NA
	복강내	3	851	0.500	756	768	0.569	NA	NA	NA
	복강내	10	3680	0.250	3750	3940	0.706	NA	NA	NA
	복강내	30	13500	1.00	25000	25000	0.919	NA	NA	NA

[0138]

표 5

6-OH CBD의 단일 복강내 투여 후 6-OH CBD C_{max} 및 AUC₀₋₂₄ 값에 대한 뇌:혈장 비율

투약 경로	용량 수준 (mg/kg)	뇌:혈장	
		C _{max}	AUC ₀₋₂₄
정맥내	1	2.03	2.01
복강내	3	1.29	1.44
복강내	10	1.45	1.52
복강내	30	1.23	1.41

[0139]

[0140] 표 4로부터 알 수 있는 것과 같이, 1 mg/kg의 용량 수준으로의 6-OH CBD의 정맥내(IV) 투여 후, T_{max}를 투여 후 0.117 시간(7분) 후에 관찰하였다. C_{max}에 도달한 후, 6-OH CBD 농도는 감소하였고, 반감기(t_{1/2})는 0.451시간이었다. 총 혈장 제거율은 48.7 mL/분/kg이었고 분포 부피는 1.90 L/kg이었다.

[0141] 3, 10 또는 30 mg/kg으로 복강내(IP) 투여 후에, 6-OH CBD는 흡수되었고, T_{max} 값은 각 용량 수준에서 0.250시간(15분)이었다. C_{max}에 도달한 후, 혈장 농도는 감소하였고, 반감기(t_{1/2}) 값은 0.993 내지 1.08시간이었으며 평가된 각 용량 수준 전체에서 유사하였다.

[0142] 복강내 투여 후, 혈장에서 6-OH CBD 노출(C_{max} 및 AUC₀₋₂₄ 값에 의해 평가됨)은 각각 3 내지 30 mg/kg의 용량 수준의 증가로 증가하였다. 관찰된 노출의 증가는 용량-비례보다 컸고, 용량 수준의 10배 증가에 대해 C_{max}의 경우 16.7배 및 AUC₀₋₂₄의 경우 33.2배 증가하였다.

[0143] 복강내 투여 후 6-OH CBD의 절대 생체이용률은 3, 10 및 30 mg/kg에서 각각 52.1%, 75.8% 및 173%였다.

[0144] 전신성 투여 후, 6-OH CBD는 뇌에서 나타났고, 정맥내 투여 후 T_{max} 값은 0.117시간이었고 0.250 내지 1시간의 범위였다. C_{max}에 도달한 후, 6-OH CBD 농도는 감소하였고, 반감기(t_{1/2}) 값은 정맥내 투여 후 0.312시간이었으며 0.569 내지 0.919시간의 범위였고, 복강내 투여 후 용량 수준의 증가에 따라 증가하는 경향이 있었다.

[0145] 표 5에서 알 수 있는 것과 같이, 복강내 투여 후, 뇌에서 6-OH CBD 노출(C_{max} 및 AUC₀₋₂₄ 값에 의해 평가됨)은 각각 3 내지 30 mg/kg의 용량 수준의 증가로 증가하였다. 관찰된 노출의 증가는 용량-비례보다 컸고, 용량 수준의 10배 증가에 대해 C_{max}의 경우 15.8배 및 AUC₀₋₂₄의 경우 32.6배 증가하였다.

[0146] 6-OH CBD C_{max} 및 AUC₀₋₂₄에 대한 뇌:혈장 비율은 C_{max}의 경우 1.23 내지 2.03의 범위 및 AUC₀₋₂₄의 경우 1.41 내지 2.01의 범위였다. 복강내 투여 후, 두 파라미터에 대한 비율은 평가된 각 용량 수준 전체에서 유사하였다. 그러나, 두 파라미터에 대한 비율은 복강내 투여와 비교하여 정맥내 투여 후에 더 높았다.

[0147] 결론

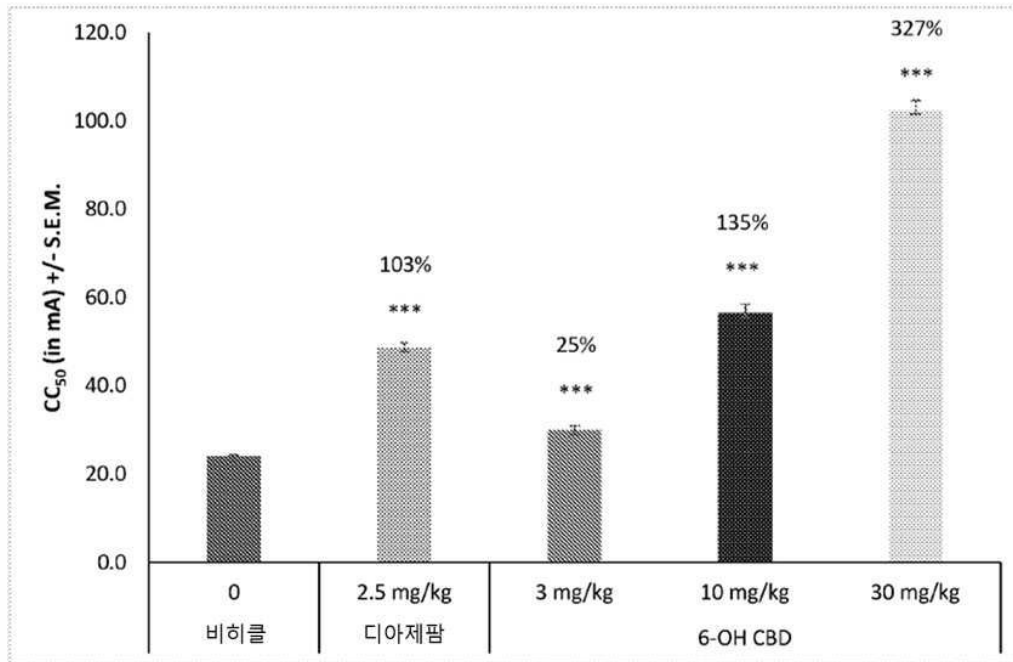
[0148] 복강내 투여 후, 6-OH CBD는 모든 용량의 복강내 투여에 대해 15분의 T_{max} 값; 및 1 mg/kg의 정맥내 투여에 대해 7분의 T_{max} 값으로 흡수되었다.

[0149] 이 연구의 결과는 화합물 6-OH CBD에 대한 양호한 약동학 파라미터(생체이용률, 제거율 등)의 증거를 제공한다.

도면

도면1

도 1. 마우스에서 전기충격-유도된 전신 발작 한계값(MEST)에 미치는 6-OH 칸나비디올 (6-OH CBD)의 영향



*P<0.05**P<0.01, ***P<0.001 자체 비히클과 비교할 때 한계값의 유의미한 변화

도면2

도 2. 단일 정맥내 또는 복강내 투여 후 마우스의 혈장 및 뇌에서의 6-OH 칸나비디올(6-OH CBD)의 약동학

